



БЪЛГАРСКО МЕДИЦИНСКО  
СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ  
BULGARIAN MEDICAL  
SOCIETY OF HEMATOLOGY

# ХЕМАТОЛОГИЯ

# HEMATOLOGY

ТОМ LIV – БРОЙ 1-2 – 2018г.

# ХЕМАТОЛОГИЯ HEMATOLOGY

СПИСАНИЕ НА БЪЛГАРСКОТО МЕДИЦИНСКО СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ  
JOURNAL OF THE BULGARIAN MEDICAL SOCIETY OF HEMATOLOGY

ТОМ/VOL. LIV

2018

№ 1-2

## РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ

Главен редактор

Проф. д-р Стефан Горанов, дмн  
тел.: 0888 889 627  
stefangoranov@yahoo.com

Зам. главен редактор

Проф. д-р Георги Балаценко, дм  
тел.: 02 970 1137

Секретар

Доц. д-р Веселина Горанова-Маринова, дмн  
тел.: 032 602 596, 032 602 298

Членове

Проф. д-р Георги Михайлов, дм

Проф. д-р Маргарита Генова, дм

Проф. д-р Фани Мартинова, дмн

Проф. д-р Жанет Грудева – Попова, дм

Доц. д-р Лиана Герчева, дм

Проф. д-р Юлиан Райнов, дм

Доц. д-р Валерия Калева, дм

Доц. д-р Евгений Хаджиев, дм

Д-р Лилия Сивчева

## EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Prof. Stefan Goranov, MD, PhD, DMSc  
tel:+359 888 889 627  
stefangoranov@yahoo.com

Associated Editor-in-Chief

Prof. Georgi Balatzenko, MD, PhD  
tel./fax: +359 2 970 1137

Secretary

Ass. Prof. Vesselina Goranova-Marinova, MD,  
PhD, tel.: +359 32 602 596, 602 298

Members

Prof. Dr. Georgi Michaylov, MD PhD

Prof. Dr. Margarita Genova, MD PhD

Prof. Dr. Fani Martinova, MD PhD DMSc

Prof. Janet Grudeva-Popova MD PhD

Ass. Prof. Liana Gercheva, MD PhD

Prof. Julian Raynov, MD PhD

Ass. Prof. Valeria Kaleva, MD PhD

Ass. Prof. Eugenii Hadjiev, MD PhD

Dr. Lilia Sivcheva

## СЪДЪРЖАНИЕ/CONTENT

### ОБЗОРИ/REVIEWS

1. РОЛЯТА НА NETOSIS В ПАТОФИЗИОЛОГИЯТА НА УСЛОЖНЕНИЯТА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ, Ш. Юзеир и Л. Герчева.  
PATHOPHYSIOLOGIC ROLE OF NETOSIS FOR COMPLICATIONS IN MALIGNANT TUMORS, Sheniz Yuzeir, MD and L. Gercheva.....3
2. МУТАЦИИ В CALRETICULIN ГЕНА ПРИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ: БИОЛОГИЯ, ЧЕСТОТА, МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ И КЛИНИЧНА ЗНАЧИМОСТ, С. Иванова, Г. Балаценко.  
MUTATIONS IN THE CALRETICULIN GENE IN MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS: BIOLOGY, INCIDENCE, METHODS OF INVESTIGATION AND CLINICAL SIGNIFICANCE, S.Ivanova, G. Balatsenko.....8
3. ИМУНОЛОГИЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ ЕКСТРАКОРПОРАЛНА ФОТОФЕРЕЗА, И. Митков, С. Симеонов, И. Тонев, М. Минчев  
IMMUNOLOGICAL CHANGES AFTER EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS, I. Mitkov, S. Simeonov, I. Tonev, M. Mincheff.....14
4. ОТНОШЕНИЯТА ЛЕКАР – ПАЦИЕНТ : СПОДЕЛЕНАТА ОТГВОРНОСТ, ЛОШИТЕ НОВИНИ И ОТБОРНАТА ИГРА, В. Донкина  
DOCTOR-PATIENT RELATIONS : SHARED RESPONSIBILITY, BAD NEWS AND TEAM PLAY, V. Donkina.....19
5. БОЛЕСТ НА ГОШЕ СЕ АСОЦИИРА С ПОВИШЕН РИСК ОТ НЯКОИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ И МОНОКЛОНАЛНА/ПОЛИКЛОНАЛНА ГАМАПАТИЯ, В Върбанова  
GAUCHER DISEASE IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED RISK OF CERTAIN MALIGNANCIES AND MONOCLONAL /POLYCLONAL GAMMOPATHY, V. Varbanova.....23
6. РАДИОСИНОВЕКТОМИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХЕМОФИЛНА АРТРОПАТИЯ, В. Горанова-Маринова, Хр.Иванова, В. Попов, Ж.Грудева-Попова  
RADIOSYNVECTOMY IN PATIENTS WITH HEMOPHILIC ARTHROPATHY, V. Goranova-Marinova, Hr.Ivanova, V.Popov, J.Grudeva-Popova.....28
7. DR BENICE JONES И ЛЕКОВЕРИЖНИТЕ ПРОТЕИНИ – ИСТОРИЯ С МНОГО УЧАСТНИЦИ И НЕЗАВЪРШЕН КРАЙ... (ИСТОРИЧЕСКИ ОБЗОР), Ст. Горанов, В. Горанова-Маринова  
DR BENICE JONES AND LIGHT CHAIN PROTEINS - A STORY WITH MANY PARTICIPANTS AND UNFINISHED END ... TO BE CONTINUED, S.Goranov, V. Goranova-Marinova.....31
8. ПРОМЕНИ В СТРУКТУРАТА И ФУНКЦИЯТА НА КОАГУЛАЦИОНЕН ФАКТОР VIII ПРИ ХЕМОФИЛИЯ ТИП А, ПРЕДИЗВИКАНА ОТ ИНВЕРСИЯ 22 В ГЕН F8, В. Р. Атанасов, С. Х. Христова, А. М. Живков  
ALTERATIONS IN THE 3D-STRUCTURE AND FUNCTION OF THE COAGULATION FACTOR VIII AT HАEMOPHILIA A CAUSED BY INVERSION 22 IN THE F8 GENE, V. R. Atanasov, S. H. Hristova, A. M. Zhivkov3.....35

„ХЕМАТОЛОГИЯ“  
бр. 1-2/2018, том LIV

“HEMATOLOGY”  
issue 1-2/2018, Vol. LIV

ISSN 2367-7864  
УДК 616.15

Списаниего се обработва в:  
\* SCOPUS

**ИЗДАТЕЛ:**

Българското медицинско сдружение по  
Хематология  
1756 София, ул. Пловдивско поле №6,  
НСБАЛХЗ

**ОРГАНИЗАТОР ПО ОТПЕЧАТВАНЕ:**

Импресив ЕООД, Пловдив  
Тел за контакт: 0889 546 506

**МЕДИЦИНСКА КОРЕКЦИЯ, СТИЛ,  
СТРУКТУРА И СТАТИСТИКА:**

Доц. Д-р Веселина Горанова-Маринова, дм,  
Д-р Катя Сотирова

**СТИЛОВА РЕДАКЦИЯ, КОРЕКЦИЯ,  
ГРАФИЧЕН ДИЗАЙН:**

Импресив ЕООД, Пловдив,  
Тел за контакт: 0889 546 506  
sotirov.joro@gmail.com

**PUBLISHER:**

Bulgarian Medical Society of Hematology  
1756 Sofia, Bulgaria, 6 Plovdivsko pole str.  
(National Specialised Hospital for Active  
Treatment of Hematological Diseases )

**PUBLISHING AND PRINTING  
ORGANIZER:**

Impressive Ltd, Plovdiv  
Phone: +359 889 546 506

**MEDICAL CORRECTION, STYLE,  
STRUCTURE AND STATISTICS:**

Ass. Prof. Dr. Vesselina Goranpva-  
Marinova, MD PhD,  
Dr. Katia Sotirova

**STYLE CORRECTION,  
GRAPHIC DESIGN:**

Impressive Ltd, Plovdiv  
Phone: +359 889 546 506,  
sotirov.joro@gmail.com

9. **ДИАГНОСТИЧНИ ВЪЗМОЖНОСТИ НА PET СПРЯМО СТ ПРИ СТАДИРАНЕ НА ДЕЦА И ЮНОШИ С ХОДЖКИНОВ ЛИМФОМ**, Л. Чавдарова, Р. Клуге, А. Найденов, Е. Пиперкова  
*DIAGNOSTIC POSSIBILITIES OF PET VS CT IN THE STAGING OF CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH HODGKIN'S LYMPHOMA*, L. Chavdarova, R. Kluge, A. Naydenov, E. Piperkova.....41
10. **БЪБРЕЧЕН КАРЦИНОМ И БОЛЕСТ НА ГОШЕ – ДВЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ, ВЕРОЯТНО ПАТОГЕНЕТИЧНО СВЪРЗАНИ ЧРЕЗ НАМАЛЕНАТА ЕНЗИМНА АКТИВНОСТ НА  $\beta$ -ГЛЮКОЦЕ-РЕБРОЗИДАЗА**, В. Варбанова, И. Гълъбова, И. Амин, В. Иванова, Г. Георгиев  
*RENAL CELL CARCINOMA AND GAUCHER DISEASE - TWO DISEASES PROBABLY PATHOGENETICALLY LINKED BY THE DECREASED ENZYME ACTIVITY OF  $\beta$ -GLUCOCEREBROSIDASE*, V. Varbanova, I. Galabova, I. Amin, V. Ivanova, G. Georgiev.....48
11. **ПРОУЧВАНЕ ЧЕСТОТАТА НА СВЪРЗАНИ С ПРОТИВОТУМОРНО ЛЕЧЕНИЕ МИЕЛОИДНИ НЕОПЛАЗИИ**, И. Ненова, Ж. Грудева-Попова, В. Гръкланов, Е. Спасов, Е. Белева, В. Попов, К. Сотирова, Д. Тумбева  
*ANALYSIS OF THERAPY-RELATED MYELOID NEOPLASIA OCCURRENCE*, I. Nenova, Zh. Grudeva-Popova, V. Graklanov, E. Spasov, E. Beleva, V. Popov, K. Sotirova, D. Tumbeva.....52
- В ПОМОЩ НА КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА/  
SUPPORTING THE CLINICAL PRACTICE**
12. **НАСТОЯЩО И БЪДЕЩО МЯСТО НА PONATINIB ПРИ ЛЕЧЕНИЕТО НА ХРОНИЧНА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ И PH (+) ОСТРА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ**, Joanna Wąclaw Tomasz Sacha  
*CURRENT AND FUTURE PLACE OF PONATINIB IN THE TREATMENT OF CHRONIC MYELOID EUKEMIA AND PH+ ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA*, Joanna Wąclaw Tomasz Sacha. ....58
13. **ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ И БРЕМЕННОСТ**, К. Милчева, Б. Спасов  
*THROMBOCYTOPENIA AND PREGNANCY*, K. Milcheva, B. Spasov.....67
14. **КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА КРИПТОГЕННА СПЛЕНОМЕГАЛИЯ: МУЛТИДИСЦИ ПЛИНАРЕН ПОДХОД, В КОЙТО КЛИНИЧНИЯ ХЕМАТОЛОГ ДИРИЖИРА ДИАГНОСТИЧНИЯ И ТЕРАПЕВТИЧНИЯ АЛГОРИТЪМ**. В. Варбанова.  
*CRYPTOGENIC SPLENOMEGALY WITH SECONDARY THROMBOCYTOPENIA - CLINICAL CASE PRESENTATION*, V. Varbanova .....73
15. **НОВ ИНОВАТИВЕН МЕТОД ЗА БЪРЗ АНАЛИЗ НА МУТАЦИИТЕ В ХЕМОГЛОБИНОВИЯ ГЕН ЗА ПАЦИЕНТИ, СЪМНИТЕЛНИ ЗА НОСИТЕЛСТВА**, В. Йорданова, Т. Черкезов – дм  
*INNOVATIVE METHOD FOR QUICK ASSESSMENT OF MUTATIONS IN THE HEMOGLOBIN GENE WITH PATIENTS SUSPECTED FOR CARRIERS*, V. Yordanova, T. Tcherkeзов .....77

## РОЛЯТА НА NETOSIS В ПАТОФИЗИОЛОГИЯТА НА УСЛОЖНЕНИЯТА ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Шениз Юзеир и Лиана Герчева

УМБАЛ „Св. Марина“, Варна, Клиника по хематология

## PATHOPHYSIOLOGIC ROLE OF NETOSIS FOR COMPLICATIONS IN MALIGNANT TUMORS

Sheniz Yuzeir, MD and Liana Gercheva

University Hospital “St. Marina”, Varna, Hematology Clinic

**Резюме.** През последните години се доказва, че неутрофилите и тромбоцитите са активни участници не само във възпалителните процеси, но и в редица патологични състояния, включително неопластични заболявания и тромбоза. Установено е, че циркулиращите неутрофили активно повлияват процесите на туморогенеза, а заедно с тромбоцитите са независими регулатори на различни събития при инфекциозните и малигнени заболявания. Образоването на комплекси помежду им е основният процес, свързващ възпалението с хемостазата. Доказва се, че тези комплекси съпътстват редица инфекциозни и неопластични заболявания. Само преди няколко години се установи, че неутрофилите имат способността да отделят екстрацелуларни „капани“ (NETs). По този начин те използват както вътреклетъчни, така и извънклетъчни механизми за ограничаване на възпалителните усложнения. В няколко скорошни проучвания е потвърдено значимото увеличаване на NETs при злокачествени заболявания, което показва, че тумор-индуцирана NETosis е клинично значим процес. Тя е елемент на туморната биология като участва в туморната прогресия и ангиогенеза. Неутрофилите и отделените от тях NETs са стимулатори на тромботични процеси при физиологични и патологични състояния. Няколко доклада демонстрират връзката между NETs и тромбоза. Наличието на NETosis служи като потенциален рисков фактор за тромботични усложнения при малигнените заболявания. Този преглед обобщава текущите познания за NETosis, механизмите, водещи до образуване на NETs, включително ролята на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси като регулатори на тумор-индуцирана NETosis при злокачествени заболявания

**Ключови думи:** NETosis, неутрофили, тромбоцити, злокачествени заболявания, инфекции

**Abstract.** During last years, it was proved that neutrophils and platelets are active participants not only in inflammatory processes but in a series of pathological conditions including neoplastic diseases and thrombosis. It is found that circulating neutrophils actively influence the processes of tumorigenesis, and they, together with platelets, are independent regulators of various events at infectious and malignant diseases. Formation of complexes between them is the main process connecting inflammation with haemostasis. It is proved that these complexes accompany a series of infectious and neoplastic diseases. Only a few years ago, it was found that neutrophils are able to release extracellular traps (NETs). In this way, they use both intracellular and extracellular mechanisms for restriction of inflammatory complications. In several recent researches, significant increase of NETs at malignant diseases is confirmed, which shows that tumor-induced NETosis is clinically important process. It is element of tumor biology as it participates in tumor progression and angiogenesis. Neutrophils and NETs released from them are stimulators of thrombotic processes at physiological and pathological conditions. Several reports demonstrate connection between NETs and thrombosis. Presence of NETosis serves as potential risk factor for thrombotic complications at malignant diseases. This review summarizes current knowledge for NETosis, mechanisms leading to NETs formation, including the role of circulating platelet–neutrophil complexes as regulators of tumor-induced NETosis at malignant diseases.

**Key words:** NETosis, neutrophils, thrombocytes, malignant diseases, infections

Една от значимите причини за повишен леталитет при пациентите, страдащи от различни възпалителни и неопластични заболявания е тромбозиранието на артериален или венозен съд с голям капиляр.

През последните години вниманието на изследователските групи се акцентира върху новооткрити функции на неутрофилите, потвърждаващи тяхната значима роля не само като участници във възпалителните процеси, но и при редица патологични състояния, включително неопластичните заболявания и тромботичния процес (1,2).

Неутрофилите като вродени медиатори на имунната защита играят важна роля при различни възпалителни процеси (1). Проучванията върху съдържанието на неутрофилните гранули разкриха богатството на ензими и макромолекули, функциониращи в различните клетъчни отнасяния на гранулоцитите (3). Богатото съдържание на ензими отразява активното участие на неутрофилите в защитните възпалителни реакции спрямо бактерии, фунги и по-малко срещу други инфекции. Тези ензимно медиранни реакции се впускат в действие след мембранна сигнализация от гранулоцитната плазмалема, която притежава адхезивни протеини, рецепторни молекули и йонни канали с помпени механизми (4,5). Някои от рецепторните молекули имат ензимна активност за инактивиране на цитокини/ интерлевкини/ или активиране на интрацелуларни процеси за хемотаксичното придвижване на неутрофилите от циркулацията през ендотелните пори към тъканите (6,7). Известна е способността им да поглъщат патогените и чрез вътреклетъчни фаголизозоми да активират апоптоза.

Въпреки напредъка при изучаването на клетъчната смърт след описанието на апоптозата през 1972г. (8), разкодиранието на пътищата, които водят към нея, продължава да бъде обект на дискусии. Няколко години по-късно стана ясно, че освен механизмите на апоптоза съществуват и други механизми за клетъчна смърт.

През 2004 г. група учени под ръководството на Brinkman (9) доказват, че стимулирането на неутрофилите с интерлевкин 8 (IL8) или липополизахариди (LPS) води до освобождаване на хроматин в извънклетъчното им пространство. Така тези специфични инфламаторни клетки отделят неутрофилни екстрацелуларни капани (NETs), които се образуват основно от декондензирани нуклеозоми и хроматини, извлечени от вътреклетъчните гранули, като например неутрофилна еластаза и миелопероксидаза. По този начин се доказва, че неутрофилите използват както вътреклетъчни, така и извънклетъчни механизми за ограничаване на инфекциите.

Процесът на образуване на NETs се нарича NETosis. Характеризиран е като нова програма за клетъчна смърт, водеща до декондензация на хроматина, последвана от дезинтеграция на клетъч-

ните протеини, лизис на цитоплазмената мембрана и освобождаване на NETs (10). Процесът NETosis е зависим от ензима пептидил аргинин деаминаза-4 (PAD4), който катализира преобразуването на хистон-асоциирани аргининови остатъци в цитрулин. Той се медира посредством преобразуването на имино-групата на аргинин в кето-група, с последваща декондензация на хроматина (11-13). Молекулярните механизми, водещи до образуване на NETs все още остават неясни. Според последни данни отделянето на NETs в извънклетъчното пространство зависи от два важни процеса: генериране на реактивни кислородни видове (ROS) и декондензация на хроматина.

Производството на ROS се осъществява чрез активиране на NADPH оксидазата, както и чрез включване на допълнителни сигнални пътища, които медираат различни форми на NETosis. Активирането на протеин-киназа C води до сглобяване на NOX 2 комплекс във фагозомната мембрана, с последващ електронен транспорт и образуване на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, който е мощен индуктор на генерирането на NETs (10,14).

Вторият процес, водещ до образуване на NETs е декондензацията на хроматина. Интересен факт е, че допълнителното отделяне на липополизахариди показва, че неутрофилната еластаза, съхранявана в азурофилните гранули е етиологичният агент, отговорен за този феномен. След неутрофилното активиране ензимът се премества в клетъчното ядро и разгражда хистоните, особено хистон 4, като ядрените промени и декондензацията на хроматина са пропорционални на нивото на разпадане на хистон 4 (15). Също така се предполага, че другият ензим, който е включен в процеса на образуване на NETs е миелопероксидазата (16).

Важна стъпка при образуването на NETs е епигенетичната модификация на хистоните, т.нар. хистонова цитрулинизация, настъпваща чрез активиране на ензима пептидил-аргинин деаминаза (PAD4). Хистоновата цитрулинизация предотвратява метилирането на хистоните и по-нататъшната транскрипция, при което крайният резултат е декондензация на хроматина (13,17).

Основните съставки на NETs са: ДНК, хистони и протеази, които имат прокоагулантни свойства. Хистоните имат подчертан цитотоксичен ефект върху съдовия ендотел и могат да индуцират тромбоза (18). Серните протеази каквато е неутрофилната еластаза инактивират инхибитора на тъканния фактор и по този начин водят до хиперкоагулация и отлагане на фибрин (19).

В редица публикации е подчертана критичната роля на неутрофилите в процесите на туморогенеза. Като инфламаторни клетки те отделят различни видове цитокини и хемокини, които чрез активация на междуклетъчни взаимодействия и модулиране на имунния отговор оказват влияние върху туморната микросреда (20). В допълнение,

сектерирани от неутрофилите протеази имат специфична роля в регулирането на пролиферацията на туморните клетки, туморната ангиогенеза и процесите на метастазирание. В процеса на освобождаване на NETs са включени различни активиращи цитокини (IL-8, G-CSF, TNF-alpha), миелопероксидаза, неутрофилна еластаза, както и хистоновата цитрулинация (21).

В някои проучвания се подчертава критичната роля на G-CSF, като важен фактор за тумор-индуцираната NETosis. Известно е, че голяма част от туморните клетки произвеждат G-CSF, който индуцира възникването на неутрофилия, като последната е честа находка при малигнените заболявания и обичайно е свързана с лоша прогноза. Неутрофилите чрез отделяне на NETs осигуряват скеле и стимулират процесите на тромбоцитна адхезия и агрегация. Те са в тясна връзка с туморните клетки *in vivo* и вътре в туморната васкулатура, но тяхната роля в туморната биология все още е обект на дискусии.

Тумор-индуцираните неутрофили имат про- и анти-туморен потенциал. От една страна те секретират цитокини, генерират тромбин и инициират положителна обратна връзка за стимулиране на туморния растеж, туморната инвазия и поддържане на туморната ангиогенеза. От друга страна анти-туморният потенциал на неутрофилите се обяснява с директното им цитотоксично взаимодействие с раковите клетки, което стимулира апоптотичното разграждане на туморни клетки чрез анти-яло-зависима клетъчно-медирана цитотоксичност и благоприятства тяхната миграция (22). В редица проучвания е потвърдено, че тумори, експресирани високи нива на G-CSF са мощни индуктори на NETosis (28). Също така цитокинът IL-8, често експресиран от различни туморни клетки, е описан като NETs-индуциращ фактор и наскоро се доказва, че е от решаващо значение за тумор-индуцирана NETosis (29).

NETosis се среща, както при инфекциозни, така и при редица неинфекциозни заболявания. Преди няколко години Nakkim и колегите му демонстрираха, че неговата честота е повишена при аутоимунните заболявания като лупус еритематозес (23). Също неотдавна ролята на NETosis беше описана при захарен диабет. Доказа се, че хипергликемията е причина за засилената честота на активиране на неутрофилите и образуване на NETs (24). Предполага се, че NETs са включени в патогенезата при някои състояния като атеросклероза (25).

Неутрофилите и отделените от тях NETs са важни стимулатори на процесите на тромбозиране при физиологични и патологични състояния. Злокачествените заболявания са рискови фактори за различни видове тромбоза и най-често това се свързва с процесите на хиперкоагулация, както и със засилената способност на активирани неутрофили да образуват NETs. През 19 век Armand Trousseau докладва първите данни за асоциация-

та на рака с тромбозата, по-късно наречен синдром на Trousseau. Следва демонстрация на връзката между NETs и тромбоза, когато Fuchs и колегите му показват, че неутрофилните екстрацелуларни капани осигуряват скеле за активиране на циркулиращите тромбоцити (26). Оттогава NETs се считат за замесени в процесите на тромбоза, свързана с рака, а NETosis е предложен като потенциален таргет за предотвратяване на тромбоцитни усложнения при малигнените заболявания (27). По-високите нива на NETs в кръвта стимулират развитието както на артериални, така и венозни тромби.

Тумор-индуцираните тромбоцити са „критични играчи“ и имат изключително важна роля в процеса на отделяне на NETs. Техните имуномодулиращи ефекти са частично свързани с взаимодействието им с вродените медиатори на имунната система. Хиперактивното състояние на тромбоцитите при злокачествени заболявания се дължи на факта, че много тумори експресират тъканен фактор, което води до образуване на фибрин и активиране на тромбоцитите (30). Повишената им активация води до развитието на тромбоза, но и оказва влияние върху туморогенезата (31). Ето защо се приема, че неутрофилите и тромбоцитите са важни регулатори на тумор-индуцирана NETosis.

Установено е, че при възпалителни процеси и неопластични заболявания броят на активирани неутрофили и тромбоцити се увеличава. Образоването на комплекси между тези клетки е основният механизъм, свързващ хемостазата с възпалителните процеси (32,33). Преди около 50 години феноменът „тромбоцитите, прилепнали към неутрофили“ е описан и формулиран като „тромбоцитен сателитизъм“ (34). Тези комплекси се наблюдават при редица патологични състояния като бронхиална астма, хроничен улцерозен колит, сепсис, ревматоиден артрит и остър коронарен синдром (35-38). През 1975 г. за първи път подобни взаимодействия са наблюдавани при пациенти с рак на простатна жлеза (39). Образованите неутрофилно-тромбоцитни комплекси водят до взаимно активиране, както на тромбоцитите, така и на неутрофилите, заедно с освобождаване на цитокини, експозиция на адхезионни молекули и рецептори върху клетъчната повърхност (32,33). Този процес на сложно взаимодействие се осъществява между адхезионна молекула P-selectin (CD62 P), разположена върху тромбоцитната повърхност и лиганда PSGL-1, намиращ се върху неутрофилите (40). Подчертана е важната роля на взаимодействието между интегрирани рецепторни молекули като Gp1b-IX-V/ GpIIb/IIIa върху тромбоцитите и alpha-M-beta-2 върху неутрофилите, които инициират вътреклетъчната сигнализация (43-46). В редица проучвания се демонстрира, че както активирани неутрофили водят до активиране на тромбоцитите, така и активирани тромбоцити

стимулират засилена синтеза на NETs. Съществуват интересни факти, показващи, че тези циркулиращи неутрофилно-тромбоцитни комплекси образуват т. нар „метастатична ниша“ и засилват процесите на метастазирание (41). Тумор-индуцирана NETosis е промотор на последващите патологични процеси, свързана с развитието и прогресията на рака (42).

В някои от проспективните проучвания са цитирани данни за повишени нива на циркулиращи неутрофилно-тромбоцитни комплекси при пациентите с лимфопрولي-феративни заболявания. Голям интерес представлява корелацията им със стадия на заболяването, клиничното протичане и лечение. Установява се, че пациентите с авансирало заболяване имат по-високи нива на циркулиращи комплекси в кръвта. Процесът на неутрофилна активация, доказана чрез повишена мембранна експресия на CD11b, освобождаване на протеолитични ензими и неутрофилни/тромбоцитни агрегати, допринася за развитието на тромбоза (53).

Химиотерапията е свързана с повишен риск от развитие на тромбоза, но патогенетичните механизми, чрез които цитостатичните средства модулират хемостазата не са напълно изяснени (47). Известно е, че някои от цитостатичните (доксорубин, епирубин и др.), използвани често при лечението както на малигнени хемопатии, така и на солидни тумори индуцират експресия на тъканен фактор (TF) върху раковите клетки, моноцитите и съдовите гладкомускулни влакна (48,51). За изследването на ефектите на химиотерапевтичните средства върху хемостатичния баланс се използва глобален коагулационен анализ, който осигурява добра оценка на про- и антикоагулационната активност на тези клетки. Интересен факт е, че пациентите, третирани с доксорубин и епирубин стимулират експресията на тъканен фактор и повишават тромбиновата генерация в дефибририрана плазма. Прокоагулантният ефект на антрациклините върху ендотелните клетки може да доведе до повишаване на експозицията на фосфатидилсерин чрез активиране на каспазите. Проучени са ефектите им върху активирането и на протеин С (49,50).

В обобщение от проведените *in vitro* проучвания се предполага, че доксорубинът и епирубинът имат най-голям протромботичен потенциал да индуцират прокоагулантен фенотип. Те провокират както процесите на апоптоза, така и на NETosis.

В повечето публикации най-често използван метод за оценка на нивата на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси е флоуцитометричният анализ на венозна кръв (след стимулация на комплексите с ADP или PMA). За да се оцени експресията на CD11b и неутрофилно-тромбоцитните комплекси (CD41, CD45) е използвано конюгираното анти тяло CD62 P (P-Selectin). Като краен резултат е установено, че по-високият % на циркулиращи комплекси в кръвта корелира с по-висок

риск от тромботични усложнения (52).

В заключение може да се подчертае, че неутрофилите и тромбоцитите са ключови регулатори на тумор-индуцираната NETosis. Неутрофилите и образуваните NETs са важни стимулатори на тромботичните процеси. Анализът и оценката на нивата на циркулиращи неутрофилно-тромбоцитни комплекси в кръвта при неопластични заболявания могат да се използват като потенциални предиктори за поява на тромбоза. Използваният флоуцитометричен метод за оценка на взаимодействието между неутрофилите и тромбоцитите води до точни и възпроизводими резултати.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-489. [PubMed]
2. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210(7): 1283-1299. [PMC free article] [PubMed]
3. Stone R: The difficult Problem of Acute myeloid Leukemia in the Older Adult. *Cancer J Clin* 52, 2002, 363
4. Armitage J: Emerging Applications of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 12, 1998, 4491-4508
5. Awanson G, et al: Growth Factor Usage and Outcomes in the Community Setting: Collection Through a Practice-Based Computerized Clinical Information System. *J Clin Oncol* 18(8), 2000, 1764
6. Kuter D, Begley C: Recombinant human thrombopoetin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* 100, 2002, 3457-3469
7. Pamphilon D. Transfusion policy. In *Blood and marrow transplantation*. Ed. Apperly JK, Glickman E, Gratwohl A. European group for blood and marrow transplantation 2000, 120-132
8. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer.* 1972;26(4):239-257. [PMC free article][PubMed]
9. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535. [PubMed]
10. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-241. [PMC free article] [PubMed]
11. Li P, Li M, Lindberg MR, et al. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-1862. [PMC free article] [PubMed]
12. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, et al. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(21):8674-8679. [PMC free article] [PubMed]
13. Wang Y, Li M, Stadler S, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009;184(2):205-213. [PMC free article] [PubMed]
14. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology.* 2007;5(8):577-582. [PubMed]
15. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology.* 2010;191(3):677-691. [PMC free article] [PubMed]
16. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood.* 2011;117(3):953-959. [PMC free article][PubMed]
17. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, et al. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death and Differentiation.* 2011;18(4):581-588. [PMC free article] [PubMed]
18. Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators

- of death in sepsis. *Nat Med.* 2009;15(11):1318–1321. [PMC free article] [PubMed]
19. Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010;16(8):887–896. [PubMed]
  20. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006;6:173–82.
  21. Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, et al. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2007;17:275–87.
  22. Gregory AD, Houghton AM. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res* 2011; 71:2411–6; PMID:21427354; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2583>
  23. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:9813–8.
  24. Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med* 2015;21:815–9. 17.
  25. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015;349:316–20.
  26. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:15880–5.
  27. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancer spread is pose neutrophils to release extracellular DNAttrapthat contribute to cancer
  28. Cedervall J, Zhang Y, Huang H, et al. Neutrophil extracellular traps accumulate in peripheral blood vessels and compromise organ function in tumor-bearing animals. *Cancer Res* (2015) 75: 2653–62. 10.1158/0008-5472. CAN-14-3299 [PubMed][Cross Ref]
  29. Alfaro C, Teijeira A, Onate C, et al. Tumor-produced interleukin-8 attracts human myeloid- derived suppressor cells and elicits extrusion of neutrop extracellular traps (NETs). *Clin Cancer Res* (2016) 22(15) : 3924–36. 10.1158/1078-00432.CCR-15-2463 [PubMed][Cross Ref]
  30. Van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood* (2012) 119:924–32. 10.1182/blood-2011-06-317685 [PubMed] [Cross Ref]
  31. Cedervall J, Olsson AK. Platelet Regulation of Angiogenesis, Tumor Growth and Metastasis. *Tumour Angiogenesis. Rijeka: InTech;* (2012).
  32. Peters, M. J., Dixon, et al. (1999) Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br. J. Haematol.* 106, 391–399. 2.
  33. Huo, Y., Schober, A., Forlow S. B., et al. (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat. Med.* 9, 61–67.
  34. Kjeldsberg CR, Swanson J. Platelet satellitism. *Blood* (1974) 43:831–6. [PubMed]
  35. Bunescu A, Seideman P, Lenkei R, et al. Enhanced Fcγ receptor 1, αMβ2 integrin receptor expression by monocytes and neutrophils in rheumatoid arthritis: interaction with platelets. *J Rheumatol* (2004) 31:2347–55. [PubMed]
  36. Ferroni P, Basili S, Martini F, et al. Soluble P-selectin as a marker of platelet hyperactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Investig Med* (2000) 48:21–7. [PubMed]
  37. Irving PM, Macey MG, Feakins RM, et al. Platelet-leucocyte aggregates form in the mesenteric vasculature in patients with ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* (2008) 20:283–9. 10.1097/MEG.0b013e-3282f246c2 [PubMed] [Cross Ref]
  38. Setianto BY, Hartopo AB, Gharini PP, et al.. Circulating soluble CD40 ligand mediates the interaction between neutrophils and platelets in acute coronary syndrome. *Heart Vessels* (2010) 25:282–7. 10.1007/s00380-009-1199-1 [PubMed] [Cross Ref]
  39. Bauer HM. In-vitro platelet-neutrophil adherence. *Am J Clin Pathol* (1975) 63:824–7. 10.1093/ajcp/63.6.824 [PubMed] [Cross Ref]
  40. Theor'et, J. F., Biennu, J. G., Kumar, et al. (2001) P-Selectin antagonism with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL1g) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 658–664
  41. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:E3053–61. 10.1073/pnas.1411082111 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
  42. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* (2013) 123:3446–58. 10.1172/JCI67484 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
  43. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* (2007) 100:1673–85. 10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab [PubMed] [Cross Ref]
  44. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* (2009) 85:195–204. 10.1189/jlb.0708400 [PubMed] [Cross Ref]
  45. Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, et al. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest* (1994) 94:1243–51. 10.1172/JCI117442 [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
  46. Kuijper PH, Gallardo Tores HI, Lammers JW, et al. Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induce firm adhesion of neutrophils under flow conditions. *Thromb Haemost* (1998) 80:443–8. [PubMed]
  47. McMahon BJ, Kwaan HC. Thrombotic and bleeding complications associated with chemotherapy. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(8):808–817. [PubMed]
  48. Boles JC, Williams JC, Hollingsworth RM, et al. Anthracycline treatment of the human monocytic leukemia cell line THP-1 increase phosphatidyserine exposure and tissue factor activity. *Thromb Res* 2011; doi: 10.1016/j.thrombres.2011.06.022
  49. Muller I, Niethammer D, Bruchelt G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (review). *Int J Mol Med* 1998; 1: 491–4. 31
  50. Santucci L, Mencarelli A, Renga B, et al. Nitric oxide modulates proapoptotic and antiapoptotic properties of chemotherapy agents: the case of NO-pegylated epirubicin. *FASEB J* 2006; 20: 765–
  51. Robert J, Vrignaud P, Nguyen-Ngoc T, et al. Comparative pharmacokinetics and metabolism of doxorubicin and epirubicin in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rep* 1985; 69: 633–40.
  52. Maximilian Mauler et al. Platelet-neutrophil complex formation—a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples 2015 – doi:10.1189/jlb.3TA0315-082R
  53. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2014) 34:1977–84. 10.1161/ATVBAHA.114.304114 [PubMed] [Cross Ref]

## Адрес за кореспонденция

Д-р Шениз Юзеур

Бул. „ Христо Смирненски“ № 1

УМБАЛ „ Св. Марина“, Варна

Онкологичен и пълчетерапевтичен център

Клиника по клинична хематология

Email: shenizyuzeir@abv.bg

## Correspondence address:

Sheniz Yuzeir, MD

University Hospital “St. Marina”

shenizyuzeir@abv.bg

# МУТАЦИИ В CALRETICULIN ГЕНА ПРИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ: БИОЛОГИЯ, ЧЕСТОТА, МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ И КЛИНИЧНА ЗНАЧИМОСТ

Сияна Иванова, Георги Балаценко

Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания,  
Лаборатория по цитогенетика и молекулярна биология

## MUTATIONS IN THE CALRETICULIN GENE IN MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS: BIOLOGY, INCIDENCE, METHODS OF INVESTIGATION AND CLINICAL SIGNIFICANCE

Siana Ivanova, Georgi Balatsenko

National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematology Diseases, Sofia

**Резюме.** Calreticulin (CALR) генът кодира синтез на мултифункционален протеин, локализиран основно в ендоплазматичния ретикулум, участващ в редица процеси в клетката и имащ важна роля в регулацията на пролиферацията, диференциацията и апоптозата. Мутациите в CALR гена са най-честата молекулярна аномалия при пациенти с JAK2 V617F(-) есенциална тромбоцитемия (ЕТ) и първична миелофиброза (ПМФ). Най-често, те са под формата на делеция на 52-бр фрагмент (тип-1) или на инсерция на 5-бр (тип-2) и водят до изместване на рамката на четене в карбоксилния край на гена. Смята се, че мутациите в CALR не само имат ключова роля в патогенезата на ЕТ и ПМФ, но и проявяват изразена асоциация с клиничното им протичане, поради което, CALR мутационният статус се приема като голям диагностичен критерий и за двете заболявания, и се определя като важен прогностичен фактор. Настоящият обзор обобщава наличните данни относно структурата и физиологичните функции на Calr протеина, честотата на CALR мутациите при ЕТ, ПМФ и някои други миелоидни неоплазии, асоциацията между мутационния статус и клиничните и лабораторни особености на пациентите, както и значението на различните форми на мутациите при прогностичното стратифициране на пациентите.

**Ключови думи:** Калретикулин, миелопролиферативни неоплазии, есенциална тромбоцитемия, първична миелофиброза

**Abstract.** Calreticulin (CALR) gene encodes a multifunctional protein, mainly located in the endoplasmic reticulum, but also in the cytosol, nucleus and cellular membrane, which is involved in a number of cellular processes and has an important role in the regulation of cellular proliferation, differentiation, and apoptosis. Structural abnormalities in CALR are the most frequent molecular aberrations in patients with JAK2 V617F(-) essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Most commonly, mutations involve exon 9 as a of 52-base pair (bp) deletion (type-1), or as a 5-bp insertion (type-2) and result in a frameshift in the reading frame for the translation of the carboxyl-terminus of the gene. Currently, CALR gene mutations are considered as a key molecular lesion to the pathogenesis of ET and PMF, associated also with the clinical course of the diseases. Therefore, CALR mutation status is included as a major diagnostic criterion for both diseases in the current classification of myeloid neoplasms. The biomarker is recommended as an important prognostic factor as well. This review summarizes the available data concerning the structure and physiological functions of Calr protein, the frequency of mutations affecting CALR gene in ET, PMF and other myeloid malignancies, the association between CALR mutations and patients' clinical and laboratory characteristics, as well as the impact of different types of mutations on prognostic stratification of patients.

**Key words:** Calreticulin, myeloproliferative neoplasms, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis

### ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години молекулярните изследвания се утвърдиха като неразделна част от комплексния подход за диагностика, класифициране, прогностично стратифициране и мониториране на минималната измерима болест при пациенти с хематологични неоплазии. Спектърът от аномалии,

използвани за тези цели включва: нарушения, засягащи структурата на даден ген: фузионни гени, делеции, инсерции, точкови мутации и аномалии, засягащи функционалната активност на гените под формата на аберантна експресия.

Първата генетична аномалия, специфично асоциирана със злокачествено заболяване при хората е т.н. Филадельфийска хромозома (Ph) – дериват-

ната 22 хромозома, образувана при реципрочната транслокация t(9;22). На молекулярно ниво, транслокацията води до формирането на фузионния ген BCR-ABL1, кодиращ онкопротеин с повишена тирозин-киназна активност. Наличието на Ph и/или BCR-ABL1 дефинира хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) – обособена нозология от групата на миелопролиферативните неоплазии (МПН). Трите други най-чести заболявания от тази група – първична миелофиброза (ПМФ), есенциална тромбоцитемия (ЕТ), и полицитемия вера (ПВ) по дефиниция са отрицателни за BCR-ABL1 пренареждане, като при тях най-честата молекулярна аномалия е мутация в JAK2 гена с най-честа форма – JAK2 V617F. Тя се доказва в около 95% от пациентите с ПВ, и в около 60% – с ЕТ и ПМФ. Освен тази мутация, при ЕТ и ПМФ се срещат и други молекулярни нарушения, между които най-чести и с най-изразена клинична значимост са мутациите, засягащи Calreticulin (CALR) и MPL гените.

### **CALR ГЕН И ПРОТЕИН: СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ.**

CALR генът е разположен на хромозома 19p13.13, обхваща област от 4.2 килобази и съдържа 9 екзона. Генът кодира синтез на калретикулин (Calr) протеин, който е с молекулна маса 46 kDa и е изграден от 417 аминокиселини. Структурата му е представена от 3 домена: N-терминален лектин-свързващ домен, централен P–proline rich domain (P-богат на пролин домен), и C-терминален Ca-binding domain (C-калций-свързващ домен), в който е разположен и KDEL-мотив осигуряващ локализацията в ендоплазмения ретикулум.

Calr е мултифункционален протеин, локализиран основно в ендоплазмения ретикулум, като известни количества от него се срещат и в други клетъчни компартменти – ядро, цитоплазма и клетъчна мембрана. В лумена на ендоплазматичния ретикулум, протеинът изпълнява функциите на шаперон и регулира хомеостазата на калциевите йони. В ядрото се смята, че участва в регулацията на транскрипцията, посредством повлияване на фосфорилиране на  $\beta$ -catenin и нарушаване на Wnt-зависимия сигнален път. N-терминалният фрагмент от протеина, означаван като вазостатин (vasostatin), инхибира ангиогенезата посредством блокиране на пролиферацията на ендотелните клетки, като по този начин вероятно потиска туморната пролиферация. Върху клетъчната мембрана калретикулинът изпълнява функциите на рецептор за TSP-медирана фокална адхезия. Тези му особености му определят неговото важно място в процесите на клетъчната пролиферация, миграция, адхезия, и апоптоза [1].

Многобройни наблюдения подкрепят идеята, че Calr участва в развитието на различни злокачествени заболявания, като ефектът по отношение на туморната поява и прогресия вероятно е зависим

от конкретния клетъчен тип и клиничния стадий. Експресията му върху клетъчната повърхност се смята за инициращ сигнал за фагоцитозата на туморните клетки посредством имунната система, като протеинът вероятно също така участва в туморната пролиферация, ангиогенеза, диференциация и метастазиране.

При хематологичните неоплазии, мутациите в CALR гена са най-честата генетична аномалия при BCR-ABL1(-)/JAK2 V617F(-) МПН – ПМФ и ЕТ.

### **МУТАЦИИ В CALR ПРИ МПН: ВИДОВЕ, МЕТОДИ ЗА ДОКАЗВАНЕ И ЧЕСТОТА НА РАЗПРОСТРАНЕНИЕ**

#### ***Видове мутации в CALR***

Описани са над 50 различни мутации в CALR гена, най-често под формата на инсерции и делеции (означавани като индел-мутации), които по правило засягат екзон 9. Най-честите 2 основни форми на аномалията, срещани се в 80% – 97% от пациентите с CALR мутации, се означават като: Тип-1 мутации – 52-базова делеция (p.L367fs\*46) и Тип-2 мутации – 5-базова инсерция TTGTC (p.K385fs\*47) [2]. При останалите пациенти се доказват индел форми, които също се подразделят като: тип-1–подобни (type 1-like) и тип-2–подобни (type 2-like), а в около 1% от пациентите могат да се наблюдават и точкови мутации (E381A; D7373M и др.). В повечето случаи мутациите се срещат под формата на хетерозиготно носителство, като хомозиготите са много редки и по правило се наблюдават при тип 2 аномалии [3]. Средната стойност на мутационния товар е около 31%, като може да варира в значителна степен при отделните пациенти между 0,5% и 69%. Като цяло, стойностите на мутационния товар са по-изразени при ПМФ спрямо тези, при ЕТ (38±8% спрямо 29±12%).

И двете мутации са от типа frame-shift с изместване на рамката на четене, в резултат на което се синтезира мутантен протеин, чийто C-терминален калций-свързващ домен е с нарушени функции. Освен това мутациите в този регион засягат и KDEL-задържащия мотив, като по този начин се повлиява не само функционалните отнасяния на протеина, но и неговата клетъчна локализация. Понастоящем все още не са изяснени механизмите, посредством които мутантните форми на Calr причиняват мегакариоцитната пролиферация и съответния клиничния фенотип, асоцииран с ЕТ/ПМФ, тъй като се смята, че Calr не участва директно в цитокиновите сигнални каскади, хематопоезата или при определянето на клетъчната съдба. Обсъждат два основни механизма: (1) различия в цитозолната мобилизация на калция при появата на мутантни форми на протеина, като този ефект вероятно е ограничен единствено в мегакариоцитите, и (2) предоставяне на клетките на независимост от тромбопоетин (ТРО), имитирайки последициите от активиращите мутации в MPL гена,

кодиращ синтез на рецептора за TPO, в резултат на директно свързване на Mpl с N-домена на Calr – ефект, който може да се наблюдава единствено при наличие на мутации в C-края, водещ до аутокринна активация на Mpl, димеризация на Jak2 и последващо фосфорилиране на STAT5 и ERK [4].

### **Методи за изследване на мутациите в CALR**

Основните проблеми при доказването на аномалиите в CALR гена са свързани с хетерогенността на индел мутациите и вариациите в относителния дял на клетките, носещи аномалията при отделните пациенти. За доказването на тези нарушения могат да бъдат използвани разнообразни подходи – секвениране по Sanger или посредством технологията на секвениране от следващо поколение (Next Generation Sequencing), високо-разделителен мелтинг анализ [High Resolution Melting Analysis] и полимеразно-верижна реакция [Polymerase Chain Reaction] с последващ фрагментен анализ чрез капиллярна електрофореза, PCR в реално време с използване на Taqman сонди и др. [5]. Практическата приложимост на тези подходи варира в зависимост от наличните технологични възможности и финансови ресурси, тъй като някои подходи изискват специфична апаратура. Отделните методи се различават по способността да се доказват всички форми мутации и да се разграничават конкретните им варианти, чувствителността на анализа и способността да се докажат малко на брой клетки, носещи аномалията, трудоемкостта и времето за провеждането на изследването, и не на последно място – неговата цена.

### **Разпространение**

BCR-ABL-отрицателни МПН. Мутациите в CALR са специфично асоциирани с ПМФ и ЕТ, като честотата на носителство при отделните заболявания варира в широки граници, съответно 17.6% – 35.8% при ПМФ и 12.8% – 30.5% при ЕТ [6]. Причините за тези вариации не са изяснени, но е възможно те да са свързани с методологията, използвана за доказването им и стадия на съответното заболяване, като не може да се изключи напълно и значението на някои етнически и/или географски фактори. По правило, мутациите в CALR гена, както и тези в JAK2 и MPL гените са взаимноизключващи се, на което се основават алгоритмите за поетапното им изследване. Същевременно, макар и рядко мутации в CALR се срещат и в комбинация с мутации в JAK2 гена, както при случаи с ЕТ, така и с МПФ. Честотата на тези случаи варира между 0.6% [6] и 4% [7]. В някои проучвания, CALR(+)/JAK2(+) пациенти се характеризират с по-ниски нива на левкоцити, според други – с нисък JAK2 V617F алелен товар (< 4%) и по-висок тромбоцитен брой при ЕТ. За да се определи клиничната значимост на тази находка се препоръчва, при наличие на финансови възможности, изследването и на трите маркера

при всички пациенти.

При ПМФ отчетливо преобладават тип-1 и сходните ѝ мутации, които представляват 70-83% от CALR-положителните случаи [8]. Интересни са данните от Китай, където в 2 различни проучвания се съобщава обратната тенденция – съответно 40.7% тип-1/тип-1-подобни спрямо 59.3% тип-2, и 32% тип-1 спрямо 64% тип-2 CALR мутации [9]. При ЕТ, също преобладава делеционната форма на мутацията (тип-1), но разликите не са така изразени – 45-57% тип-1 спрямо 39% тип-2 (в 4-16% са наблюдавани други форми на аномалията).

По правило се счита, че мутации в CALR не се срещат при пациенти с ПВ, които в > 97% от случаите са положителни за JAK2 мутации. Същевременно, макар и рядко, са наблюдавани и CALR-мутации(+) пациенти с ПВ. В едно от проучванията при двама пациенти, отрицателни за мутации в JAK2 екзон 12 и екзон 14, както и за мутации в MPL гена, е установена тип-1 мутация в CALR. Смята се, че е възможно да съществува асоциация между мутациите в CALR и отсъствието на мутации в JAK2 при ПВ.

Мутации в CALR се съобщават и при 9.1% от пациентите с неklasифицируеми МПН, както и в отделни случаи при хронична неутрофилна левкемия [10].

### **Други миелоидни неоплазии**

Макар и много рядко, мутации в CALR гена са описани и при BCR-ABL1(+) ХМЛ, включително и при изключително редките варианти на заболяването, при които вместо p210, се доказва p190 BCR-ABL1 пренареждане. И тук, подобно на ЕТ и ПМФ, преобладава 52-базовата делеция. Повод за изследването на други, допълнителни мутации в част от тези пациенти са били персистираща тромбоцитоза или спленомегалия, независимо от постигнатия цитогенетичен и/или молекулярен отговор. Смята се, че в някои от тези случаи двете аномалии се носят от различни клетъчни клонове, въпреки че не може да се изключи и възможността при други, двете аномалии да настъпят в един и същи клон. Някои данни предполагат, че поне при някои пациенти описаната находка е свързана с наличието на 2 различни МПН – BCR-ABL1(+) ХМЛ и CALR-мутации(+) ЕТ или ПМФ. [11]. Съществуването на BCR-ABL1(+)/CALR(+) случаи е важно от клинична гледна точка по отношение на избора на терапевтично поведение и евентуално – необходимостта от комбиниране на тирозин-киназния инхибитор с други, допълнителни препарати.

При миелодиспластични синдроми (МДС) данните за разпространението на мутациите в CALR са противоречиви и варират от пълно отсъствие (0/328) или наличие в редки случаи – 0.6% (2/355), до носителство в 8.3% от пациентите, като по-висока честота е намерена при рефрактерна анемия с ринг сидеробласти и с изразена тромбоцитоза

(13% от 24 пациенти) [12]. Спорадични мутации в CALR са установени и при пациенти с хронична миеломоноцитна левкемия, с честотата 3%.

По отношение на острите миелоидни левкемии (ОМЛ), данните са оскъдни. Аномалията е намечена в около 1% от случаите с *de novo* ОМЛ, като същата честота се съобщава и при ОМЛ след МДС. Смята се, че мутациите в CALR са по-чести при вторични ОМЛ след трансформация на предхождаща МПН. Съобщават се и 2 случая на В остра лимфобластна левкемия при пациенти CALR(+) МПН, които повдигат въпроса доколко в тези случаи се касае за последователна поява на второ малигнено заболяване или необичайна прогресия на първичното заболяване.

### **КЛИНИЧНА ЗНАЧИМОСТ НА МУТАЦИИТЕ В CALR ПРИ МПН**

#### ***Диагностични значимост***

Наличието на мутации в CALR е един от големите диагностични критерии за ЕТ и ПМФ (както за ранната пре-фибротична фаза на заболяването, така и за разгънатата фибротична фаза), съгласно последната ревизия на класификацията на миелоидните неоплазии на Световната здравна организация [13]. Включването на CALR мутационния статус, подобно на този на мутациите в JAK2 и MPL, като диагностичен критерий, независимо, че аномалиите не са патогномонични за конкретно заболяване, се основава на факта, че наличието, на което и да е от тези нарушения подкрепя клоналния характер на клетъчната пролиферация, като по този начин се изключва вероятността установените хематологични нарушения да имат реактивен характер.

#### ***Асоциация на CALR мутационния статус с клинични и лабораторни особености***

Многобройни публикации демонстрират връзката между CALR мутационния статус и редица клинични и лабораторни особености. При ЕТ наличието на мутации в CALR, в сравнение с JAK2 V617F(+) ЕТ, е асоциирано с по-висок тромбоцитен брой, по-нисък левкоцитен брой, по-ниски стойности на хемоглобина, по-млада възраст, преобладаване на мъжкия пол и отсъствие на полицитемична трансформация [14]. Установява се също така, и по-висок медианен брой на мегакариоцитите в костния мозък, синусоидална хиперплазия, гъсти клъстери от мегакариоцити и ретикулинова фиброза, като в 11% от случаите наблюдаваните промени покриват критериите на СЗО за пре-фибротична ПМФ. Независимо от тези промени, рискът от тромботични усложнения е по-нисък при носителство на CALR мутации. Вероятна причина за това са характерният профил на генна експресия, който се различава от този, при JAK2 V617F(+) ЕТ, и съответно – на диференцирано-активира-

ните сигнални пътища в прогениторните клетки, поради потиснатата експресия на гени, участващи ДНК-репарирването, хроматиновото ремоделиране, хроматидната кохезия. Най-нисък риск от тромбози се наблюдава при пациенти с потиснат експресия на гени, участващи в тромбин-асоциираните сигнални каскади и активирането на тромбоцитите [15]. Някои наблюдения предполагат, че пациенти с ЕТ, които носят мутации в CALR имат по-голяма вероятност да развият миелофиброза спрямо тези, които носят само нормални алели. Същевременно, от практическа гледна точка е от значение не само наличието или отсъствието на CALR мутации, но и конкретната им форма. Така например, асоциация с мъжкия пол се наблюдава единствено по отношение на тип-1 мутации, докато по-младата възраст – по отношение на тип-2. Тромбоцитният брой е значимо по-висок при тип-2 спрямо този, при тип-1 [16]. Според някои автори, при ЕТ асоциацията между мутационния статус и клиничните и лабораторни особености е зависима също така и от степента на мутационния товар – по-ниските нива на хемоглобина, по-високите нива на LDH и по-висока честота на миелофибротична трансформация се наблюдава при пациенти, чиито мутационен товар надхвърля медианната стойност, като най-висок товар се доказва при пациенти със спленомегалия към диагнозата.

При ПМФ, пациентите, носещи CALR мутации са значимо по-млади, имат по-нисък левкоцитен брой, по-висок тромбоцитен брой, по-нисък International Prognostic Scoring System (IPSS) скор, по-дълга преживяемост, свободна от изразена спленомегалия спрямо останалите [17], и по-ниска честота на сплайсозомни мутации. Нивото на хемоглобина по правило е по-високо, поради което е по-малко вероятно пациентите да имат анемия или да изискват хемотрансфузии. В групата CALR(+) пациенти не се съобщават значими различия в клиничните и лабораторни показатели, свързани с конкретната форма на мутацията. Същевременно, съпоставени с тези, носещи JAK2 V617F мутации, пациентите с тип-1 нарушения са по-млади и с по-висок процент циркулиращи CD34(+) клетки. Мутационният товар е от значение и при ПМФ, като по-високите нива са асоциирани с разгънатата фибротична фаза. Пациенти със стойности > 70% на мутантния CALR алел в миелоидните клетки, имат значително по-дълъг период от време от диагнозата, по-изразена фиброза в костния мозък и по-ниски нива на хемоглобин. [18]

#### ***Прогностична значимост***

Редица проучвания показват, че носителството на мутации в CALR гена е асоциирано с прогностична значимост. Смята се, че наличието на CALR мутации при пациенти с МПП се свързва с по-благоприятна прогноза, сравнено с тези, които са JAK2 V617F(+) или при които и трите гена са интактни

[JAK2(-)/CALR(-)/MPL(-)]. Според някои автори при интерпретацията на резултатите трябва да се има предвид не само наличието или отсъствието на мутации, но и конкретната им форма.

От трите BCR-ABL1(-) МПН, ЕТ е с най-добра прогноза и със средна преживяемост от около 20 години. При ЕТ носителството на CALR мутации е асоциирано с по-нисък риск от тромбози спрямо JAK2 V617F(+) пациенти [19] и по-добра обща преживяемост. Смята се, че при пациентите с ЕТ, които носят CALR мутации, се наблюдава по-нисък риск от миелофибротична трансформация спрямо тези, при носителство на JAK2 V617F, а при настъпила трансформация, вероятността за развитието на остра левкемия е много малка. Прогресията на ЕТ в ПВ при наличие на мутации в CALR гена е необичайна или даже невъзможна. Някои автори съобщават, че по-ниският риск от тромбози се наблюдава единствено при пациенти с тип-2 CALR мутации, но не и при JAK2 V617F или тип-1 мутации в CALR, без обаче да има разлика по отношение на общата преживяемост между трите групи пациенти [20]. Като цяло, пациентите с ЕТ, носещи мутации в CALR се класифицират в групата с по-нисък риск, както при стандартната прогностична стратификация за тромботични усложнения (възраст над 60 години и предхождащи тромбози), така и при използването на International Prognostic System in Essential Thrombocythemia (IPSET) за прецизиране на преживяемостта. Наличието на мутации в CALR има и предиктивно значение за терапевтичния отговор. Така например, прилагането на Interferon- $\alpha$  при пациенти с ЕТ, положителни за мутации в CALR, води до постигане в значителен дял от случаите на хематологичен и молекулярен отговор, изразяващ се с намаление на мутационния товар, което не се наблюдава при използване на Hydroxyurea или Aspirin. Същевременно трябва да се има предвид, че наличието на някои други, допълнителни генетични аномалии може да повлияе отговора към терапията.

### **Първична миелофиброза**

От всички BCR-ABL1(-) МПН, ПМФ се характеризира с най-неблагоприятна прогноза и с най-кратка медианна преживяемост от 69 месеца, като при отделните болни тя може да варира в значителна степен от агресивно протичане с фатален край в рамките на 2-3 години от диагнозата до протрахирано "доброкачествено" протичане в продължение над 10 години. Като цяло, прогнозата при ПМФ зависи от стадия, в който заболяването е диагностицирано и съответната рискова група, към която е стратифициран съответният пациент, определена въз основа на някои от прилаганите прогностични скорови системи. При пациенти, диагностицирани в префибротична фаза на ПМФ общата преживяемост на 10-та и 15-та година е съответно 72% и 59%, докато при тези, диагностицирани в разгънатата, фибротична фаза – медианната преживяе-

мост е едва 3-7 години. Понастоящем в рутинната практика прогностичното стратифициране на болните в групи с различен риск се основава на прилагането на различни прогностични модели, от които с най-широко приложение е DIPSS (Dynamic International Prognostic Scoring System) Plus системата, при която въз основа на съвкупност от различни неблагоприятни прогностични фактори, асоциирани със скъсена преживяемост [възраст (> 65 години), стойности на хемоглобина (< 100 g/L), левкоцитен брой (> 25 $\times$ 10<sup>9</sup>/L), циркулиращи бласти в периферната кръв ( $\geq$ 1%), наличие на конституционални симптоми, промени в кариотипа, брой на тромбоцитите (< 100 $\times$ 10<sup>9</sup>/L) и трансфузионната зависимост, пациентите се разделят на групи с нисък, интермедиерен 1, интермедиерен 2 и висок риск, съответно с медианна преживяемост от 185, 78, 35, и 16 месеца [21]. Независимо от практическата значимост на прогностичните модели, наличието на някои мутации позволява допълнително прецизиране на риска. За разлика от JAK2 V617F мутационния статус, въз основа на който не се обособява отделна прогностична група, CALR-мутационният статус има непосредствена прогностична значимост и е асоцииран с благоприятна прогноза и удължена преживяемост, която е независима от DIPSS-plus скората. Така например, Klampfl et al. (2013) съобщават, че най-дълга обща преживяемост се наблюдава при пациенти, носещи мутации в CALR – 21.4 години, спрямо 11 години при носителство на JAK2 V617F, и 8.2 години – при наличие на MPL мутации [22]. Сходни са данните и на Rumi et al. (2014), според които CALR мутациите също са асоциирани с благоприятна прогноза и средна преживяемост от 17.7 години, спрямо съответно 9.2 години – при пациенти с JAK2 V617F, 9.1 години – пациенти с MPL мутации и едва 3.2 години, при тези, които не се установява нито една от описаните мутации (тройно негативни) [17]. От друга страна, и при ПМФ значение за прогнозата има конкретната форма на мутацията, засягаща CALR гена. Редица проучвания подкрепят идеята, че по-добрата обща преживяемост е асоциирана единствено с тип-1 и сходни мутации [2]. Така например, медианната обща преживяемост при пациенти с тип-2 и подобни мутации е 3.5 години, която е статистически по кратка от тази, при пациенти с тип-1 и подобни – 13.7 години [23]. Еднопосочни са данните и на Guglielmelli et al. (2015), според които медианната преживяемост при пациенти с ПМФ, носещи мутации тип-1 и подобни е 26.4 години, спрямо съответно 7.4 и 7.2 години, при пациенти носещи тип-2 и подобни и JAK2 V617F [24]. Според Li et al. (2014), преживяемостта при тип-2 мутации в CALR е сходна с тази, при тройно-негативните пациенти, поради което и двете състояния трябва да се приемат като независими фактори, асоциирани с неблагоприятна прогноза [9]. Тези данни са основание, CALR мутационният статус да бъде включен в разработените нови прогностични скорингови системи при

ПМФ. Интегрираните MIPSS70 (Mutation-Enhanced International Prognostic Score System) и MIPSS70-plus прогностични скорови системи за пациенти с ПМФ в трансплантационна възраст (съответно без и със информация за промените в кариотипа) включват добре познатите клинични фактори (хемоглобин, тромбоцитен брой, левкоцитен брой, процент циркулиращи бласти, наличие на конституционални симптоми и степен на фиброза в костния мозък), в съчетание с генетични фактори, асоциирани със скъсена преживяемост (неблагоприятен кариотип, отсъствие на тип-1 и подобни мутации в CALR гена, и наличие на някои други, високо-рискови мутации, засягащи ASXL1, SRSF2, EZH2, и IDH1/2 гените) [25]. За разлика от нея, GIPSS (Genetically Inspired Prognostic Scoring System) системата е базирана изцяло на генетични фактори и включва наличие хромозомни аберации, асоциирани с неблагоприятна прогностична стойност, отсъствие на тип-1 и подобни мутации в CALR, и наличие на мутации в ASXL1, SRSF2, или U2AF1Q157 гените [Tefferi et al., 2018].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутациите в CALR гена са най-честата молекулярна аномалия при пациенти с JAK2 V617F(-) ET и ПМФ. Мутациите се разделят на тип-1/тип-1-подобни (делеции), тип-2/тип-2-подобни и други, които са значително по-редки. Наличието на аномалиите е основен диагностичен критерий и за двете заболявания, и се наблюдават изразени асоциации между CALR-мутационния статус и редица клинични и лабораторни особености на пациентите. Същевременно, CALR-мутационният статус има и важно предиктивно и прогностично значение, като редица наблюдения предполагат, че от практическа значимост е важно не само наличието или отсъствието на аномалията, но и конкретната ѝ форма. Всичко това обуславя изразената клинична значимост на изследването на аномалията в рутинната практика.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Stanley RF, Steidl U. Molecular Mechanism of Mutant CALR-Mediated Transformation. *Cancer Discov.* 2016;6(4):344-6.
2. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2016;30(2):431-8.
3. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2391-2405.
4. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2017;102(1):7-17.
5. Jones AV, Ward D, Lyon M, et al. Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res.* 2015;39(1):82-7.
6. Lin Y, Liu E, Sun Q, et al. The Prevalence of JAK2, MPL, and CALR Mutations in Chinese Patients With BCR-ABL1-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2015;144(1):165-71.
7. Usseglio F, Beauvais N, Calleja A, et al. Detection of CALR and MPL Mutations in Low Allelic Burden JAK2 V617F Essential Thrombocythemia.

- J Mol Diagn.* 2017;19(1):92-98.
8. Tefferi A, Guglielmelli P, Pardanani A, et al. Myelofibrosis Treatment Algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018;8(8):72.
9. Li B, Xu J, Wang J, Gale RP, Xu Z, Cui Y, et al. Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Haematologica.* 2014; 99(11):1697-700.
10. Cui Y, Li B, Gale RP, et al., CSF3R, SETBP1 and CALR mutations in chronic neutrophilic leukemia. *J Hematol Oncol.* 2014;7:77.
11. Seghatoleslami M, Ketabchi N, Ordo A, et al. Coexistence of p190 BCR/ABL Transcript and CALR 52-bp Deletion in Chronic Myeloid Leukemia Blast Crisis: A Case Report. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2016;8(1):e2016002.
12. Malcovati L, Rumi E, Cazzola M. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica.* 2014; 99(11): 1650-2.
13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-405.
14. Misawa K, Yasuda H, Araki M, et al., Mutational subtypes of JAK2 and CALR correlate with different clinical features in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol.* 2018;107(6):673-680.
15. Zini R, Guglielmelli P, Pietra D, et al., CALR mutational status identifies different disease subtypes of essential thrombocythemia showing distinct expression profiles. *Blood Cancer J.* 2017;7(12):638.
16. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol.* 2014;89(8):E121-4.
17. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood.* 2014; 124(7):1062-9.
18. Oh Y, Song IC, Kim J, et al. Pyrosequencing-based quantitative measurement of CALR mutation allele burdens and their clinical implications in patients with myeloproliferative neoplasms. *Clin Chim Acta.* 2018;483:183-191
19. Saki N, Shirzad R, Rahim F, Saki Malehi A. Estimation of diagnosis and prognosis in ET by assessment of CALR and JAK2 V617F mutations and laboratory findings: a meta-analysis. *Clin Transl Oncol.* 2017;19(7):874-883.
20. Helbig G. Classical Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: focus on mutations and JAK2 inhibitors. *Med Oncol.* 2018;35(9):119.
21. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol.* 2011; 29(4):392-7.
22. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al., Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013 Dec 19;369(25):2379-90.
23. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, et al., The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood.* 2014. 124:2465-2466.
24. Guglielmelli P, Rotunno G, Fanelli T, et al., Validation of the differential prognostic impact of type 1/type 1-like versus type 2/type 2-like CALR mutations in myelofibrosis. *Blood Cancer J.* 2015;5:e360.
25. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol.* 2018;36(4):310-318
26. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2018;32(7):1631-1642.

## Адрес за кореспонденция

Сияна Иванова

Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания

ул. Пловдивско поле №6

София, п.к. 1756

Тел. 20 45 42 132

# ИМУНОЛОГИЧНИ ПРОМЕНИ ПРИ ЕКСТРАКОРПОРАЛНА ФОТОФЕРЕЗА

*Иван Митков, Станислав Симеонов, Иван Тонев, Милчо Минчев*

*Трансплантационно отделение, Клиника по хематология, СБАЛХЗ*

## IMMUNOLOGICAL CHANGES AFTER EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS

*Ivan Mitkov, Stanislav Simeonov, Ivan Tonev, Milcho Mincheff*

*Transplantation Ward, National Hematology Hospital. Sofia*

---

**Резюме.** *Екстракорпоралната фотофереза е нов метод за лечение на аутоимунни заболявания, на реакцията на присадения графт срещу приемателя след алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки и на отхвърляне на трансплантирани солидни органи като бял дроб, сърце и др. Смята се, че в основата на механизма на действие на този терапевтичен метод стои индуцирането на апоптоза в имунните клетки на дарителя (при трансплантация на стволови хемопоеични клетки) или на приемателя при солидни трансплантати. Това води до промяна на цитокиновата секреция при имунна стимулация, както и до увеличаване на количеството на популация от специализирани супресорни Т лимфоцити, добили гражданственост като Т-регулаторни клетки, характеризирани се с флоу-цитометрична характеристика CD4+CD25+ FoxP3+.*

**Abstract.** *Extracorporeal photopheresis is a new method for treatment of autoimmune diseases, graft-versus-Host Disease (GvHD) following hemopoietic stem cell transplants and for rejection of solid transplants such as lungs, heart etc. Apoptosis induction of donor (stem cell transplants) or recipient (solid transplants) immune cells, changes in the cytokine profile after immune stimulation, combined with an increase of T regulatory (CD4+CD25+FoxP3+) cells is the basic mechanism of this therapeutical approach.*

---

### **Екстракорпоралната фототерапия (Extracorporeal Phototherapy, ECP)**

или **фотофереза** е имуномодулираща клетъчна терапия разработена от Edelson през 1986 г. [1] и първоначално е използвана за лечение на кожен Т-клетъчен лимфом (Cutaneous T-Cell Lymphoma, CTCL). Доказаната ефикасност и безопасност на тази терапия са оправдавали нейното повсеместно приложение.

Всяка ECP процедура се състои от 3 стъпки: (1) Събиране на мононуклеарни клетки (Mononuclear cells, MNCs) от пациента; (2) Облъчване на MNCs с UVA светлина в присъствието на 8-метокси псорален (8-Methoxy Psoralen, 8-MOP); (3) вливане на получените фотомодифицирани клетки в пациента.

В днешно време ECP се използва успешно за лечение на някои аутоимунни Т-клетъчно медирирани заболявания като *remphigus vulgaris* [2, 3], системна склероза [4, 5], ревматоиден артрит [6, 7], болест на Крон [8, 9] и множествена склероза [10]. ECP се прилага и като допълващо лечение при отхвърляне на сърдечни, белодробни и чернодробни алографти [11-15], както и при остра или хронична болест на присадката срещу приемателя

(Graft-versus-Host Disease, GvHD) след алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки, неповлияваща се от конвенционалното лечение с кортикостероиди и имunosупресори [16-22].

Въпреки многото научни съобщения за клиничните ползи от ECP, все още не са напълно изяснени механизмите на действие на тази терапия.

### **Апоптозата – основен механизъм на действие на екстракорпоралната фотофереза**

Основният механизъм на действие на ECP е индуцирането на апоптоза. В условията на екстракорпоралната фотофереза (облъчване на клетките с 2 J/cm<sup>2</sup> UVA след добавяне на 200 ng/mL 8-MOP), клетъчната пролиферация се възпрепятства, като се предизвиква апоптоза на облъчените клетки. Тестовите за виталност (Трипаново синьо, 7-AAD) показват, че след ECP ранните апоптотични клетки изглеждат интактни и витални. Характеризират се със запазена способност да стимулират лимфоцитите при смесена лимфоцитна реакция (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR). Късните апоптотични клетки могат да провокират имунна реакция и възпаление [23]. В ранните етапи на апоптозата

се нарушава асиметрията на мембранните липиди чрез поява на фосфатидилсерин от външната страна на клетъчната мембрана. Нарушава се съотношението Vcl-2/Вах върху външния слой на митохондриалната мембрана, което води до освобождаване на цитохром С и ROS и задвижване на апоптотичната каскада.

Лимфоцитната апоптоза възниква няколко часа след третиране и достига пик на третия ден след процедурата. По време на активен имунен отговор при GvHD, при отхвърляне на алогографти и при аутоимунни заболявания, стимулираните Т-клетъчни клонове са по-чувствителни към УВ-облъчване. Това би могло да обясни причината селективно да се потиска патологичният имунен отговор (отхвърляне на присадката или GvHD след ЕСР). Вливането на интактни ранни апоптотични клетки в отсъствието на каквито и да било про-възпалителни цитокини води до индуциране на толерантност посредством общо неспецифично отслабване на имунния отговор.

Съществуват противоречиви данни относно чувствителността на моноцитите към програмираната клетъчна смърт след фотофереза. Двадесет и четири часа след ЕСР терапия на пациенти с CTCL, апоптоза претърпява само лимфоцитната популация, включително клетките на Sézary, но не и моноцитите (CD14+CD45+) [24]. Тъй като моноцитите не пролиферират, тяхната апоптоза вследствие на ЕСР е по-забавена. При пациенти с GvHD, апоптоза на моноцитите настъпва 48 часа след ЕСР [25]. При експерименти с животни [26] е открито, че в първия ден след ЕСР само 20% от моноцитите са апоптотични, като на шестия ден такива са 80%. Непосредствено след облъчване фотоманипулираните моноцити запазват капацитета за ендоцитоза, възможността си към диференциация във функционални дендритни клетки и способността до стимулират на Т лимфоцити, като е нарушена способността им за миграция.

Идеята за използване на апоптотични клетки с цел защита от отхвърляне на трансплантирани органи е широко застъпена. Вливането на донорни апоптотични левкоцити представя на антиген-представящите клетки (Antigen-Presenting Cells, APCs) на реципиента целия репертоар от донорски ало-антигени и имунорегулаторни сигнали, което индуцира донор-специфичен толеранс при трансплантираните пациенти [27].

### **Цитокинов профил и дендритни клетки**

ЕСР модулира процесите в различни етапи на имунния отговор. От една страна, вливането на апоптотични клетки в пациента води до промяна на цитокиновия профил след имунно стимулиране. Ранните апоптотични клетки предизвикват намаляване секрецията на про-възпалителните цитокини IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-12p70 и TNF-α, до-

като секрецията на имunosупресивните TGF-β1 и IL-10 остава нормална или се повишава [28, 29]. От друга страна, влетите апоптотични клетки имат активен потискащ ефект върху функцията на дендритните клетки (DCs). След фагоцитоза на апоптотични клетки, DCs остават незрели, като не се откриват маркери на съзряване (CD40, CD80, CD86 и CD83), а това намалява способността им да стимулират Т-клетъчен отговор.

### **Цитокинов профил на пациенти с GvHD след екстракорпорална фотофереза**

Добре известно е, че за възникване на GvHD антиген-представящите клетки (APCs) на приемателя стимулират дарителските Т-лимфоцити и инактивирането им би предотвратило това следтрансплантационно усложнение [30].

При фотофереза на 10 пациенти с хроничен GvHD се открива [44] връзка между клиничния отговор към ЕСР и повишаване на нивото на CD3-/CD56(+) NK-клетки в периферията, нормализиране на отношението CD4/CD8, намаляване на циркулиращите DCs и редуциране на Т-клетъчната пролиферация (автоложна и алогенна). Имунният отговор се измества от Th1 към Th2, а дендритните клетки от тип 1 си променят в тип 2. Синтезът на про-възпалителните цитокини (IL-1 и TNF-α) се потиска чрез засилване секрецията на Th2 цитокини [31]. Разширяването на Th2 клоновете и увеличаване на Th2 цитокините (IL-4 и IL-10) има отрицателен ефект върху Th1 диференциацията и спира цитотоксичния имунен отговор при GvHD.

Облъчените с фотофереза левкоцити имат повишена секреция на HLA-G, които потискат Т-клетъчния имунитет [32]. След среща с апоптотични клетки, дендритните клетки освобождават азотен оксид, който потиска Т-клетъчния отговор [33]. Апоптотичните клетки биха могли да упражняват имunosупресивното си действие и чрез генериране на CD19+ регулаторни В-клетки, които повлияват функцията на Т-клетките [34]. Ко-култивирането на фотоферезно модифицирани спленоцити и миелоидни дендритни клетки води до повишаване секрецията на IL-10 в условия на стимулация с липополизахардиди (LPS) [35]. Незрели дендритни клетки от моноцити на пациенти с GvHD, култивирани с фотоманипулирани лимфоцити, показват ниска експресия на CD54, CD40 и CD86 при запазена експресия на HLA-DR и CD80 след стимулация с LPS. Тези дендритни клетки са с повишена секреция на IL-10 при запазени нива на IL-12 и TNF-α. Това предполага, че инжектирането на голям брой автоложни апоптотични клетки потиска експресията на част от ко-стимулаторните молекули върху дендритните клетки, като индуцира диференциацията на непълно зрели дендритни клетки с повишен синтез на IL-10 без напълно изявен Th-2 отговор [36].

### **Цитокинов профил на пациенти с CTCL и синдром на Sèzary след екстракорпорална фотофереза**

Механизмът на действие на ЕСР при CTCL е спорен. В повечето случаи става въпрос за засилване на имунния отговор, но при сравняване нивата на FoxP3+ Tregs през 6-месечен курс на фотофереза на пациенти с CTCL и GvHD, Rao и колектив откриват, че при пациентите с CTCL се наблюдават повече регулаторни клетки (Tregs), отколкото при тези с GVHDGvHD. Освен това, нивото на TGF- $\beta$  е завишено и при двете групи пациенти, като три пъти по-високи стойности на TGF- $\beta$  имат пациентите с GVHDGvHD, в сравнение с тези с CTCL [37]. Фактът, че при CTCL се наблюдава повишена синтеза на Th2 цитокини (IL-4, IL-5), а има дефицит в Th1 цитокините (IL-2, IFN- $\gamma$  и IL-12) предполага, че малигнените CD4+ клетки са Th2 клетки. Резултати от *in vitro* изследвания показват, че IFN- $\alpha$  вероятно потиска абнормния синтез на IL-4 и IL-5, а IL-12 коригира недостатъчния синтез на IFN- $\gamma$  и клетъчно-медираната цитотоксичност. IFN- $\gamma$  и IL-12 значително потискат развитието на CD4+ малигнените клетки [38]. Di Renzo и колектив [39] в свое изследване демонстрират възстановяване на баланса между Th1 и Th2 клетките след фотофереза. В сравнение със здравите контроли при 8 пациенти с CTCL, стимулацията на периферните моноцити с фитохемаглутинин (PHA) преди курса на фотофереза води до високи нива на IL-4 и ниски нива на IFN- $\gamma$ . Наблюдава се и понижен синтез на IL-12 под действието на LPS. Една година след провеждане на фотоферезата не се отчитат разлики в нивата на IL-4, IFN- $\gamma$  и IL-12 между пациентите и здрави контроли.

Няколко ретроспективни изследвания показват, че ЕСР удължава живота на пациенти страдащи от синдрома на Sèzary, но ретроспективно изследване сравняващо средната преживяемост на пациенти, лекувани с конвенционална терапия, и пациенти, лекувани с ЕСР, не отчита значително подобрение [40]. При едно изследване с 23 пациента, лекувани само с фотофереза (в 2 последователни дни всеки месец в продължение на година), се наблюдава подобрене на кожата изява в корелация с намаляване на клетките на Sèzary. Това изследване доказва, че намаляването на CD74, CD8 и клетките на Sèzary е в резултат от лимфоцитната апоптоза [41].

Моноцити на пациенти със CTCL или на здрави дарители, изолирани ден след фотофереза, се диференцират в дендритни клетки след култивиране без добавяне на растежни фактори. Тези дендритни клетки са способни да обработват и представят екзогенни и ендогенни антигени, както и да узряват под влиянието на ко-стимулаторни повърхностни молекули [42]. На това се основава концепцията за транс-имунизацията, нова форма на имунотерапия, предложена като лечение на рефрактерен CTCL. При тази техника клетките на

Sèzary се инкубират за една нощ в сака с дендритни клетки, произхождащи от фотомодулирани моноцити. Фагоцитозата на апоптотичните клетки на Sèzary от незрелите дендритни клетки в присъствието на възпалителни цитокини води до узряването на дендритните клетки до потентни антиген-представящи клетки [43]. Така натоварените с антигени моноцит-произхождащи дендритни клетки след това се вливат на пациента, от който са получени.

### **Роля на T-регулаторните клетки (T-regs)**

Няколко изследвания демонстрират, че естествено откриващите се Tregs играят ключова роля в поддържането на автотолерантността и потискането на различни имунни отговори, поради което в миналото T-регулаторните клетки са по-известни като T-супресорни.

Механизмът на регулация от T-regs е активен процес, при който една популация от клетки контролира активирането на друга популация. Множество изследвания сочат, че CD4+CD25+ T-regs предотвратяват активацията на автореактивните T-клетки и автоимунните заболявания. Едновременното присъствие на CD4 и CD25 ( $\alpha$  верига на рецептора на IL-2) не е достатъчно за идентифициране на супресорната субпопулация, защото една фракция от активираните CD4+ T-клетки (20–40%) имат временна интермедиерна експресия на CD25 (CD25int), без да са супресори. Само една малка популация (0.8–1%) клетки, експресиращи CD25 (CD25hi) са всъщност T-regs [44]. Друг маркер, подходящ за доказването на T-regs е Foxp3 (80% от Foxp3+ клетките са T-regs). Супресорната активност на T-regs зависи от стимулирането на техния T-клетъчен рецептор (TCR), който е антиген зависим. T-regs регулират синтеза на цитокини и потискат CD8+ клетките, дендритните клетки, В-клетките и NK клетките. При пациенти с ревматоиден артрит (при които T-regs имат ограничен капацитет за контрол върху синтеза на TNF- $\alpha$ ) ЕСР би могла да повиши ефикасността на T-regs. Подобен сценарий би могъл да се наблюдава и при пациенти с множествена склероза [45]. Добре известна е и ролята на T-regs при костно-мозъчните трансплантации. Изследвания показват значително повишаване на T-regs след курсове екстракорпорална фотофереза като лечение на GvHD при пациенти след алогенна стволно-клетъчна трансплантация [46]. При моделни животни е установено, че обогатяването на графта с донорни T-regs потиска развитието на GvHD и подобрява дългосрочната преживяемост [47]. При сравняване нивата и функциите на T-regs (CD4+CD25+FoxP3+) при здрави хора и при пациенти с GvHD – преди и след ЕСР, група автори наблюдават повишаване на CD4+CD25+FoxP3+ супресорни T-regs в периферната кръв след ЕСР, но тези T-regs никога не достигат супресорна ак-

тивност, съизмерима със супресорните T-regs на здравите контроли [48]. При *in vitro* супресорни изследвания, ЕСР стимулира CD39-медиран синтез на аденозин в T-regs, което води до значително редуциране на T-клетъчната пролиферация. Увеличен брой T-regs след ЕСР се наблюдава и при лечение на други заболявания, включително и при пациенти след трансплантация на бял дроб [49].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Екстракорпоралната фотофереза се превръща от иновативно в стандартно лечение на редица заболявания, главно като имуномодулираща терапия при отхвърляне на алографти – хемопоетични стволови клетки и трансплантирани солидни органи (сърце, бял дроб). Фотомодифицираните клетки, подлежащи на апоптоза, при едни заболявания (например СТCL) водят до засилване на имунния отговор, докато при други – до потискане на доминиращия отговор и изграждане на имуно-толерантност. Въпреки успешното приложение на тази терапия, все още не е напълно изяснен механизъмът на нейното действие, но вече е известно, че централна роля за благоприятния ефект на фотоферезата имат T-регулаторните клетки. Необходимо са повече изследвания, особено в по-големи кохорти пациенти, за оценка на ефекта на екстракорпоралната фотоферезавърху лимфоцитните субпопулации на пациентите с цел усъвършенстване на лечението. При мониториране на клиничния ефект на екстракорпоралната фотофереза и корелирането ѝ с подходящи лабораторни показатели е уместно преди и след третиране да се следят промени в интрацелуларния цитокинов профил на *in vitro* стимулирани лимфомононуклеарни клетки от пациента, както и промени в нивата на Foxp3+ T-регулаторни клетки.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

[1] R. Edelson et al., "Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma by Extracorporeal Photochemotherapy," *N. Engl. J. Med.*, vol. 316, no. 6, pp. 297–303, Feb. 1987.

[2] A. H. Rook et al., "Extracorporeal photochemotherapy for drug-resistant pemphigus vulgaris," *Ann. Intern. Med.*, vol. 112, no. 4, pp. 303–5, Feb. 1990.

[3] S. J. Wang et al., "Sympathetic skin response and R-R interval variation in Parkinson's disease," *Mov. Disord.*, vol. 8, no. 2, pp. 151–7, Apr. 1993.

[4] A. H. Rook et al., "Treatment of systemic sclerosis with extracorporeal photochemotherapy. Results of a multicenter trial," *Arch. Dermatol.*, vol. 128, no. 3, pp. 337–46, Mar. 1992.

[5] R. M. Knobler et al., "A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of photopheresis in systemic sclerosis," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 54, no. 5, pp. 793–9, May 2006.

[6] C. J. Menkes, G. Andreu, F. Heshmati, and P. Hilliquin, "Extracorporeal photochemotherapy," *Br. J. Rheumatol.*, vol. 31, no. 11, pp. 789–90, Nov. 1992.

[7] W. Macheiner et al., "Sézary syndrome and seronegative polyarthritis: treatment with extracorporeal photochemotherapy," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 48, no. 2, pp. 220–6, Feb. 2003.

[8] W. Reinisch et al., "Extracorporeal photochemotherapy in patients with steroid-dependent Crohn's disease: a prospective pilot study," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 15, no. 9, pp. 1313–22, Sep. 2001.

[9] E. Bisaccia, M. Palangio, and J. Gonzalez, "Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of refractory Crohn's disease," *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 171–4, Oct. 2007.

[10] G. Cavaletti et al., "Extracorporeal photochemotherapy: a safety and tolerability pilot study with preliminary efficacy results in refractory relapsing-remitting multiple sclerosis," *Neurol. Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 24–32, Apr. 2006.

[11] M. L. Barr et al., "Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. Photopheresis Transplantation Study Group," *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 24, pp. 1744–51, Dec. 1998.

[12] L. Urbani et al., "The use of extracorporeal photopheresis for allograft rejection in liver transplant recipients," *Transplant. Proc.*, vol. 36, no. 10, pp. 3068–70, Dec. 2004.

[13] M. B. Marques and H. H. Tuncer, "Photopheresis in solid organ transplant rejection," *J. Clin. Apher.*, vol. 21, no. 1, pp. 72–7, Apr. 2006.

[14] L. Urbani et al., "A novel immunosuppressive strategy combined with preemptive antiviral therapy improves the eighteen-month mortality in HCV recipients transplanted with aged livers," *Transplantation*, vol. 86, no. 12, pp. 1666–71, Dec. 2008.

[15] M. B. Marques and J. Schwartz, "Update on extracorporeal photopheresis in heart and lung transplantation," *J. Clin. Apher.*, vol. 26, no. 3, pp. 146–51, 2011.

[16] H. T. Greinix et al., "Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease," *Blood*, vol. 92, no. 9, pp. 3098–104, Nov. 1998.

[17] L. Salvaneschi et al., "Extracorporeal photochemotherapy for treatment of acute and chronic GVHD in childhood," *Transfusion*, vol. 41, no. 10, pp. 1299–305, Oct. 2001.

[18] F. M. Foss, G. Gorgun, and K. B. Miller, "Extracorporeal photopheresis in chronic graft-versus-host disease," *Bone Marrow Transplant.*, vol. 29, no. 9, pp. 719–25, May 2002.

[19] R. Dall'Amico and C. Messina, "Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease," *Ther. Apher.*, vol. 6, no. 4, pp. 296–304, Aug. 2002.

[20] M. Jagasia et al., "Extracorporeal photopheresis versus anticytokine therapy as a second-line treatment for steroid-refractory acute GVHD: a multicenter comparative analysis," *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 19, no. 7, pp. 1129–33, Jul. 2013.

[21] J. W. Hart, L. H. Shiue, E. J. Shpall, and A. M. Alousi, "Extracorporeal photopheresis in the treatment of graft-versus-host disease: evidence and opinion," *Ther. Adv. Hematol.*, vol. 4, no. 5, pp. 320–34, Oct. 2013.

[22] L. Pierelli et al., "Extracorporeal photopheresis for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease in adults and children: best practice recommendations from an Italian Society of Hemapheresis and Cell Manipulation (SIdEM) and Italian Group for Bone Marrow Tra," *Transfusion*, vol. 53, no. 10, pp. 2340–52, Oct. 2013.

[23] V. A. Patel et al., "Apoptotic Cells, at All Stages of the Death Process, Trigger Characteristic Signaling Events That Are Divergent from and Dominant over Those Triggered by Necrotic Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 8, pp. 4663–4670, Feb. 2006.

[24] E. K. Yoo, A. H. Rook, R. Elenitsas, F. P. Gasparro, and B. R. Vowels, "Apoptosis Induction by Ultraviolet Light A and Photochemotherapy in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Relevance to Mechanism of Therapeutic Action," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 107, no. 2, pp. 235–242, Aug. 1996.

[25] N. Setterblad et al., "Extracorporeal photopheresis increases sensitivity of monocytes from patients with graft-versus-host disease to HLA-DR-mediated cell death," *Transfusion*, vol. 48, no. 1, pp. 169–77, Jan. 2008.

[26] D. Hannani et al., "Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function," *Transplantation*, vol. 89, no. 5, pp. 492–9, Mar. 2010.

[27] A. E. Morelli, "The Immune Regulatory Effect of Apoptotic Cells and Exosomes on Dendritic Cells: Its Impact on Transplantation," *Am. J. Transplant.*, vol. 6, no. 2, pp. 254–261, Feb. 2006.

[28] P. Reddy, "Pathophysiology of acute graft-versus-host disease," *Hematol. Oncol.*, vol. 21, no. 4, pp. 149–161, Dec. 2003.

- [29] P. J. Martin, "Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: Implications for a Future Therapeutic Approach," *Keio J. Med.*, vol. 57, no. 4, pp. 177–183, 2008.
- [30] W. D. Shlomchik, "Prevention of Graft Versus Host Disease by Inactivation of Host Antigen-Presenting Cells," *Science (80-.)*, vol. 285, no. 5426, pp. 412–415, Jul. 1999.
- [31] M. Risoan, "Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation," *Science (80-.)*, vol. 283, no. 5405, pp. 1183–1186, Feb. 1999.
- [32] R. Rizzo et al., "Increased production of soluble HLA-G molecules in stimulated peripheral blood mononuclear cells following extracorporeal photopheresis: Is it a mechanism involved in the therapeutic effect of the procedure?," *J. Clin. Apher.*, vol. 20, no. 4, pp. 222–224, Dec. 2005.
- [33] G. Ren et al., "Apoptotic Cells Induce Immunosuppression through Dendritic Cells: Critical Roles of IFN- and Nitric Oxide," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 5, pp. 3277–3284, Sep. 2008.
- [34] M. Gray, K. Miles, D. Salter, D. Gray, and J. Savill, "Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 35, pp. 14080–14085, Aug. 2007.
- [35] A. E. Morelli and A. T. Larregina, "Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells," *Apoptosis*, vol. 15, no. 9, pp. 1083–1097, Sep. 2010.
- [36] M. Di Renzo et al., "Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 151, no. 3, pp. 407–413, Jan. 2008.
- [37] V. Rao, M. Saunes, S. Jørstad, and T. Moen, "Cutaneous T cell lymphoma and graft-versus-host disease: A comparison of in vivo effects of extracorporeal photochemotherapy on Foxp3+ regulatory T cells," *Clin. Immunol.*, vol. 133, no. 3, pp. 303–313, Dec. 2009.
- [38] A. H. Rook et al., "Pathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma: implications for the use of recombinant cytokines and photopheresis," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 107 Suppl, pp. 16–20, Jan. 1997.
- [39] M. Di Renzo et al., "Extracorporeal photochemotherapy restores Th1/Th2 imbalance in patients with early stage cutaneous T-cell lymphoma," *Immunology*, vol. 92, no. 1, pp. 99–103, Sep. 1997.
- [40] E. Fraser-Andrews, P. Seed, S. Whittaker, and R. Russell-Jones, "Extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome. No significant effect in the survival of 44 patients with a peripheral blood T-cell clone," *Arch. Dermatol.*, vol. 134, no. 8, pp. 1001–5, Aug. 1998.
- [41] A. V. Evans, "Extracorporeal photopheresis in Sezary syndrome: hematologic parameters as predictors of response," *Blood*, vol. 98, no. 5, pp. 1298–1301, Sep. 2001.
- [42] C. Berger et al., "Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy," *Blood*, vol. 116, no. 23, pp. 4838–4847, Dec. 2010.
- [43] C. L. Berger, D. Hanlon, D. Kanada, M. Girardi, and R. L. Edelson, "Transimmunization, a novel approach for tumor immunotherapy," *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 26, no. 3, pp. 205–216, Jun. 2002.
- [44] C. Baecher-Allan, J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler, "CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 3, pp. 1245–1253, Aug. 2001.
- [45] F. Heshmati, "Updating ECP action mechanisms," *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 50, no. 3, pp. 330–339, 2014.
- [46] E. Biagi et al., "Extracorporeal Photochemotherapy Is Accompanied by Increasing Levels of Circulating CD4+CD25+GITR+Foxp3+CD62L+ Functional Regulatory T-Cells in Patients With Graft-Versus-Host Disease," *Transplantation*, vol. 84, no. 1, pp. 31–39, Jul. 2007.
- [47] A. Trenado et al., "Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia," *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 11, pp. 1688–1696, Dec. 2003.
- [48] S. Schmitt, T. S. Johnson, S. Karakhanova, H. Näher, K. Mahnke, and A. H. Enk, "Extracorporeal Photopheresis Augments Function of CD4+CD25+FoxP3+ Regulatory T Cells by Triggering Adenosine Production," *Transplantation*, vol. 88, no. 3, pp. 411–416, Aug. 2009.
- [49] F. Meloni, A. Cascina, S. Miserere, C. Perotti, P. Vitulo, and A. M. Fietta, "Peripheral CD4+CD25+ TREG Cell Counts and the Response to Extracorporeal Photopheresis in Lung Transplant Recipients," *Transplant. Proc.*, vol. 39, no. 1, pp. 213–217, Jan. 2007.

# ОТНОШЕНИЯТА ЛЕКАР – ПАЦИЕНТ : СПОДЕЛЕНАТА ОТГОВОРНОСТ, ЛОШИТЕ НОВИНИ И ОТБОРНАТА ИГРА

*Д-р Велислава Донкина, клиничен психолог*

*НСБАЛХЗ – ЕАД, София*

## DOCTOR-PATIENT RELATIONS : SHARED RESPONSIBILITY, BAD NEWS AND TEAM PLAY

*Velislava Donkina, Phd, clinical psychologist*

*National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematology Diseases, Sofia*

---

**Резюме.** Връзката лекар-пациент често се разглежда като страничен и не толкова важен аспект в процеса на справяне с едно заболяване. Независимо обаче, че тя не стои винаги в центъра на спешните действия, аспектите на тези отношения имат сериозен ефект върху процеса на лечение и могат да подкрепят – или разрушат – в значима степен емоционалната стабилност на пациента. Съвременното афектира природата на тази връзка по типичен и в същото време важен начин, променяйки някои основни характеристики в процеса на комуникация.

**Ключови думи:** отношения лекар-пациент, терапевтично поведение, комуникативни умения, лекарството-лекар, доверена връзка

**Abstract.** Doctor-patient relations are often seen as a side, not so important part of the process of coping with certain disease. Although not at the main point of the urgent action, aspects of these relations are having deep impact on the process of healing and could support – or destroy – to a great extent the emotional stability of the patient. The modern age affects the nature of this relation in a typical and at the same time important way, changing the main characteristics in the process of communication.

**Key words:** doctor-patient relationship, therapeutic approach, soft skills, the drug doctor, trustful relations

---

Съществуват две основни следствия от нашата ера на комуникации, компютри, “нетуркинг” и бързо достъпна информационна технологичност. От една страна – сякаш дистанцията между експертите и пациентите е намалена. От друга обаче, се създаде една нова тенденция : появиха се изключително високо специализирани, високо профилирани професионалисти, които знаят страшно много ... за много малко неща.

Като социални същества, хората зависят от “нетуркинга”, т.е. от контактуването с други и от екипността, заедността. Новият културален контекст поставя не само личните, но и професионалните отношения на качествено различна плоскост. Ако до скоро първичната медицинска помощ е била характеризирана от близка, доверена връзка между някой, който търси помощ и някой, който е насреща, за да я даде – фамилният лекар или просто лекар, то днес ние сме принудени да разчитаме на екип от взаимосвързани специалисти. Пациентът, идващ от неговата социална система, включваща приятели, семейство и ... интернет! ... трябва да се срещне лице в лице с група, екип от специалисти, които да поемат грижата за неговия

проблем.

Тези помагачи специалисти вероятно ще са компетентни, знаещи, високо специализирани, обаче те, бидейки много, неволно съдействат за колизия на отговорността. Кой носи отговорност за важните решения, касаещи живота на пациента, когато става дума за решения, взети от сбор от специалисти? Кой са съответните, добрите начини тези решения да бъдат комуникирани на пациента? Къде е /и има ли изобщо?/ мястото на емоциите и какво е значението на ролята, която те играят – и от двете страни на бялата престилка?

Съвременните лекари са притиснати от необходимостта от “споделени решения”, което често конфронтира желанията, нуждите и най-вече – недостъпните чувства на пациента, който копнее да бъде удържан и обгрижен от даващото успокоение усещане за отговорност.

**Как изглеждат отношенията лекар- пациент днес?**

**1. Споделеното взимане на решения, базирано на мнението на различни специалисти.**

Пациентът се “лута” между различни стилове, специалности, кабинети.

Усещане за загубеност, незначимост, хаос, “пропадане”.

## **2. Лекарят се опитва да представи цялата релевантна информация по обективен и неутрален начин.**

Пациентът се чувства сам, конфрнтиран с информация, която често не разбира.

В нашия модерен свят следващият свободен лекар ще види следващия чакащ пациент. Изведнъж дълбоката, лична история на живота е елиминирана от сцената на клиничната среща. Симптомите се презентират на следващия свободен лекар, когото пациентът посещава, като изолиран феномен, отделен от емоционалния живот на личността. Навярно някой би казал, че диабетът, репродуктивните проблеми, злокачествените заболявания на кръвта или исхемичната болест на сърцето могат да бъдат разглеждани само като генетично предопределени феномени и “психологизирането” им е ненужно. Затова нищо не налага те да бъдат отнасяни към по-широкия аспект от житейските факти около личността на пациента. И сигурно е така. Но пациентите все така продължават да ценят това да са емоционално подкрепени от своя лекар. Към това могат да се прибавят всички онези комплексни психоневрологични и психосоматични състояния, пред които лекарите се усещат блокирани и които могат по-спокойно да бъдат разбирани и третирани чрез т.нар. “talking cure”.

В допълнение, “говоренето с пациента” вдъхва увереност на лекаря в неговата клинична практика и му позволява да се чувства свободен и умел в интервенции, считани за приоритет на психотерапията. Със сигурност, една голяма част от “физическите” болести ни принуждават да мислим за важността на тяхното влияние върху един по-широк кръг от живота на личността.

Манифестирането на сърдечна болка, както би казал Пруст /Proust, 192, р. 153/, със сигурност има отношение към трудностите в емоционалния живот. Това показват не само болестите, чиято етиология се свързва с т.нар. “нервна почва”, но и напр. изследванията на много по-драматични от медицинска гледна точка състояния като синдрома на разбитото сърце/стрес-индуцирана кардиомиопатия /, напр. И действително, на сцената на голям брой телесни синдроми и неблагоприятия, винаги си струва да се вземат предвид по-широк кръг влияния в живота на пациента, тъй като те могат да ги предопределят. Спорно е, но съществува тезата, че спадът на имунитета, който разрешава болестотворното развитие на вирус или бактерия в организма, може да бъде свързан с психичното или емоционално състояние на пациента – опре-

делено състояние на психична травма или тъга/ депресивност/ може имплицитно и дискретно да повлиява ефективността на имунната система.

Преди много години, в ерата на личните фамилни лекари, директната връзка между лекар и пациент, която двустранно е била поддържана с години, е давала възможност тази зависимост да бъде наблюдавана. Познаването на една семейна история и контекст – от баби и дядовци до внуци, преминавайки през всички значими житейски събития – като раждания, раздели и смърти, е било нещо, информацията за което лекарят съхранява и чиято информативност използва. Отнема само минута цялата тази налична в ума на лекаря информация да се “активира”, когато в кабинета влезе познат пациент, за да знае този лекар колко тежко или необичайно е настоящето му състояние за него. Това моментално възпроизвеждане, “знаене”, днес е невъзможно. То е разрушено, тъй като в модерната клинична практика се приема за ирелевантно. В същото време, неговата важност е и емоционална – въвеждането на този контекст, това лекарят да може да види и комуникира на пациента това, което отчита още от неговия вид /“Изглеждате не/добре”.../, “Сякаш нещо Ви безспокои...”, “Имате ли болки?”.../ представлява – както се нарича в психоанализата – т.нар. holding, емоционалното удържане на пациента.

В същото време днес цял клъстер програми за обучение, финансирани от европейски проекти, се крепят на идеята за развиването на социални компетенции, т.нар. soft skills, касаещи умения, които се оказват ключови за реализацията ни в професионалния и личен живот, но които не се преподават в нито един университет – общуването, работата в екип, проактивността, сътрудничеството, решаването на проблеми, издръжливостта на стрес, планиране и организиране, управление на хора, ефективността и инициативността. Корпорациите създават цели отдели и наемат консултантски фирми, които провеждат обучения на служителите им.

Изведнъж изненадващо се оказва, че според NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE, цитиращ влязлата в сила от 2015г. промяна в новия Medical College Admission Test (MCAT) в Съединените щати, предиктор за това как да се създаде по-добър лекар се счита вече не това, което той знае или ще научи – така или иначе, а това колко чувствителен може да бъде той към типа човек, който седи срещу него.

Изследванията показват, че за възприятието на пациентите “добър” лекар е онзи лекар, чиито подход може да се определи като “ориентиран към пациента”/patient-centred approach /, който внушава доверие, който е емпатичен и добре информиран. Открити, доверяващи се и сътрудничащи – такива пък пациенти би искал да има един лекар.

С други думи, постигането на такава атмосфера в лекарския кабинет би дало опцията да се из-

ползват оптимално всички добри възможности на тази среща. В такива условия диагностицирането и терапевтичните интервенции могат да се случат спокойно, уменията на лекаря, неговата енергия и знания могат да бъдат проявени максимално, без да бъдат атакувани или блокирани. За пациента е възможно да получи грижи и внимание. Трудните новини могат да бъдат споделени спокойно и да бъдат чути обективно. Защото никой факт от живота не може да бъде премахнат, просто защото е неприятен. Но това не налага да бягаме от него. Има обаче категорично значение как ще бъде посрещнат и дали ще има някой, който ще остане с пациента, когато го чува и с когото той заедно да помисли как да живее с него. В много от случаите тази връзка, която в психотерапията е основният инструмент, който прави възможно лечението, в медицината прави така, че ходът на болестта да бъде позитивен. Или поне – малко по-добър.

“Личността на лекаря – пише М. Балинт – неговите субективни интереси или особености, може да има решаващо значение за онова, което той вижда, забелязва или не забелязва в неговия пациент”,

/Балинт, 1957, стр. 53/.

Реалността не винаги ни позволява да се отнасяме един към друг по най-добрия начин. Понякога не ни достига време, понякога – търпение, понякога сме притиснати от необходимости, понякога просто нямаме желание... Кабинетът не подпомага “автоматично” разбирането в срещата между два души: има твърде много феномени извън нас, а също и вътре в нас, които ни влияят значимо. Често не съществува дори възможност да осъзнаем всичко това. Какви чувства всъщност влияят и дори определят изхода от една среща? Могат ли те да се ползват и разбират или трябва да бъдем носени по течението им? Привнасяме ли – по някаква своя причина – гняв, тревожност, раздразнение или предрасъдъци от другаде в тези онтошения? Какво влияние имат всички тези преживявания върху мен и върху другия, ако не си давам сметка за тях?

Изследването на тези вътрешни въпроси може да допринесе много за възможността да говорим открито. И то не само в контекста на отношенията “преглед” и “лекар-пациент”.

Всяко професионално отношение, включващо даване на грижа и приемане на такава, някой, който дава помощ и някой, който я получава – в каквато и да е форма, може да стане изключително трудно. Преподаватели и студенти, фасилитатори и клиенти, свещеници и миряни, социални работници, медицински сестри, психолози – и техните клиенти/пациенти – всички ние знаем колко натоваарващи и прегарящи ни могат да бъдат човешките интеракции.

Претоваарването носи стрес за всички въввлечени. Да разбираш и разпознаваш трудностите може да облекчи този ежедневен товар и да подпомогне предотвратяването на бърн аут. Рефлексивността всъщност е необходимост в този процес.

**Какво ми е трудно да понеса в човека отсреща?**

**С какво от него ми е трудно да се свържа?**

**От какво ми идва да избягам?**

Ако е възможно задаването на тези въпроси, ще можем да разбираме повече за себе си: за това кои всъщност сме, защо виждаме света точно така, както го виждаме и за какво се борим. Това помага да се вижда малко по-ясно и другия – не такъв, какъвто бихме го искали или очакваме, а такъв, какъвто е.

Може би някой ще каже – и защо му е на един лекар да знае всичко това? И няма ли най-накрая да ни дадете някаква схема как безболезнено да се казват лошите новини?

Няма такава схема. Не съществува магия, която да направи лошите неща хубави. Ние имаме само разбирането, че историята на другия си е негова. Колкото и трудна, драматична или тъжна да е тя, тя е негова, идва от неговия живот и носи своите причини. Тя не зависи от нас, дори да ни докосва. В своята, ние, също хора, имаме своите болки и загуби и именно те ни помагат да можем да си представим какво ли е да страдаш толкова. Но... ние сме различни хора. Това разбиране е нещото, което помага един лекар да остане емпатичен, без да прегори и да може да говори честно, направо и човешки, без да се крие зад термини и без да става циничен. Това помага да се понесе страданието, което не можем да махнем и ни спира от това да избягаме преди да сме се опитали да помогнем. И ... Вие вече знаете как се съобщават трудните новини.

Защо му е на един лекар да знае всичко това? Защото понякога лекарството е самият той. Защото понякога, както и най-прецизната и точна диагноза, и най-брилянтното лечение може да се провали по същия начин, по който след блестящата операция, която сте направили, пациентът може да не оцее, ако не го гледат добре в реанимация, ако няма над него някой, който да отчете показателите на това, което се случва и да даде адекватната грижа. По същия начин, по който човек, който Ви обича, може да се опита да Ви каже нещо, което смята за важно и вместо да Ви предпази, да се скарате, ако не успее да го каже така, че да го чуете. Защото често, ако в живота подобно неразбиране рискува любовно разочарование, пропуснато кариерно повишение или шофьорски конфликт, при срещата в лекарския кабинет винаги става дума за човешки живот. Защото преди в хилядите спънки в живота медицината да стане работа, научна кариера, извор на радости и мъки, и ежедневие, тя е била дълбокото и искрено желание да се лекуват хора. И да се помага. И защото така, както здравето е нещо повече от отсъствие на болест, така и лекарят е нещо много повече от някой, който посто изписва лекарства.

## **БИБЛИОГРАФИЯ:**

- 1.Балинт, М. „Лекарят, пациентът и болестта“ Фондация „Невронауки“ и Национален център за комплексно изследване на човека 1997
2. Forrest, C., *Therapy skills for healthcare*, M&K Publishing, 2011
- Hinshelwood, R, Skogstad, W., *Observing organisations : anxiety, defence, and culture in health care*, Routledge 2000
- 3.Kathol, R., Gatteau, S., *Healing body and mind : a critical issue for health care reform*, Praeger 2007
- 4.McDouall, J. (1989), *Theatres of the body. A psychoanalytic approach to psychosomatic illness*, New York, Norton
- 5.Otten,H., “The Theory and Practice of Balint Group Work – analyzing professional relationships”, Routledge 2018-06-07
6. Sklar, J., “Balint Matters – Psychosomatics and the Art of Assessment”, Karnac, 2017

### **Адрес за кореспонденция**

Д-р Велислава Донкина, клиничен психолог  
НСБАЛХЗ – ЕАД, София  
Ул.Пловдивско поле N 6, п.к. 1756  
[donkina.velislava@gmail.com](mailto:donkina.velislava@gmail.com)

### **Correspondence address:**

Velislava Donkina, Phd, clinical psychologist  
National University Haematology Hospital, Sofia  
6 Plovdivsko Pole Str., 1756  
[Donkina.velislava@gmail.com](mailto:Donkina.velislava@gmail.com)

# БОЛЕСТ НА ГОШЕ С АСОЦИИРА С ПОВИШЕН РИСК ОТ НЯКОИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ И МОНОКЛОНАЛНА/ПОЛИКЛОНАЛНА ГАМАПАТИЯ

Виктория Върбанова

Клиника по клинична хематология, ВМА – София

## GAUCHER DISEASE IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED RISK OF CERTAIN MALIGNANCIES AND MONOCLONAL /POLYCLONAL GAMMOPATHY

Viktoria. Varbanova

Clinic of Hematology – Military Medical Academy, Sofia

**Резюме.** Болест на Гоше (БГ) е наследствено заболяване с автозомно-рецивно унаследяване. Въпреки ниската му популационна честота (1/57000 новородени за общата популация) съществуват не малко съобщения за асоциация на БГ с неопластични заболявания. Данните са най-убедителни за повишен риск от мултиплен миелом (ММ), до 51.1 пъти. Целта на настоящия обзор е обобщаване на публикациите представящи честотата на малигнени заболявания съпътстващи БГ, изчисления релативен риск и препоръките за ранно диагностициране на ММ при пациенти с БГ.

**Ключови думи:** Болест на Гоше, мултиплен миелом, малигнени заболявания

**Abstract.** Gaucher disease (GD) is a rare autosomal, recessively inherited disease (1/57,000 newborns for the general population). There are increasing data for association of GD with neoplastic diseases. Most convincing are the data of the increased risk of multiple myeloma (MM), up to 51.1 fold. The purpose of this review is to present the published analyzes of the incidence of malignant diseases accompanying GD, estimated relative risk and recent recommendations for early diagnosis of MM in patients with GD.

**Key words:** Gaucher disease, multiple myeloma, malignancy

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЕПИДЕМИОЛОГИЯ

БГ е рядко автозомно-рецивно заболяване<sup>1,2</sup>. БГ е най-честата форма на болести на лизомните натрупвания (14%) с изчислена заболеваемост 1 на 57 000 новородени за общата популация<sup>3</sup>.

### ПАТОГЕНЕЗА И КЛИНИЧНИ КАРТИНА

За пръв път Филип Гоше, представя случай на пациент със спленомегалия, дължаща се на инфилтрация на слезката от абнормни клетки през 1882 г., които приема за първичен епителиом<sup>4</sup>. По-късно са публикувани поредица от подобни клинични случаи, но едва през 1965 г. Роско Брейди идентифицира ензимния дефицит патогенетично свързан със заболяването<sup>5</sup>. От тогава е известно, че БГ се дължи на дефицит на ензима β-глюкоцереброзидаза (β-acid-glucosidase, GBA), метаболизиращ глюкоцереброзид в церамид и глюкоза<sup>1,2</sup>. В резултат глюкоцереброзида се натрупва прогресивно в лизозоми на макрофагите от ретикулоендотелната система. „Препълнените“ с глюкоцереброзид тъканни макрофаги, известни като клетки на Гоше,

инфилтрират различни органи, предилекционно слезка, черен дроб и костен мозък, което води до хепато-спленомегалия, цитопения, различни скелетни усложнения и неврологична симптоматика.

Генът GBA1, кодиращ ензима GBA, е разположен на хр.1 (1q21-q22). Изграден е от 11 екзона, в които са описани повече от 400 мутации до моментаб. По-голяма част от мутациите асоциирани с БГ са „missense“ мутации, водещи до намалена каталитична функция и/или стабилност на кодиращия протеин. Идентифицирани са също „nonsense“ и „frameshift“ мутации. Четири мутации, N370S, 84GG, IVS2 + 1G > A и L444P, са отговорни за 90% от мутантните алели при БГ тип 1 сред ашкеназийските евреи и при над 50% от нееврейските пациенти с БГ тип 1<sup>1</sup>. Известни са корелации между фенотипната изява за заболяването и вида мутация в GBA1. Хомозиготно носителство на N370S, например описано при тип 1 БГ се характеризира с липса на неврологични отклонения, докато L444P хомозиготност се асоциира с БГ тип 3<sup>7-9</sup>. Допълнително съществуват литературни данни за фенотипни различия при еднакъв генотип, дори сред членове на една фамилия (сиблинги), поради което може да

се допусне съществуването на други генетични или негенетични фактори влияещи върху клиничната изява<sup>9</sup>.

Разграничават се три основни клинични типа на заболяването в зависимост от отсъствието (тип 1) или присъствието (тип 2 и тип 3) на неврологични нарушения. Хепато-спленомегалията, костни лезии и белодробно засягане могат да се наблюдават при всички форми<sup>10</sup>.

Тип 2 БГ (остра невронопатична) е най-рядката (1.0%)<sup>11</sup>, но най-тежка форма на заболяването с фулминантно протичане и очаквана преживяемост до 2 годишна възраст. Неврологичната симптоматика е предизвикана от увреждане на черепно-мозъчните нервни ядра и екстрапирамидния път. Проявява се от раждането или до 6 месец със страбизъм, околomotorна апраксия, дисфагия, трисмус, ретрофлексия на главата, гърчове, пулмонални инфекции и др., които завършват с фатален край в ранна детска/кърмаческа възраст.

Тип 3 БГ (подостра невронопатия, 5% от случаите на БГ) клинично се представя като тип 2, но с по-късно начало, хроничен ход и по-леко ЦНС засягане изразяващо се в нарушения на хоризонталните движения на очите, в някои случаи атаксия, спастичност, акинетични и миоклонични пристъпи, деменция<sup>11</sup>.

Тип 1 (неневропатична) е най-честата форма (92%). Неврологичната симптоматика се проявява с паркинсонизъм предимно в напреднала възраст<sup>11</sup>. Клиничната изява е разнородна при индивидуалните пациенти, поради различно съчетание на отделните симптоми, тежест, темп на акумулиране и влошаването им<sup>12</sup>. Бъбречно увреждане, пулмонална хипертония и сърдечни нарушения се развиват значително рядко (табл. 1).

Таблица 1. Честота на клиничните симптоми при БГ тип 1

КЛИНИЧНА ИЗЯВА	ЧЕСТОТА
Спленомегалия	86%
Хепатомегалия	65%
Костно-мозъчна инфилтрация	81%
Тромбоцитопения ( < 120 x 109/L)	60%
Анемия (Hgb < 120 g/L за мъже, < 110 g/L за жени и деца > 12 г.)	37%
Костно засягане	83%
Костна деформация тип „ерленмайерова колба“	59%
Остеопения/остеопороза	49%
Костни болки	34%

Hgb – хемоглобин

Клиничната вариабилност на тип1 значително затруднява и забавя диагнозата с широк диференциално-диагностичен панел. Обобщени данни от 2005 г. доказват, че повече от 65% от пациентите се диагностицират в зряла възраст (след 20 години)<sup>11</sup>, а някои пациенти може дори да останат не диагностицирани<sup>13</sup>.

## АСОЦИАЦИЯ НА БГ С МАЛИГНЕНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

В ерата на съвременната ензим-заместителна (enzyme replacement therapy, ERT) и субстрат-редуцираща терапия (substrate reduction therapy, SRT), пациентите тип 1 БГ може да имат нормална продължителност на живота. Съществуват обаче редица съобщения за повишена риск от малигнени заболявания, в частност хепатоцелуларен карцином (hepatocellular carcinoma, HCC), карцином на бъбрека и хематологични неоплазии, които биха компроментирали общата преживяемост<sup>11, 14-17</sup>.

Още през 1982 г. Lee и сътр. публикуват данни за честотата на малигнени заболявания при пациенти с БГ<sup>14</sup>. От 239 включени пациенти, те докладват за 35 починали, от които 54% (n=19) са с доказано малигнено заболяване. Първото голямо проучване изследващо въпроса за асоциация на БГ с малигнени заболявания е на Rosenbloom и сътр. от 2005 г. В анализа са обработени данните за 2742 пациенти с БГ от различни региони. Честотата на малигнени заболявания е сравнена с очакваната честота на неоплазии за същата възрастова група и пол в САЩ<sup>11</sup>. Относителния риск за неопластично заболяване с изключение на ММ е едва 0.79 (95% CI: 0.67- 0.94) и не достига статистическа значимост в сравнение с риска за малигнени заболявания в общата популация за съответната възрастова група. Изчисленият риск за ММ обаче е достоверно по-висок със стойност 5.9 (95% конфиденциален интервал, 95% CI: 2.8-10.8). В заключение авторите допускат, че БГ не се асоциира с по-висок риск от неоплазии поне в ранна и средна възраст с изключение на ММ<sup>11</sup>. Подобно Zimran и сътр. отхвърлят значимо повишен риск от солидни тумори при БГ<sup>18</sup>. Противоположни са данните от други две проучвания, в които е доказан от 1.8 до 2.5 пъти по-висок риск от рак при БГ<sup>16,17</sup>, в частност ННС и карцином на бъбрека. Първи, екипа на de Fost и сътр. описват два случая на ННС при пациенти с БГ и изчисляват релативен риск от 141.316. В последствие са публикувани още 7 случаи на ННС при БГ, като всички пациенти, с изключение на един, за когото няма данни, са след спленектомия<sup>11, 14, 17-21</sup>. Асоциация между БГ и бъбречен карцином е докладвана от четири независими изследователски екипи<sup>11,14,16,17</sup>. На табл. 2 са представени публикации представящи синхронно или метакронно диагностициране на солидни тумори при БГ.

Таблица 2. Честота на солидни тумори при пациенти с БГ.

Локализация	Брой описани пациенти	Книгопис
НСС	9	11, 14, 17-21
Малигнен меланом	7	16-18
Базоцелуларен карцином	7	16, 17
Плоскоклетъчен карцином	3	14, 17
Рак на щитовидната жлеза	4	17, 18, 22
Рак на стомаха	1	15
Рак на панкреаса	4	14, 15
Коло-ректален карцином	14	14,16-18, 23-25
Бъбречен карцином	4	14, 16, 17, 26, 27
Белодробен карцином	12	14, 15, 17, 28-30
Карцином на гърдата	14	17, 18, 29, 31, 32
Карцином на маточната шийка	2	17, 18
Дисгермином	1	33
Тестикуларен карцином	1	16
Простатен карцином	7	16-18, 18, 34
Остеобластом	2	17, 35
Астроцитом	1	36
Глиом	1	14
Глиобластом	2	37
Назофарингеален карцином	1	17
Карцином на ларинкса	1	14
Карцином в областта на мандибулата	1	14
Карцином на устните	1	18
сарком	7	15-17, 38-40
НПО	1	15

За разлика от солидните тумори, където данните за асоциация с БГ са противоречиви или са базирани на малък брой случаи, във всички описани анализи се доказва повишен риск от ММ вариращ от 5.9 до 51.1<sup>11, 15-18, 41</sup>. Докладвана е и по-висока честота на моноклонална гамапатия с неясно значение (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) и поликлонална гамапатия сред пациентите с БГ варираща от 0% до 35% и от 25% до 91%, съответно<sup>16-18</sup>. За сравнение MGUS се среща при 3.2% от възрастните над 50 г. и до 7.5% над 85 годишна възраст<sup>42</sup>. Един процент от здравите с MGUS прогресират до ММ или друга плазмноклетъчна хемопатия на година<sup>43</sup>. Няма данни дали тази честота на прогресия е валидна и за пациентите с MGUS и БГ, въпреки че в четири независими анализа е показана честота на прогресия от MGUS в ММ при БГ от 1% до 9%<sup>41,44-46</sup>.

Изказана е причинно-следствена връзка между БГ и MGUS/ММ. Според една от хипотезите натрупването на глюкоцерамид при БГ води до хронична стимулация на имунната система с последваща лимфопрлиферация, хипергамаглобулинемия и евентуално ММ<sup>44</sup>. Voven et al. доказват, че клетките на Гоше не са инертни клетки, а силно подобяват активирани макрофаги, стимулиращи освобождаването на цитокини от моноцитите в заобикалящата ги среда<sup>47</sup>. В подкрепа на тази хипотеза са данните за повишени нива на про-инфламаторни цитокини като интерлевкин (IL)-6, IL-1, IL-10, тумор-некротизиращ фактор- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) при някои пациенти с БГ<sup>45, 48-51</sup>. Същевременно се смята, че IL-6 и IL-10 имат съществена роля в сигналната цитокинова трансдукция асоциирана с развитието на ММ<sup>52</sup>. Друга хипотеза изказва, че повишените нива на феритин асоциирани с БГ<sup>53</sup>, потискат Т-клетъчната функция и повишават секрецията на имуноглобулин М (IgM) от В-лимфоците<sup>54</sup>. Допълнително феритина има директен карциногенния ефект като индуктор на продукцията на свободни радикали<sup>55,56</sup>. Друг дискутиран фактор свързан с малигнизацията при БГ е периферната инсулинова резистентност асоциирана със заболяването<sup>57</sup>, водеща до хиперинсулинемия, която може да подпомага растежа и развитието на пред-малигнени клетки<sup>58</sup>. Интерес представлява и сплектоемията при БГ, която се свързва с повишен риск от НСС<sup>16</sup>, без да е ясна патогенетичната връзка.

През последните години се изследва влиянието на ERT и SRT при пациенти с БГ тип 1 в два полюсни аспекта. От една страна значението им за намаляване на риска от малигнени заболявания и противоположно възможното им значение за развитие на късни усложнения като неопластично заболяване.

Съществуват данни за намаляване на завишените нива на цитокини<sup>41, 45, 49, 59</sup> и имуноглобулини<sup>60,61</sup> при пациенти с БГ провеждащи ERT. В едно проучване е докладвано намаляване на поликлоналната

гамапатия при ERT, но ефекта на ERT за MGUS е спорен<sup>41,46,60</sup>. В изследване на de Fost и сътр.<sup>41</sup>, никой от пациентите с нормални имуноглобулини или поликлонална гамапатия не е развил MGUS. Същевременно двама от пациентите с MGUS са прогресирали до ММ на фона на терапия с ERT. Тези данни са в подкрепа на хипотезата за силно намален или липсващ риск редуциращ ефект на ERT или SRT при вече започнала В-клонална експанзия. Rosenberg и сътр. показват почти еднаква честота на малигнени заболявания при пациенти с БГ лекувани с ERT и такива, при които не се е провеждала терапия, 4.4% и 4.6% съответно<sup>11</sup>. Аналогични са и резултати за честота на ММ, 0.3% и 0.6% за лекувани и лекувани с БГ<sup>11</sup>. Последното изследване е в подкрепа на становището за липса на повишен риск от малигнени заболявания при пациенти с БГ третирани с ERT.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПРЕПОРЪКИ

Доказаната по-висока честота на MGUS и повишен риск от ММ при пациенти с БГ в сравнение със здравата популация от същата възрастова група дава основание на Rosenberg и сътрудници да изкажат следните препоръки:

### *Електрофореза на серум*

#### 1. Новодиагностицирани пациенти

a. на всички пациенти с доказана БГ при поставяне на диагнозата

b. по време на първата оценка или преди започване на ERT, ако е показана

2. За пациенти с нормални изходни резултати, препоръчват серийно проследяване на 1- до 2-годишни интервали, особено при пациенти на възраст над 50 години.

В началото на 2018 г. е публикуван експертен консенсус на Европейската работна група за БГ (European working group on Gaucher disease), в който една от целите на терапията и проследяването на пациенти с БГ тип 1, е ранна диагностика на хематологични неоплазии, включително ММ, лимфом и амилоидоза. MGUS е изключен от панела с препоръки за ранна диагностика и проследяване, поради липсата на специфично лечение за това състояние и доказана полза за пациента от ранната диагностика<sup>62</sup>.

**БИБЛИОГРАФИЯТА Е НА РАЗПОЛОЖЕНИЕ  
ПРИ АВТОРА.**

**Адрес за кореспонденция**

*Д-р Виктория Пламенова Върбанова  
Клиника по Хематология, Военномедицинска  
Академия, МБАЛ София  
бул. „Св. Георги Софийски“ № 3  
София 1606  
тел: 0884674160  
e-mail: viktoriiia1982@abv.bg*

**Correspondence address:**

*Viktoria Plamenova Varbanova  
Clinic of Hematology – Military Medical Academy,  
Multiprofile hospital for active treatment Sofia  
3, Georgi Sofiiski bul.  
1606 Sofia, Bulgaria  
Ph: (+359)884674160  
e-mail: viktoriiia1982@abv.bg*

## РАДИОСИНОВЕКТОМИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХЕМОФИЛНА АРТРОПАТИЯ

**В. Горанова-Маринова<sup>1,2</sup>, Хр.Иванова<sup>2</sup>, В. Попов<sup>3</sup>, Ж.Грудева-Попова<sup>1,4</sup>**

1-Клиника по клинична хематология, УМБАЛ Св.Георги – Пловдив

2-Секция „Хематология“, I-ва Катедра Вътрешни болести, МФ, МУ – Пловдив

3-Секция „Лъчелечение и нуклеарна медицина“, Катедра „Клинична онкология“, МФ, МУ – Пловдив

4-Секция „Медицинска онкология“, Катедра „Клинична онкология“, МФ, МУ – Пловдив

## RADIOSYNECTOMY IN PATIENTS WITH HEMOPHILIC ARTHROPATHY

**V. Goranova-Marinova<sup>1,2</sup>, Hr.Ivanova<sup>2</sup>, V.Popov<sup>3</sup>, J.Grudeva-Popova<sup>1,4</sup>**

1-Clinic of Clinical Hematology, University Hospital St. George – Plovdiv

2-Section «Hematology», 1st Department of Internal Diseases, MF, MU – Plovdiv

3-Section «Radiation and Nuclear Medicine», Department of Clinical Oncology, MF, MU – Plovdiv

4-Department of Medical Oncology, Department of Clinical Oncology, MF, Medical University – Plovdiv

---

**Резюме.** Радиосиновектомията (РС) е основна терапевтична възможност при всички пациенти с хемофилна артропатия, при които има данни за хроничен синовит, не повлияващ се от консервативни методи. Тя намалява броя на хемартрозите, облекчава болката и подобрява обема на движение в ставата при 75-80% от пациентите с хемофилия. Ефектът е дълготраен, в продължение на няколко години. Най-често прилаганите изотопи са Re186 и Y90, които имат кратък полуживот и слабо проникване в околните тъкани. РС с Y90 не е свързана с повишен риск от малигнени заболявания в сравнение с общата популация. РС е по-малко инвазивен метод от артроскопската и отворена синовектомия, както и алопластиките на различни стави, изисква минимална заместителна терапия с АХФ, може да бъде извършен амбулаторно и има относително ниска цена. Приложението на РС е силно препоръчително в страни с ограничен достъп до АХФ.

**Ключови думи:** радиосиновектомия, хемофилия, хемофилна артропатия

**Abstract.** Radiosynovectomy (RS) is a major therapeutic option in all patients with haemophilic arthropathy who have chronic synovitis not influenced by conservative methods. It reduces the number of haemarthroses, relieves pain and improves range of joint movement in 75-80% of patients with haemophilia. The effect is lasting for several years. The most commonly used isotopes are Re186 and Y90, which have a short half-life and poor penetration into surrounding tissues. RS with Y90 is not associated with an increased risk of malignancies compared to the general population. It is a less invasive method than arthroscopic synovectomy, as well as alloplastic alloplasty, requires minimal replacement therapy with clotting factor concentrates (CFC), does not require hospitalization and has a relatively low cost. RS application is highly recommended in countries with limited access to CFCs.

**Key words:** radiosynovectomy, hemophilia, hemophilic arthropathy

---

### ВЪВЕДЕНИЕ

Рецидивиращите хемартрози са най-характерната клинична изява при пациентите с хемофилия. Многократните кръвоизливи в ставите са съпроводени с развитие на хроничен синовит и последваща необратима хрущялна деструкция със ставни деформации и инвалидизиране на пациентите<sup>1</sup>. В съвременното подобреният достъп до антихемофилни фактори (АХФ) и най-вече въвеждането на профилактика от най-ранна детска възраст (първична профилактика) позволяват все

по – успешно предотвратяване на ставните усложнения. Въпреки това много пациенти с хемофилия развиват хемофилна артропатия поради субоптимален дозов режим, недостиг на антихемофилни фактори, поява на инхибитори и др. Голям брой консервативни и хирургични методи са насочени към предотвратяването и лечението на ставните усложнения при пациенти с хемофилия.

Радиосиновектомията (РС) е успешен метод за овладяване на хемофилната артропатия и е широко прилагана консервативна алтернатива на хи-

рургичната синовектомия. Показана е при пациенти с хроничен синовит и рецидивиращо кървене, без ефект от интензивно лечение с АХФ. Терапевтична възможност е за хемофилни пациенти, които не са подходящи за оперативни ортопедични корекции, както и за пациенти с хемофилия с инхибитори<sup>2-3</sup>. Представлява отстраняване на синовиалната мембрана чрез интраартикуларно прилагане на радиоизотопи. Радиоактивните колоидни частици се фагоцитират от макрофагите на възпаления синовиум. Освобождаването на  $\beta$  – лъчение причинява коагулационна некроза, фиброза и склероза на синовиалната тъкан, включително съдовете и болковите рецептори. Ако е приложен правилно, радиоизотопът засяга само синовиалните клетки поради ниския си обхват на излъчване и не се очаква неблагоприятен ефект върху хрущялната тъкан, костта или други части на тялото. В сравнение с артроскопската синовиектомия и алопластиките на различни стави, РС е по-малко инвазивен метод, изисква минимална заместителна терапия с АХФ, може да бъде извършен амбулаторно и има относително ниска цена<sup>4-5</sup>.

## ИНДИКАЦИИ

Според препоръките на Европейския хемофилен консорциум, РС се обсъжда при всички пациенти с хемофилна артропатия, при които има данни за хроничен синовит, който не се повлиява от по-консервативни методи. (категория 1В)<sup>6,10</sup>.

1. Хемофилни пациенти на възраст > 12г (12-73 г в различни проучвания)
2. Без успех от профилактично приложение на АХФ или лечение „ при необходимост“ в интензивен дозов режим
3. Данни за хроничен синовит – клинични, ехографски, рентгенови или от ядрено-магнитен резонанс
4. По-малко от 2-3 епизода на кървене месечно.
5. Без радиологични данни за необратими ставни изменения (РС не предотвратява деструкцията на ставата, а унищожават кървящата и инфламирана синовия).

## КОНТРАИНДИКАЦИИ

### **Абсолютни контраиндикации**

1. Масивен пресен кръвоизлив
2. Манифестна инфекция
3. Руптурирала киста на Бейкър

### **Относителни контраиндикации:**

1. Нестабилност на ставите
2. Тежко разрушаване на ставните хрущяли
3. При деца, когато клиничната полза се очаква да надхвърли потенциалните рискове

## ИЗБОР НА ИЗОТОП.

Радионуклеидната терапия се провежда в съответствие с националните разпоредби за приложение на радиоизотопи за терапевтични цели.

### **Видове радиоизотопи и техните свойства.**

Идеалният радиоизотоп трябва да бъде чист  $\beta$ -емитер, с ограничен обхват на проникване през тъканите и умерено – дълъг полуживот. За да се постигне оптимално разпределение в синовиата, радиофармацевтикът трябва да бъде в колоидна форма. Размерът на колоида трябва да бъде достатъчно малък, за да бъде фагоцитиран и достатъчно голям, за да се избегне екстра-артикуларното изтичане. Препоръчителният най-малък размер е 5-10 nm. В последните години, за лечение на хемофилната артропатия се прилагат радиофармацевтиците Re186 и Y90. Тяхно предимство е краткият им полуживот съответно 2.7 и 3.7 дни, както и слабо проникване в меките тъкани на дълбочина 1-5мм. Дозата се определя от вида (големината) на ставата и теглото на болния. За колянна става се използва Y-90 поради по-дългия си обхват в тъканта. Препоръчителната активност е 185 MBq (5 mCi). От 2001г за стави със среден размер се предпочита Re-186. Натоварващата активност е различна в различните проучвания като препоръчителни стойности са за: тазобедрена става 74-185 MBq (2-5)/3 ml; раменна става 56-74 MBq (2-5 mCi)/ 3 ml, лакетна става 74-111 MBq (2 mCi)/1-2 ml, глезенна става 74 MBq (2 mCi)/1-1.5 ml, без да се надвишава единична дозова активност Re186 от 370MBq<sup>8,9,17,19</sup>. Световната федерация по хемофилия (WFH) препоръчва при възрастни доза 1 mCi за големите стави (коленни и раменни) и 0.5 mCi за по – малките стави. При деца дозировката е обичайно наполовина<sup>20</sup>. P-32, често използван в миналото, вече не се прилага в страните от Европейския съюз. Остава широкото му приложение в САЩ и Канада. Той е чист  $\beta$ -емитер с размер на частиците 6-20 микрона, пенетрация в тъканите до 5мм и полуживот от 14 дни. Приложение на Sm-153 се съобщава в единични серии в литературата<sup>13,15,17</sup>. Er-169 е радиофармацевтик, който се използва при заболявания на малките стави, най-често интерфалангеалните, но няма публикувани данни при хемофилна артропатия.

## ЕФЕКТИВНОСТ

Обобщено РС има терапевтичен ефект при 75-80% от случаите. След РС, епизодите на кървене намаляват значително, подобрява се обемът на движение на ставата като ефектът е дълготраен и е възможно липса на кървене в продължение на няколко години. В голямо проучване върху 443 РС при 345 болни с хемофилия, се установява намаляване на броя на хемартрозите с 64,1%, ставните болки намаляват с 69,4%, степента на синовит

показва намаление с 31,3%. Индексът на WFH показва подобрене от 19%<sup>10-13,15</sup>. При 20-25% от случаите РС не успява да контролира хемартрозите. В такива случаи РС може бъде повторена. Препоръчително е когато три ранни последователни РС (повтарящи се на всеки три месеца) не успеят да овладеят синовиата, да се обмисли хирургична синовектомия (отворена или артроскопска)<sup>11-13</sup>.

## СТРАНИЧНИ ЕФЕКТИ

Макар и рядко са описани случаи на разязвяване или радионекроза на мястото на приложение на радионуклеида и изтичане на радионуклеид извън ставата. В дългосрочен план йонизиращото лъчение потенциално води до хромозомни аберации, особено при деца. Публикувани са 2 случая на деца, развили остра лимфобластна левкемия в рамките на 1 година след радиосиновектомията с P-32, но причинно-следствената връзка не е категорична<sup>7-10</sup>. Други скоростни ретроспективни проучвания не показват увеличение на риска от малигнени заболявания в сравнение с общата популация след RS с Y-90. Един от най-силните аргументи в полза на безопасното вътреставно приложение на радиоизотопи в дългосрочен план е фактът, че има проведени повече от 5000 РС при болни с ревматоиден артрит без съобщения за повишена честота на малигнени заболявания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РС е основна терапевтична възможност при всички пациенти с хемофилна артропатия, при които има данни за хроничен синовит, не повлияващ се от консервативни методи. Тя намалява броя на хемартрозите, облекчава болката и подобрява обема на движение в ставата. РС е по-малко инвазивен метод от артроскопската и отворена синовектомия, изисква минимална заместителна терапия с АХФ, може да бъде извършен амбулаторно и има относително ниска цена. Приложението на РС е силно препоръчително в страни с ограничен достъп до АХФ.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Lafeber FP, Miossec P, Valentino LA. *Physiopathology of haemophilic arthropathy*. *Haemophilia* 2008; 14 Suppl 4: 3-9
2. McGuinn C, Cheng D, Aschman D, Carpenter SL, Sidonio R, Soni A, Tarantino MD, Wheeler AP, Dunn AL; ATHN3 Working Group. *Radionuclide synovectomy/synoviorthesis (RS) in patients with bleeding disorders: A review of patient and procedure demographics and functional outcomes in the ATHNdataset*. *Haemophilia*. 2017 Nov;23(6):926-933.
3. Solimeno LP, Escobar MA, Krassova S, Seremetis S. *Major and Minor Classifications for Surgery in People With Hemophilia: A Literature Review*. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018 May;24(4):549-559.
4. André V, Dalibard V, Denis E, Varin S, Cormier G. *Current role for radioisotope synovectomy*. *Joint Bone Spine*. 2018 May;85(3):295-299.
5. Sharma R, Dunn A, Aschman D, Cheng D, Wheeler A, Soni A, McGuinn C, Knoll C, Stein DT, Young G, French J, Sanders J, Davis JA, Tarantino M, Lim M, Gruppo R, Sidonio R, Ahuja S, Carpenter S, Pipe S, Shapiro A. *Radionuclide synovectomy/synoviorthesis (RS) in persons with bleeding disorders: A review of impact of national guidance on frequency of RS using the ATH-*

*Ndataset*. *Haemophilia*. 2017 Jul;23(4):e385-e388.

6. Hanley J, McKernan A, Creagh MD, Classey S, McLaughlin P, Goddard N, Briggs PJ, Frostick S, Giangrande P, Wilde J, Thachil J, Chowdhary P; Musculoskeletal Working Party of the UKHCDO. *Guidelines for the management of acute joint bleeds and chronic synovitis in haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO) guideline*. *Haemophilia*. 2017 Jul;23(4):511-520
7. Lim MY, Cheng D, Aschman D, Dunn A; ATHN3 Working Group. *Radionuclide synovectomy in patients with bleeding disorders: a review of malignancy and myeloproliferative neoplasms from the ATHN-dataset*. *Haemophilia*. 2017;23(2):e160-e162.
8. Rodriguez-Merchan EC, Valentino LA. *Orthopedic disorders of the knee in hemophilia: A current concept review*. *World J Orthop*. 2016 Jun 18;7(6):370-5
9. Tobase P, Lane H, Siddiqi AE, Ingram-Rich R, Ward RS; Universal Data Collection Joint Outcome Working Group, Hemophilia Treatment Center Network (HTCN) Study Investigators. *Declining trends in invasive orthopedic interventions for people with hemophilia enrolled in the Universal Data Collection program (2000-2010)*. *Haemophilia*. 2016 Jul;22(4):604-14.
10. Beil FT, Rütter W. *Indications and contraindications for radiosynoviorthesis*. *Z Rheumatol*. 2015 Nov;74(9):780-5
11. Rodriguez-Merchan EC, De la Corte-Rodriguez H, Jimenez-Yuste V. *Radionuclide synovectomy in haemophilia: long-term results of 500 procedures performed in a 38-year period*. *Thromb Res*. 2014 Nov;134(5):985-90
12. Rodriguez-Merchan EC. *Hemophilic synovitis of the knee: radiosynovectomy or arthroscopic synovectomy? Expert Rev Hematol*. 2014 Aug;7(4):507-11.
13. Rodriguez-Merchan EC. *The knee in severe haemophilia with special emphasis on surgical/invasive procedures*. *Thromb Res*. 2014 Sep;134(3):545-51.
14. Calegario J, Silveira C, Hage D, Sayago M, de Landa D, Mengatti J, de Paula AP. *Comparison of the effect of knee synovectomy in haemophilic patients with 153Sm- and 90Y-labelled hydroxyapatite 1 year after*. *Haemophilia*. 2014 Nov;20(6):873-8
15. Ozcan Z. *Radionuclide synovectomy in hemophilic synovitis*. *Mol Imaging Radionucl Ther*. 2014 Feb;23(1):1-4.
16. Calegario JU, Machado J, Furtado RG, de Almeida JS, de Vasconcelos AV, deBarboza MF, de Paula AP. *The use of 185 MBq and 740 MBq of 153-samarium hydroxyapatite for knee synovectomy in haemophilia*. *Haemophilia*. 2014 May;20(3):421-5.
17. Rodriguez-Merchan EC. *Haemophilic synovitis of the elbow: radiosynovectomy, open synovectomy or arthroscopic synovectomy? Thromb Res*. 2013 Jul;132(1):15-8
18. Thomas S, Mendes JD, Souza SA, Lorenzato CS, Assi PE, Pacheco LR, Gabriel MB, Bordim A, Gutflen B, da Fonseca LM. *Radioactive synovectomy with (90) yttrium and (153) samarium hydroxyapatite in haemophilic joints: preliminary study on radiation safety*. *Haemophilia*. 2013 Jul;19(4):632-6.
19. Teyssler P, Kolostova K, Bobek V. *Radionuclide synovectomy in haemophilic joints*. *Nucl Med Commun*. 2013 Apr;34(4):291-7.
20. Silva M, Luck JV Jr, Linas A. *Chronic hemophilic synovitis. The role of radiosynovectomy*. In: "Treatment of hemophilia" series published by WFH, 2004, Montreal, Canada

## Адрес за кореспонденция

Доц. Д-р Веселина Горанова-Маринова, дм  
Клиника по клинична хематология  
УМБАЛ „Св.Георги“, МУ- Пловдив  
Бул „Васил Априлов“ 15А  
Гр. Пловдив  
Тел: 0888885741

e-mail: [vesselina\\_goranova@yahoo.com](mailto:vesselina_goranova@yahoo.com)

## Correspondence address:

Assoc. Prof. Dr. Vesselina Goranova-Marinova, MD, PhD  
Clinic of Clinical Hematology  
University Hospital "St. Georgi", Medical University – Plovdiv  
15A "Vasil Aprilov" Blvd, Plovdiv  
Tel: 0888885741  
e-mail: [vesselina\\_goranova@yahoo.com](mailto:vesselina_goranova@yahoo.com)

## DR BENICE JONES И ЛЕКОВЕРИЖНИТЕ ПРОТЕИНИ – ИСТОРИЯ С МНОГО УЧАСТНИЦИ И НЕЗАВЪРШЕН КРАЙ...

Ст. Горанов, В. Горанова-Маринова

Първа Катедра по Вътрешни Болести, Секция хематология  
Медицински факултет при Медицински университет – Пловдив  
УМБАЛ „Св. Георги“ – ЕАД, Пловдив

## DR BENICE JONES AND LIGHT CHAIN PROTEINS – A STORY WITH MANY PARTICIPANTS AND UNFINISHED END. .. TO BE CONTINUED

S.Goranov<sup>1</sup>, V. Goranova-Marinova<sup>1,2</sup>

1-1-st Department of Internal Medicine, Hematology Section, Medical Faculty, Medical University Plovdiv  
2-Clinic of Hematology, University Hospital “Sv. Georgi” – Plovdiv

**Резюме.** В исторически обзор от достъпни литературни източници се описва последователно развитието на познанията за Бенце Джонс лековерижните (моноклонални) протеини: от първото описание на „необяснимите“ физикохимични свойства на лековерижен уропротейн, разграничаването на двата типа  $\kappa$  &  $\lambda$ , първите описания на болестите на плазмоцитната редица до съвременните данни за биологията и патогенетичното им значение. Разгледани са и първите публикации в родната научна литература

**Abstract.** In a historical review of available literary data, the development of the knowledge of Bence Jones light chain monoclonal proteins has been described: from the first description of the “unexplained” physico-chemical properties of light-chain urotheline, the distinction between the two types of collagen, the first descriptions of the plasma – up to date biology and pathogenic significance. The first publications in the native literature are also discussed.

### ЕДНА ПРОБА ЗА АЛБУМИН В УРИНАТА – НЕОЧАКВАНА ИЗНЕНАДА И С МНОГО ВЪПРОСИ БЕЗ ОТГОВОР.

На 30 октомври, петък, 1845г 53 годишният д-р William McIntyre, лекар в Western General Dispensary в Лондон, излиза от своя дом на Harley Street близо до неговата месторабота – Western General Dispensary, St Marylebone в централен Лондон.



Фасадата на Harley Street 84 в Лондон днес (в момента частна клиника и консултативен център).

Поел е ангажимент да консултира Mr Tomas Alexander McBeau, пациент от няколко месеца на неговия колега д-р Thomas Watson (бъдещият президент на Royal College of Physicians)<sup>1,2,3</sup>. Mr McBeau, 45 годишен бакалин, страда от анемия и силни болки по костите, които слабо се влияят от remedia tonica и tinctura opii. При прегледа д-р McIntyre открива и особена оточност, съмнителна за “нефроза”. Пробата за албумин в урината, обаче е пълна изненада с непознати досега отнасяния. При загряване белтъчната субстанция преципитира и отново се разтваря, ако загряването продължи. Необичайните свойства на уропротейна на Mr McBeau е физикохимичен феномен, за който липсва всякакво обяснение. Заинтригувани Д-р McIntyre и д-р Watson описват находката и изпращат за изследване проба от урината на известния вече по това време д-р Henry Bence Jones в болницата „St George“<sup>1,2,3</sup>

Saturday, Nov, 1, 1845

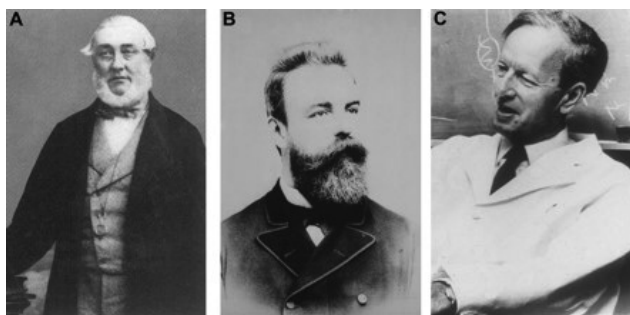
Dear dr Bence Jones,

**The tube contains urine of very high specific gravity. When boiled it becomes highly opaque. On the addition of nitric acid it effervesces, assumes a reddish hue and becomes quite clear; but as it cools assumes the consistence and appearance which you see. Heat reliquifies it. What is it?**

Едва на 33г д-р Henry Bence Jones има впечатляваща кариера като лекар, химик, научен работник, лектор и дори биограф. Той е публикувал над 40 статии с оригинални наблюдения и е авторитетен член на Royal Society. Неслучайно заради уменията и познанията си в лабораторните изследвания е наречен "the best chemical doctor in London"<sup>4</sup>. Един от най-известните съвременни авторитети за миеломната болест RA Kyle го определя като „a man for all seasons“<sup>5</sup>



М. И. Аринкин



Dr Henry Bence Jones; Dr Otto Kahler; Dr J Waldenstrom

Необяснимите физикохимични отнасяния на урпротена на Mr McBeau и еволюцията на болестта са описани от д-р McIntyre през 1850 г<sup>6</sup>, но 3г по-рано – през 1847 г. д-р Bence Jones вече е публикувал тази и още една подобна уринна находка в Lancet<sup>7</sup>. Д-р Bence Jones нарича необичайния протеин "hydrated duetoxide of albumin" и коментира неговото вероятно значение при други случаи с подобни костни поражения: "I need hardly remark on the importance of seeking for this oxide of albumen in other cases of mollities ossium"<sup>8</sup>. След смъртта му, от 1909 г. урпротеините при пациенти с MM с положителна реакция за обратна термореципитация, както и самата проба носят неговото име. До 1909 г. са описани над 40 случая с ВJ протеинурия. Зад този факт се крият новите познания за болестите на плазмочитната редица. W.Waldeyer през 1875 г. вече е описал плазматичните клетки в костния мозък<sup>9</sup>, а възпитаникът на Императорската медицинска академия (и по-късно и Ленински лауреат) генерал – лейтенантът от медицинската служба Михаил Иннокентьевич Аринкин (1876-1948) въвежда оригинален и прост метод (стерилната пункционна игла) за цитоморфологично изследване на костния мозък<sup>1,2,3</sup>.

Увеличават се и добре документираните съобщения за връзката между високия общ серумен белтък и заболяване с необичайна чупливост на костите "mollities and fragilitas ossium" –термин включващ до XIX век вродени или придобити нарушения на костната минерализация, вкл osteogenesis imperfecta. При аутопсията в бъбреците на Mr McBeau, главния потърпевш в историческото писмо, д-р John Dalrymple (1803-1852) и д-р McIntyre установяват особена субстанция „gelatin-form substance of blood red color and unctuous bone" по костите и особени промени в черния дроб, описани вече под името „lardaceous change" (първите данни за амилоидоза)<sup>10</sup>.

CERTIFIED COPY OF AN ENTRY OF DEATH GIVEN AT THE GENERAL REGISTER OFFICE  
Application Number 3543301-1

REGISTRATION DISTRICT MARYLEBONE  
1846 DEATH in the Sub-district of Cavendish Square in the County of Middlesex

Column	1	2	3	4	5	6	7	8	9
No.	When and where dead	Name and surname	Sex	Age	Occupation	Color of death	Signature, description and residence of informant	When registered	Signature of register
1	2nd of Nov 1846	James McBeau	M	45	Labourer	Black	James McBeau, Cavendish Square, Cavendish Square, 1846	2nd Nov 1846	William Bluff, Registrar

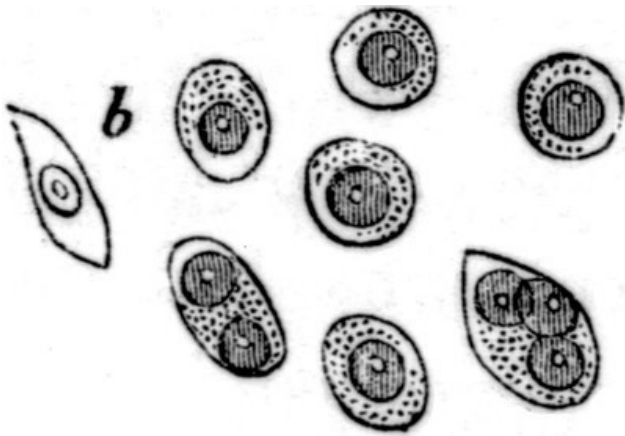
CERTIFIED to be a true copy of an entry in the certified copy of a Register of Deaths in the District above mentioned.  
Given at the GENERAL REGISTER OFFICE, under the Seal of the said Office, the 3rd day of October 2011

DVD 119881

CAUTION: THERE ARE OFFENCES RELATING TO FALSIFYING OR ALTERING A CERTIFICATE AND USING OR SCHEMING A FALSE CERTIFICATE THROUGH CORRUPTION  
WARNING: A CERTIFICATE IS NOT EVIDENCE OF IDENTITY.

### Смъртния акт на Mr McBeau.

Основните симптоми при Mr McBeau са осалгия, анемия, фрактури, отпадналост, измършавяване, хепатомегалия, анемия, диария, метеоризъм, диспепсия, отоци по лицето и крайниците. Като причина за смъртта е отбелязана „албуминурична атрофия" с протеинурия до 60 g/l



*Плазматични клетки по John Dalrymple от аутопсията на Mr McBean*

Предполага се, че първите подробни данни за новото заболяване са на д-р Samuel Solli, описани при 2 пациенти през 1844 г.<sup>11</sup>. Наименованието на заболяването с основни органи мишени – костите и бъбреците е дадено от украинския хирург Йосип/Юзеф Олександрович Рустичкий (1839 – 1912). Освен като военен хирург във френско-пруската война, Рустичкий специализира в Петербург, а по-късно в Страсбург в лабораторията на Friedrich von Reclinghausen. Избран е за професор по хирургия към Казанския и Киевския медицински факултети. През 1873 г. J.von Rustizky описва отделни туморовидни формации при 47г пациент ангажиращи дясната темпорална област с прорастване в очната орбита и офталмоплегия, в 6-ти торакален прешлен с параплегия, в ребрата, манубриума и раменната кост. Тези находки заедно с микроскопската находка Rustizky нарича „multiples myeloma“<sup>12</sup>.

През 1889г Otto Kahler, интернист от Прага и асистент на известния проф Halla, описва подробно друг подобен случай<sup>13</sup>. Доктор Kahler завършва своята академична кариера като професор в медицинския университет във Виена. Неговото наблюдение е не само аналогично, но и с положителна проба на ВJ за уроротеина. На Rustizky и Kahler не само дължим името на заболяването, но и двамата изказват в публикациите са убедени за „връзката между ВJ протеинурията и характерните костни поражения“.

През 1922 г. Вауне-Jones & Wilson доказват, че уроротеина от различни пациенти с ММ реагира по 2 начина със заешки антисерум и разграничават два типа ВJр – тип „1“ и тип „2“<sup>14</sup>. През 1956 г. с помощта на нововъведения от Ouchterlony метод, Korngold and Lapiro потвърждават разликите и наричат двата типа уроротеини ВJ „к“ и ВJ“л“- наименования (може би заради тяхните имена) употребявани и днес<sup>15</sup>.

И все пак отговор на поставения в историческото писмо въпрос няма. М-градиентът в серум и/

или урина при мултиплиения миелом и пробата на ВJ са вече диагностични критерии, благодарение на електрофоретичния метод на A.Tiselius (1902-1971), бъдещ Нобелов лауреат<sup>16</sup>. В един и същи брой № 70 на списанието J.Expr Med, освен методиката на A.Tiselius, в друга статия колективът на Lewis Langsworth (1904-1981) за първи път характеризира класическия М-пик при мултиплен миелом<sup>17</sup>. През 1960 г. Waldenström въвежда понятието „парапротеин“ за абнормната белтъчна субстанция, добило широко разпространение и използвано до днес<sup>18</sup>.

Ретроспективният преглед за проучванията на ВJ протеините в края на XIX и първата половина на XX век са впечатляващи. Въпреки това, все още не е била известна природата, структурата и произхода на ВJр. Едва след повече от век, през 1962 г. медицинската наука в лицето на Edelman, Gally, (1962) и Solomon (1964) отговаря на въпроса на д-р Watson и д-р McIntyre<sup>21,22,23</sup>. В продължителни проучвания тримата учени доказват, че т.нар Vence Jones протеини със своите необичайни термореципитационни свойства, „са свободни леки вериги на имуноглобулини, синтезирани в излишък и излъчени в урината“.

В родната литература проблемът е разгледан подробно в монографията „Диспротеинемии“ (1966г) по редакцията на проф д-р Иван Вапцаров, ръководител Катедра Педиатрия във ВМИ „И.П.Павлов“ – Пловдив<sup>22</sup>. Данните, подкрепени със собствени наблюдения и лабораторни изследвания, са изключително интересни за времето. Показана е характеристиката и лабораторната методика на основните отклонения в белтъчния профил при заболявания на плазмоцитната редица. В раздела „Протеинурии“ написани от неговия сътрудник д-р Иван Дюкмеджиев е дадена методологично и теоретично издържана една от най-прецизните имуноелектрофоретични класификации до днес на протеинуриите: физиологична, тубулна, гломерулна, смесена<sup>23</sup>. В отделните варианти е посочено и анализирано присъствието на леките вериги (ЛВ) в уроротеина при разнообразни болестни състояния. Десетилетия наред това е настолната книга за много български клиницисти и лабораторни лекари.

С тези публикации първата глава от одисеята за ВJ-протеинурията завършва. На 19 юни 1993г на образователния „Robert A Kyle симпозиум“ за моноклоналните гамапатии самият д-р Kyle изнася пред 193 студенти, специализанти и хематолози тази впечатляваща история – „How did it begin“<sup>25</sup>. Встъпителната лекция е посрещната с огромен интерес и чувство на професионална гордост.

*Историята продължава...* През 80<sup>те</sup>-90<sup>те</sup> години на XX век развитието на познанията за биологията на ВJр е лавинообразно. Само за 2 десетилетия са уточнени структурната и физикохимична хетерогенност на ЛВ, тяхната аминокиселинна последователност и пространствено разположение в

първичната, вторичната и третичната им конфигурация, ендегенния им метаболизъм в норма и патология в епителните клетки на проксималните тубули. Доказа се патогенетичното им значение с особения тропизъм към отложения в различни тъкани и органи, където формират т.нар **амилоидни, нефритогенни и кристалоидни отложения**. Тези депозити (*Light chain deposition disease & AL-amyloidosis*) се оказват „строго детерминирани“. В експериментални проучвания характеристиката на вероятни лековерижни депозити може да бъде предварително определена и дори осъществен „пренос“ на лековерижна болест. Разгадаха се копреципитиращите им свойства в тубулния просвет на бъбреците, където образуват отливъчни цилиндрични преципитати или т.нар *cast nephropathy* (морфологичния субстрат на миеломния бъбрек). Тези патогенетични свойства на ЛВ ги превърнаха малигнен биологичен маркер. Нещо повече – доказаната супресия на изотиповете на ЛВ в ранните стадии на В-лимфоцитната диференциация е показател за клоналност на клетъчната популация. Съотношението  $\kappa : \lambda$  е задължителен показател в строгите съвременни критерии за ремисия при болестите на плазмотичната редица<sup>26</sup>.

Всички тези нови данни са резултат от проучвания с най-съвременната методология и надградени върху старите познания, изградени „стъпка по стъпка“ в продължение на столетие. Не може да не се отдаде дължимото на плеядата изтъкнати лекари от XIX и началото на XX век. Независимо от техните интереси, фундаменталните им познания в тогавашната медицина и широкия клиничен поглед са им дали дарба за уникални наблюдения, блестящи описания, оригинални предположения, въвеждането на нови диагностични и терапевтични методи. Колкото и критично да подходяме към техните лекции, учебници, публикации, дисертации или научни трудове се налага един извод: каквото и да се казали или брилянтно описали, не са сгрешили. И то остава и до днес...

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Kyle RA. Multiple myeloma: an odyssey of discovery *Br J Haematol* 2000; 111: 1035-44.
2. Bradwell AR, Mead GP, Carr-Smith HDM. Dr Bence Jones and the history of free light chain. In *Serum free light chain analysis 3rd Edition* 2005
3. Roshni Rathore, Robert A. Coward, Alexander Woywodt What's in a name? Bence Jones protein *Clin Kidney J.* 2012; 5: 478-483
4. Rosenfeld L. Henry Bence Jones (1813-1873): „the best chemical doctor“ in London. *Clin Chem* 1987.
5. Kyle RA Henry Bence Jones – Physician, Chemist, Scientist and Biographer: A man for all seasons *Br J Haematol* 2001, 115, 13-18
6. MacIntyre W. Case of Mollities and Fragilitas Osseium, accompanied with urine strongly caharget with animal matter. *Med Chir Tran Lon*; 1850:211-232.
7. Jones HB. Papers on Chemical Pathology, Prefaced by the Gulstonian Lectures, read at the Royal College of Physicians Lecture III *Lancet* 1847; II 88-92
8. Jones HB. On the new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium *Phylosophical Transactions of the Royal Society of London series B Biological Sciences* 1848; 138: 55-62
9. Waldeyer W. Uber Bindegewebszellen. *Archiv fur Microliologie und Anatomie.* 1875; 11: 176-194
10. Dalrymple J. On the microscopical character of mollities ossium. *Dublin Q J Med Sci* 1846; 2: 85-95.
11. Solly S: Remarks on the pathology of mollities ossium: with cases *Med Chir Trans Lon* 1844; 27:435-461
12. von Rustizky J. Multiples myelom *Deutsch Z Chir* 1873; 3:162-172
13. Kahler O Zur symptomatologie des multiplen myeloms *Beobachtung von albuminurie* *Prager Med Wschr* 1889; 14: 33-35
14. Bayne-Jones S, Wilson DW Immunological reaction of Bence Jones proteins II Differences between Bence Jones proteins from various sources *Bulletin of the John Hopkins Hospital* 1922; 33: 119-272
15. Korngold L, Lapiro R Multiple myeloma proteins II The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gamma-globulin and cancer multiple myeloma serum proteins *Cancer* 1956; 9: 262-272
16. Tiselius A, Kabat EA. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations *J.Exp Med*; 70: 119-131.
17. Longsworth LG, Shedlovsky T, MacInnes DA Electrophoretic patterns of normal and pathological blood serum and plasma *J.Exp Med*; 70: 399-413.
18. Waldenstrom J. Studies on conditions associated with disturbed gamma globulin formation (gammopathies) *Harvey Lect.* 1960;56:211-231.
19. Edelman GM, Gally JA The nature of Bence Jones proteins: chemical similarities to polypeptide chain of myeloma globulins and normal gamma-globulin *J Exp Med* 1962; 116: 207-227.
20. Gali JA, Edelmann GM. Physicochemical properties of Bence Jones proteins. *Biochim. Biophys Acta.* 1965; 94: 175-185
21. Solomon A, Fahey JL. Bence Jones proteinuria. *Am J Med* 1964; 37: 206-14
22. Вапцаров И, Савов С Диспротеинемии Издателство Хр Г Данов 1966
23. Дюкмеджиев И. Протейнурии В кн Диспротеинемии. Под ред И Вапцаров Пловдив, Хр Г Данов 1973; 63-82
24. Kyle RA Multiple myeloma: how did it begin? *Mayo Clin Proc.* 1994 Jul;69(7):680-3.
25. Горанов С. Литературен обзор в дис. труд „Бъбречна недостатъчност при мултиплен миелом: патогенетични фактори, клинична характеристика, терапевтично повлияване, прогностично значение“. Пловдив, 2009г

**ПРОМЕНИ В СТРУКТУРАТА И ФУНКЦИЯТА НА КОАГУЛАЦИОНЕН ФАКТОР VIII ПРИ ХЕМОФИЛИЯ ТИП А, ПРЕДИЗВИКАНА ОТ ИНВЕРСИЯ 22 В ГЕН F8**

**Венцеслав Р. Атанасов<sup>1</sup>, Светлана Х. Христова<sup>2,3\*</sup>, Александър М. Живков<sup>2</sup>**

1-Национална генетична лаборатория, УСБАЛАГ „Майчин дом“, МУ – София

2-Институт по Физикохимия „Акад. Ростислав Каишев“ – Българска академия на науките

3-Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания – София

\* Автор за кореспонденция

**ALTERATIONS IN THE 3D-STRUCTURE AND FUNCTION OF THE COAGULATION FACTOR VIII AT HAEMOPHILIA A CAUSED BY INVERSION 22 IN THE F8 GENE**

**Ventseslav R. Atanasov<sup>1</sup>, Svetlana H. Hristova<sup>2,3\*</sup>, Alexandar M. Zhivkov<sup>2</sup>**

1-National Genetic Laboratory, University Hospital of Obstetrics and Gynecology “Maichin Dom”,  
Medical University-Sofia

2-“Rostislav Kaishev” Institute of physical chemistry, Bulgarian academy of sciences, Sofia, Bulgaria

3-National Specialized Hospital for Active Treatment of Haematological Diseases, Sofia, Bulgaria

\* Corresponding author

**Въведение.** В каскадата на кръвосъсирване активираните форми на коагулационните фактори VIIIa и IXa образуват мембранно свързан комплекс (теназа) с ензимна активност. Над 50% от тежките форми на хемофилия А се дължат на инверсия 22 в ген F8, кодиращ фактор VIII, чиято активна форма VIIIa е трансмембранен протеин с пет домена. В резултат на тази мутация настъпват промени в структурата на фактор VIII, като в мутантния фактор VIII\* липсва домен C2, а от C1 домена остава малък фрагмент със значително променена първична структура.

**Цел.** Да се анализират промените в третичната структура на мутирания чрез инверсия 22 коагулационен фактор VIII\* и взаимодействието му с модел на тромбоцитната мембрана.

**Материали и методи.** (1) Беше въведен и оптимизиран I-PCR като диагностичен метод за скриниране на Inv22 в 3 стъпки: 1. BclI рестрикция; 2. Лигиране на рестрикционните фрагменти и образуване на BclI пръстени; 3. Мултиплексен PCR с 3 праймера. Визуализацията на получените PCR-продукти беше осъществена на UV- трансилюминатор след протичане на стандартна агарозна гел-електрофореза. (2) Детайлно характеризиране на триизмерната (3D) структура на мутантния фактор VIII\* със следните свъръри: PEP-FOLD 2.0 за предсказване на 3D-структурата на мутантния C1\* домен, SuperPose Version 1.0 за сравнение на 3D-структурите на мутантния C1\*-фрагмент с C1 и C2 домените на функционално-активния протеин VIIIa. (3) Макромолекулен докинг на мутантния C1\*-фрагмент към моделна анионна липидна мембрана с Membrane Builder, основан на програмата CHARMM.

**Резултати.** Скринингът за Inv22 показва 30 % честота на инверсия с участие на интрон 22. Промяната в първичната структура на мутантния C1\*-фрагмент води до намаляване на неговата хидрофобност с около 60%. Сравнението на 3D-структурите с C1 и C2 домените на функционално-активния протеин VIIIa, показва промяна в третичната структура на мутантния C1\*-фрагмент. Макромолекулният докинг показва, че този фрагмент не може да се вгради в моделна анионна липидна мембрана. От тук следва изводът, че причината за Хемофилия тип А, дължаща се на инверсия с участие на интрон 22 в ген F8, е липсата на ензимна активност на факторите VIIIa и IXa поради

невъзможност за образуване на мембранно-свързан комплекс на тези два протеина.

**Изводи.** Променената първична структура на мутирания чрез инверсия с участие на интрон 22 в ген F8 коагуляционен фактор VIII\* води до драстична загуба на хидрофобни аминокиселинни остатъци, поради което този протеин не може да се възражда в плазматичната мембрана на тромбоцитите. Това е причината той да не образува активен комплекс (теназа) с фактор IX, което блокира каскадата от ензимни реакции, водещи до кръвосъсирване и съответно до появата на типичната клинична картина на хемофилия А.

**Ключови думи.** хемофилия А, инверсия 22 в ген F8, мутантен коагуляционен фактор VIII, макромолекулен докинз

**Introduction.** The activated coagulation factors VIIIa and IXa form membrane bounded complex (tenase) having enzyme activity in the coagulation cascade. The VIIIa-factor is a transmembrane protein with five domains. Inversion 22 in the F8 gene, coding factor VIII, accounts for above 50 % of severe cases of Haemophilia A. This mutation results in appearing of mutant factor 22-VIII\*, in which C2-domain is absent, and only a small fragment with drastically changed primary structure remains from the C1-domain.

**Aim.** To be analyzed the changes in the 3D-structure of the mutant coagulation factor 22-VIII\* and it's interaction with the thrombocyte membrane.

**Materials and methods.** (1) An inverse PCR (I-PCR) was optimized and introduced as a diagnostic method for Inv22 screening, involving 3 steps: (1.1) BclI restriction; (1.2) Self-ligation of restriction fragments, providing BclI rings; (1.3) Multiplex PCR using 3 primer pairs. The visualization of the resulting PCR products was performed on a UV-transilluminator after a standard agarose gel electrophoresis. 30 patients with clinically verified severe form of Haemophilia A were tested for Inv22 by I-PCR.

(2) The 3D-structure of the mutant factor VIII\* was characterized in detail by the following servers: (2.1) PEP-FOLD 2.0 for prediction of 3D-conformation of the mutant C1\*-domain; (2.2) SuperPose Version 1.0 for comparison of the 3D-structures of the mutant C1\*-fragment with C1 and C2 domains of the functionally active protein VIIIa; (2.3) Macromolecule docking of the mutant C1\* fragment to a model anion lipid membrane employing Membrane Builder, based upon the program CHARMM.

**Results.** The Inv 22 screening by I-PCR showed 30 % frequency of the large inversion with intron 22. The change in the primary structure of the mutant C1\* fragment leads to reducing of it's hydrophobicity with approximately 60 %. The comparison between the mutant C1\*-fragment with C1 and C2 domains of the functionally active protein VIIIa shows change in its 3D-structure. The macromolecule docking indicates that this mutant fragment cannot build in anion lipid membrane. Consequently, the reason for Haemophilia A, caused by Inversion 22 in the F8 gene, is the absence of enzyme activity of the coagulation factors VIII\* and IXa because of disability to form a membrane bounded complex by this proteins.

**Conclusion.** The Inversion 22 in the F8 gene causes a drastic alteration in the primary and 3D-structure of the coagulation factor VIII\* by loss of its two domains with hydrophobic aminoacid residues; that is why the protein globule cannot bind to the cell membrane of the thrombocytes. This is the reason not to form an active tenase complex with factor IXa. This impossibility leads to blocking of the cascade of enzyme reactions (resulting in blood coagulation in the healthy individuals) and to manifestation of the clinical picture, specific for Haemophilia A.

**Key words.** Haemophilia type A; Inversion 22 in F8 gene; Mutant coagulation factor VIII; Computer simulations; Protein docking to lipid membrane.

---

## УВОД

Кръвосъсирването е сложен, многостъпален процес, в който се включват 13 коагуляционни фактора. Фактор осем (VIII) се синтезира от чердробните ендотелни клетки. В кръвта циркулира в неактивна форма, като хетеродимер, съставен от една тежка верига (A1, A2 и В домени) и една лека верига (A3, C1 и C2 домени). Неактивната форма на фактор VIII е свързана с фон Вилебранд-фактора, който го стабилизира и насочва към местата с увреждания. Активирането на фактор VIII включ-

ва протеолитично разграждане посредством тромбин и фактор IXa [1]. Това води до освобождаване на фон Вилебранд-фактора и свързването му към фосфолипидната мембрана на тромбоцитите. Активираните фактор VIIIa и IXa формират мембранно свързан ензимен комплекс (теназа), катализиращ активирането на фактор X. Свързването към липидния бислой е от съществено значение за функцията и активността на този комплекс [2]. Ролята на фосфолипидната мембрана е както да увеличи локалната концентрация на двете белтъчните макромолекули от комплекса, така и да

осигури оптимална им взаимна пространствена ориентация, така че да настъпи ефективно взаимодействие между тях [3].

Хемофилия тип А се дължи на намалена синтеза и/или промени в структурата и функцията на коагулационния фактор VIII, като приблизително половината от тежките форми се дължат на инверсия с участие на интрон 22, докато останалите 50 % се дължат на различни други мутации включително делеции, инсерции и точкови мутации [4, 5].

Инверсията с участие на интрон 22 в ДНК води до отсъствие на С2 домена в мутантната протеинова макромолекула и до скъсяване на С1 домена и промяна в неговата първична структура [6]. Домените С1 и С2 са отговорни за свързването на активирания фактор VIIIa към тромбоцитната мембрана [7]. Това свързване се обуславя както от хидрофобните взаимодействия между опашките на липидите и хидрофобните аминокиселинни (АК) остатъци в полипептидната верига, така и от електростатичните сили на привличане между положително заредените групи в белтъчната макромолекула (лизинови и аргининови АК-остатъци) и отрицателно заредените глави на фосфатидилсерина и другите кисели мембранни липиди.

В настоящето изследване се анализират промените в третичната структура на мутирания чрез инверсия коагулационен фактор VIII\* и взаимодействието му с тромбоцитната мембрана, като за целта е използван молекулен докинг на мутантния белтъчен фрагмент С1 и моделна анионна липидна мембрана.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Бяха изследвани 30 пациенти и техни родственици с потвърдена клинична диагноза „тежка форма на хемофилия А“ след предварително дадено писмено информирано съгласие. Геномната ДНК беше изолирана от левкоцити във венозна кръв по метод за екстракция на ДНК чрез изсолване на наличните белтъци. За провеждане на генетичния анализ беше въведен и оптимизиран I-PCR като диагностичен метод за скриниране на Inv22 в 3 стъпки: (1) BclI рестрикция; (2) лигиране на рестриционните фрагменти и образуване на BclI пръстени; (3) мултиплексен PCR с 3 праймера [8, 9]. Визуализацията на получените PCR-продукти беше осъществена на UV- трансилюминатор след протичане на стандартна агарозна гел-електрофореза.

Моделирането на триизмерната структура на мутантния фрагмент 8 беше осъществено на базата на първична структура във Fasta формат (HGVLKNGKNWEPYR) посредством PEP-FOLD 2.0. [10] Предсказването на третичната структура се основава на статистическото наслагване на

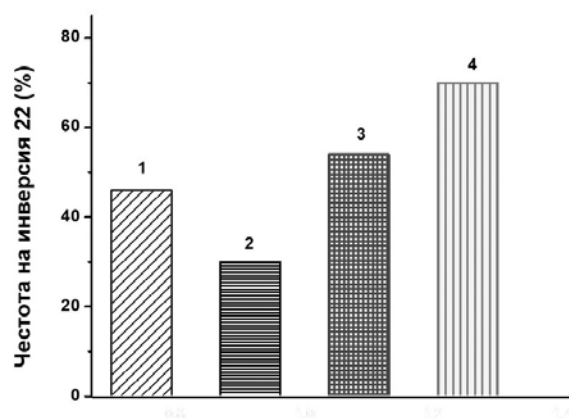
пептидни фрагменти съставени от 4 АК-остатъка и минимизиране на свободната енергия.

Сравняването на триизмерните структури на моделирания мутантен фрагмент С1 от FVIIIa и нативните фрагменти С1 и С2 беше осъществено със SuperPose Version 1.0 [11], който е сървър за съпоставяне на третични структури на белтъчни макромолекули, основан на модифициран кватернионен подход с висока точност.

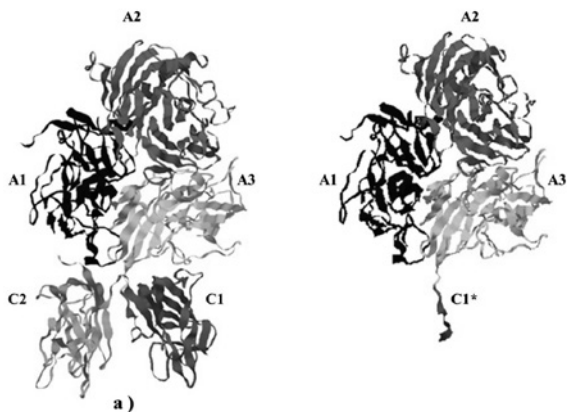
Молекулният докинг на 16-аминокиселинния С1\*-фрагмент на мутантния фактор VIII\* бе осъществен посредством сървъра Membrane Builder, които се основава на програмата CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) [12], предназначена за макромолекулни симулации на атомно ниво. Симулацията е проведена при физиологични условия рН 7,4, концентрация на NaCl 0,15 М и температура 37°C.

## РЕЗУЛТАТИ

На фиг. 1 е представена честотата на мутацията инверсия с участието на интрон 22 в България, проведено върху 30 пациента с клинично доказана тежка форма на Хемофилия тип А, в сравнение с известните в литературата подобни случаи. От тези данни се вижда, че честотата на тази мутация е по-ниска за България, което вероятно отразява териториално-специфични различия и отчасти може да се дължи на ограничения размер на извадката.



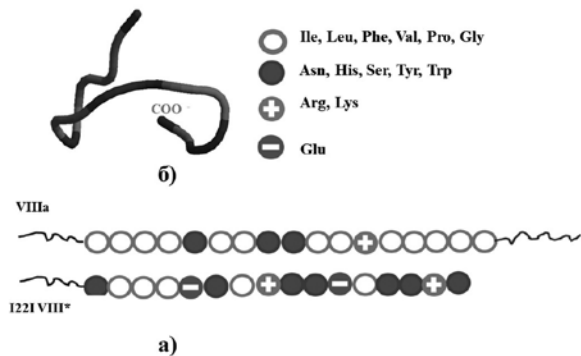
Фиг. 1. Честота на инверсия 22 в ген F8 (1 наличие и 3 отсъствие на мутацията в световен мащаб, 2 наличие и 4 отсъствие в настоящия скрининг).



**Фиг. 2.** Молекулна структура на: (а) функционален фактор VIIIa (4bdv PDB код) и (б) мутирал чрез инверсии 22 в ген F8 фактор VIII\* (22-VIII\*). В мутантния 22-VIII\*-фактор C1\*-домейнт включва 4 АК-остатъка, идентични с тези на показания в зелено C1-домейн на функционално-активния фактор VIIIa, както и различния по състав C-краен пептиден фрагмент от 16 аминокиселинни остатъка.

На фиг. 2а (вляво) е показана третичната структура на функционално-активния FVIIIa-фактор, който е хетеротример, съставен от 5 домейна: A1, A2 и A3 домейни в глобуларната част на протеиновата макромолекула, както и страничните домейни C1 и C2 с които протеинът се свързва с тромбоцитната мембрана. На фиг. 2б (вдясно) е представена третичната структура на мутантния протеин 22-VIII\*, възникнал в резултат от инверсия в интрон 22 в кодиращия го ген F8. Вижда се, че тази мутация води до загуба на целия C2 домейн и по-голямата част от C1 домейна, които е съкъсен с 44 АК-остатъка, като от него остават непроменени само 4 АК-остатъка (оцветени в зелено) и един малък фрагмент от 16 АК-остатъка със значително променена първична структура (представена в червено).

На фиг. 3а е представена схематично промяната в първичната структура на мутантния 16-АК пептиден фрагмент на фактор 22-VIII\*. Броят на хидрофобните АК-остатъци (оцветени в жълто) намалява от 13 на 5, т.е. с повече от 60 %, като нараства приносът на хидрофилните незаредени (оцветени в зелено) и заредените положително (в червено) и отрицателно (в синьо) АК-остатъци. На базата на тази първична структура, пренаписана в Fasta-формат, е генерирана 3D-структура посредством програма за предсказване на третичната структура на пептиди в нейния съвършен вариант (PEP-FOLD 2.0). Програмата генерира 5 моделни структури, като от тях, на принципа на минимизиране на свободната енергия, беше избрана най-вероятната (Фиг. 3б).



**Фиг. 3.** (а) Сравнение на първичната структура на фрагмента от 16 аминокиселинни остатъка на функционално-активния коагуляционен фактор VIIIa и на мутантния 22-VIII\*-фактор. Хидрофобните аминокиселинни остатъци са представени като жълто оцветени празни кръгчета, незаредените хидрофилни – като зелени пълтни, положително заредените – червени със знак плюс, и отрицателно заредените – сини с минус. (б) Получена чрез компютърно моделиране триизмерна структура на мутантния 16-аминокиселинен фрагмент (цветовете са аналогични с тези на фиг. 3а).

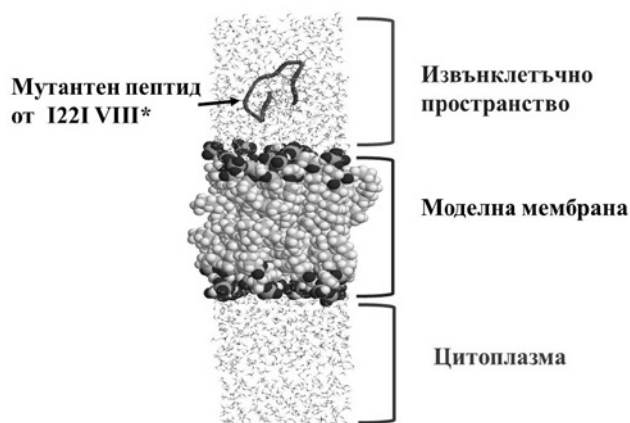
За да се сравнят пространствено триизмерните структури използвахме програмата SuperPose Version 1.0. Тя се основава на кватернионният подход. Кватернионите са суперкомплексни числа, които се използват за описване на движението в триизмерно пространство. Посредством тях сложните геометричните уравнения се преобразуват в по-прости алгебрични изрази. Интересен е фактът, че кватернионите са открити от известния ирландски физик и математик Уилям Роуън Хамилтон през далечната 1843 година. Днес, 175 години по-късно, те намират приложение в модерни сървъри за триизмерно (3D) сравнение на белтъчни макромолекули (в това число и мутантни), осигурявайки висока точност и бързина на изчисление.



**Фиг. 4.** Сравнение на триизмерните структури на C1 и C2 домейните на функционално-активния коагуляционен фактор VIIIa (показани с тънка линия, в жълто са оцветени хидрофобните аминокиселинни остатъци) и 16-аминокиселинния фрагмент (представен с дебела зелена крива) от мутантния 22-FVIII\*-фактор.

На фиг. 4 е представена суперпозицията на 3D-структурите на мутантния 16-АК фрагмент с С1 и С2 домените от нативния VIIIa-фактор. Ясно се вижда, че има драстична промяна в структурата на мутантния протеин: от него отпадат множество хидрофобни АК-остатъци, влизачи в състава на С1 и С2 домените, които са от ключово значение за взаимодействието на този коагулационен фактор с фосфолипидната мембрана на тромбоцитите.

Въпреки това, съществува малка вероятност мутантния С1\*-домен да взаимодейства с тромбоцитната мембрана посредством своя С-краен 16-АК фрагмент. За да проверим дали това наистина е възможно, бе проведен белтък-липиден докинг посредством програмата CHARMM, с която работи сървърът Membrane Builder.



Фиг. 5. Белтък-липиден докинг на 16-аминокиселинния С-краен остатъчен фрагмент от С1\*-домена на мутантния 22-VIII\*-фактор с анионен липиден бислой.

Съдейки по рязко намалената дължина на полипептидната верига, намаления брой на хидрофобните АК-остатъци и увеличения брой на хидрофилните (фиг. 3а), мутантният белтъчен фрагмент на С1\*-домена не може да се вгради в хидрофобната сърцевина на липидния бислой, където са разположени опашките на фосфолипидите. Това очакване се потвърждава от компютърната симулация, представена на фиг. 5, където е визуализирано усреднено по времето положение на мутантния С-краен пептиден фрагмент от С1\*-домена при взаимодействието му с моделна анионна липидна мембрана. Нещо повече, белтък-липидният докинг ясно показва, че мутантният фрагмент (остатък от С1-домена) не се свързва и електростатично с отрицателно заредения фосфолипиден бислой. Получените моделни резултати, са в пълно съответствие с известните в литературата експериментални данни, получени с флуоресцентни методи [7], които показват, че мутантният 22-VIII\* коагулационен фактор не се свързва с тромбоцитите.

## ДИСКУСИЯ

Фосфолипидната мембрана на тромбоцитите има важна роля за взаимодействието между VIIIa и IXa факторите на кръвосъсирване при образуването на комплекса теназа, притежаващ ензимна активност. Тези два фактора са трансмембранни протеини, притежаващи хидрофилна глава и хидрофобна котва, чрез която те се свързват към тромбоцитната мембрана. Нейната роля се свежда до увеличаване на локалната концентрация и вертикална ориентация на главите на двата протеина, което осигурява формирането на ензимно-активния комплекс теназа на двата коагулационни фактора VIIIa и IXa.

Получените резултати показват, че мутантният 22-VIII\*-фактор не се вгражда в анионен фосфолипиден бислой, каквато е тромбоцитната мембрана. Причините за това са следните:

(1) Вследствие на настъпилата мутация в интрон 22 на ген F8, в структурата на мутантния протеин 22-VIII\* изцяло отсъства С2-доменът (фиг. 2а), който е богат на хидрофобни АК-остатъци и в нативния активиран фактор VIIIa функционира като трансмембранен полипептид. Този домен е своеобразна котва, която задържа голямата белтъчна макромолекула на хетеротримера към мембраната на тромбоците.

(2) В структурата на мутантния С1\*-домен на 22-VIII\*-фактора също настъпват големи изменения, като основната част от полипептидната верига липсва, а в остатъчната част от 20 АК-остатъка е намалено съотношението на хидрофобните към хидрофилните остатъци, като хидрофобността на мутиралия участък от 16 АК-остатъка в С1\*-фрагмента е намалена с повече от 60% в сравнение с аналогичния му участък в С1-домена на функционално-активния VIIIa-фактор. Отсъствието на по-голямата част от хидрофобни АК-остатъци в мутиралия протеин възпрепятства белтък-липидното взаимодействие.

## ИЗВОДИ

Променената първичната структура на мутантният 22-VIII\* коагулационен фактор води до драстична загуба на хидрофобни АК-остатъци, поради което този протеин не може да се вгражда в плазматичната мембрана на тромбоцитите. Това е причината той да не образува активен комплекс (теназа) с фактор IX, което блокира каскадата от ензимни реакции, водещи до кръвосъсирване. Т.е. генетичната мутация в ДНК, предизвикана от инверсия с участието на интрон 22 в ген F8, е причината за проявата на тежка форма на Хемофилия тип А.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Fay PJ. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Reviews*. 2004 Mar 1;18(1):1–15.
2. Gilbert GE, Arena AA. Activation of the Factor VIIIa-Factor IXa Enzyme Complex of Blood Coagulation by Membranes Containing Phosphatidyl-L-serine. *J Biol Chem*. 1996 Oct 5;271(19):11120–11125.
3. Saenko EL, Shima M, Sarafanov AG. Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends Cardiovasc Med*. 1999 Oct;9(7):185–192.
4. Lakich D et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature Genetics*. 1993 Nov;5(3):236–241.
5. Naylor J et al. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum Mol Genet*. 1993 Nov;2(11):1773–1778.
6. Pandey GS et al. Synthesis of FVIII in Hemophilia-A patients with the intron-22-inversion may modulate immunogenicity. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1318–1324.
7. Wakabayashi H, Fay PJ. Molecular Orientation of Factor VIIIa on the Phospholipid Membrane Surface Determined by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biochem J*. 2013 Jun 1;452(2):293–301.
8. Rossetti LC et al. Genotyping the hemophilia inversion hotspot by use of inverse PCR. *Clin Chem*. 2005 Jul;51(7):1154–1158.
9. Atanasov V et al. Inversion 22 screening in the coagulation Factor VIII gene in Bulgarian patients with severe form of Hemophilia A. *Scn. and tech*. 2017 Jul; 7(3):153-161.
10. Thévenet P et al. PEP-FOLD: an updated de novo structure prediction server for both linear and disulfide bonded cyclic peptides. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jul;40(Web Server issue):W288-293.
11. Maiti R et al. SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W590–594.
12. Jo S, Kim T, Im W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLOS ONE*. 2007 Sep 12;2(9):1-9.

### Адрес за кореспонденция

Светлана Христова Христова

Имейл: [phd.s.hristova@gmail.com](mailto:phd.s.hristova@gmail.com)

Тел: 0889 301 286

## ДИАГНОСТИЧНИ ВЪЗМОЖНОСТИ НА PET СПРЯМО СТ ПРИ СТАДИРАНЕ НА ДЕЦА И ЮНОШИ С ХОДЖКИНОВ ЛИМФОМ

Д-р Л. Чавдарова<sup>1</sup> дм, Проф. Д-р Р. Клуге<sup>2</sup>, Доц. Д-р А. Найденов<sup>3</sup>, Проф. Д-р Е. Пиперкова<sup>1</sup>, дмн

1-Клиника по Нуклеарна медицина, УСБАЛ по Онкология-ЕАД, София

2-Клиника и поликлиника по Нуклеарна медицина, Медицински Университет –  
гр. Лайпциг, Германия

3-УНСС – София, Катедра «Статистика и иконометрия»

## DIAGNOSTIC POSSIBILITIES OF PET VS CT IN THE STAGING OF CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH HODGKIN'S LYMPHOMA

L. Chavdarova<sup>1</sup>, R. Kluge<sup>2</sup>, A. Naydenov<sup>3</sup>, E. Piperkova<sup>1</sup>

1-Clinic of nuclear medicine, USHATO, Sofia

2-Clinic and Polyclinic of nuclear medicine, Medical University, Leipzig, Germany

3-University of National and World Economy, Sofia

---

**Резюме.** Ходжкиновият лимфом (ХЛ) е рядко заболяване (~1% в структурата на онкологичните заболявания) с характерен пик в детско-юношеска възраст и втори > 55г. Засягането на младата възраст от една страна и увеличаването на преживяемостта благодарение на съвременните терапевтични подходи от друга, са съществени предизвикателства за клинициста, с оглед подсигуриране не само на дълготрайна ремисия и оздравяване, но и ограничаване на свързаната с терапията токсичност, която би нарушила качеството и продължителността на живота на пациента. Прецизната диагностика и стадиране в лицето на съвременните образни методи имат ключова роля в определянето на лечебните схеми и прогноза. Хибридната PET/CT, съчетавайки информация за функция и структура на злокачествено променените тъкани, се превръща в незаменим инструмент в диагностичния алгоритъм при редица онкологични заболявания. Сравнението на възможностите на PET спрямо конвенционално наложилата се като основен диагностичен метод компютърна томография (КТ, СТ) е особено уместно в контекста на съвременния подход за индивидуализиране на терапията при ХЛ в детска възраст. В настоящото проучване PET се показва като много чувствителен и точен диагностичен метод, открива повече лимфомни лезии в сравнение с КТ, прецизира стадирането и създава предпоставки за по-коректна във физиологичен аспект функционално-метаболична оценка на терапевтичния отговор.

**Abstract.** Hodgkin's lymphoma (HL) is a rare disease (~1% from all oncologic entities) and has two peaks – one specific peak in children and adolescents and second in the age > 55 y. The affection of young age on one hand and the increased survival rates on the other, represent significant challenges for the clinicians. They have to ensure not only long-term remission and convalescence but also a reduction of therapy-related toxicity which would otherwise deteriorate patients' quality of life. Precise diagnostics and staging brought by modern imaging methods play a key role in defining therapeutic protocols and prognosis. Hybrid PET/CT, combining information about function and structure of malignant tissues, is already an irreplaceable instrument in the diagnostic algorithm of plenty of oncologic diseases. The comparison between PET and conventional CT is especially appropriate in the context of contemporary individualization therapy approach in paediatric HL. In the current study PET proves to be a very sensitive and accurate diagnostic method, revealing more lymphoma lesions than CT, leading to a more precise staging and premising a more correct in physiological aspect functional-metabolic assessment of therapeutic response.

---

## ВЪВЕДЕНИЕ

Ходжкиновият лимфом (ХЛ) в детско-юношеска възраст е сред малкото онкологични заболявания с отлична прогноза след проведено адекватно лечение. Същевременно той изисква модерни риск-адаптирани терапевтични протоколи за избягване на късни, свързани с лечението, нежелани ефекти. В последните десетилетия подобни протоколи са въведени успешно в клиничната практика (1-6), с намаляване на лъчетерапевтичните дози и обеми, както и на страничните ефекти от химиотерапията. Ключова роля в общия алгоритъм имат точното стадиране и определяне на обемите, подлежащи на лечение, т.к. степента на разпространение на заболяването е сред най-важните фактори, определящи лечението и прогнозата на лимфомите. Няколко проучвания в последното десетилетие (7-10) имаха за цел да направят директно сравнение между  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET и конвенционалния диагностичен алгоритъм, използвайки предимно компютърната томография (КТ, СТ) като всеприет стандарт. Всички те потвърдиха ролята на PET като точен диагностичен метод. Въвеждането в клиничната практика на съвременните хибридни образни методи отхвърли инвазивни стадиращи подходи като лапаротомията, спленектомията, а напоследък дори костно-мозъчната биопсия и все повече изместват самостоятелната СТ (11). При  $^{18}\text{F}$ -FDG-натрупващите („авидни“) ХЛ и неходжкинови лимфоми (НХЛ), PET/CT подобрява точността на стадиране сравнено с конвенционалната КТ както за нодално, така и за екстранодално ангажиране (12-13). При деца и юноши с ХЛ Kabickova et al. (7) установяват чувствителност за PET спрямо конвенционалните стадиращи нерадионуклидни методи съответно 96.5% и 87.5%, специфичност 100% и 60% и точност 96.7% и 85.2%. Проведена с нискодозова КТ (ндКТ) (40-80 mAs) без контрастно усилване, PET/CT се показва като по-чувствителен и специфичен метод спрямо контрастно-усилена КТ (дг-куКТ) (14).

Според последните препоръки,  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT се препоръчва като „златен стандарт“ за рутинно стадиране на FDG-натрупващи нодални лимфоми (повечето хистологични видове без хронична лимфоцитна левкемия/древноклетъчен лимфоцитен лимфом, лимфоплазматичен лимфом/макроглобулинемия на Waldenstrom, mycosis fungoides, маргинално-зоновите НХЛ, освен при суспекция за агресивна трансформация) (15).

## ЦЕЛ

В настоящето проучване си поставихме за цел да оценим диагностичната стойност на PET спрямо СТ при първично стадиране на деца и юноши с класически ХЛ (клХЛ).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В анализа са включени резултатите от проведена в периода 15.02.2007-08.07.2013г. стадираща /първична/ PET/CT на 162 болни с клХЛ в детско-юношеска възраст. Изследванията са проведени съгласно стандартизиран протокол в рамките на международния проект Euronet-PHL-C1, целящ оптимизиране на терапевтичната стратегия при деца и юноши с клХЛ с помощта на PET/CT. Спазвайки етичните принципи и конфиденциалност на данните, PET/CT-изследванията са анализирани след анонимизиране при защитен дистанционен достъп (TeleHERMES) от Клиниката по нуклеарна медицина на Университетската Специализирана болница за активно лечение по онкология (УСБА-ЛО-ЕАД, София). Образите от стPET/CT впоследствие бяха сравнявани с образите на interim-PET (iPET) след 2 курса химиотерапия за ранна оценка на отговора.

Най-голям процент от изследваните пациенти са в IV стадий (40%), а най-малък дялът на болните в I стадий (1%). Към момента на стадиране 59,6 % от пациентите са с наличие на признаци за биологична активност (B-симптоми).

Разпределението на пациентите с неблагоприятните (рискови) фактори 1) наличие на B-симптоми, 2) обемна медиастинална формация > 33% от торакалния диаметър и 3) повишена СУЕ > 55%, спрямо съответния клиничен стадий е посочено на табл. 1:

СТАДИЙ	В-СИМПТОМИ	BULK > 33%	СУЕ ≥50
I	1	1	0
II	29	22	17
III	22	19	9
IV	47	26	33

### Референтни методи:

Като референтен метод при оценка на резултатите от PET-изследванията приехме компютърната томография. Този подход, използван и от други автори (7), е базиран на факта, че „златният стандарт“, с който могат да бъдат сравнявани данните от образните методи – хистологичната верификация – се провежда на 1 или група ЛВ. В нашето проучване се сравняват резултатите за всяка лезия на PET спрямо СТ. За целта са определени следните категории за PET спрямо СТ: конкордантно-позитивни (+/+), обозначени като истински позитивни (ИП); конкордантно-негативни (-/-), обозначени като истински негативни (ИН); дискордантно-позитивни (PET+/СТ-) при позитивен нуклеарно-медицински образ и негативна СТ, обозначени като фалшиво-позитивни (ФП) находки, които се оценяваха като повишаващи диагностичната точност в хибридно изследване; дискордантно-негативни

(PET-/CT+) при негативен нуклеарно-медицински образ и позитивна СТ, обозначени като фалшиво-негативни (ФН) находки.

### Интерпретация на образите от PET/CT:

Образите от стадиращата PET/CT (стPET/CT) се оценяваха визуално за детекция на патологично хиперфиксиращи 18F-FDG огнища и полуколичествено с определяне на SUVmax.

Метаболитно-активните лезии (лимфни възли или органи) се класифицираха в 15 лимфонодални (9 билатерални и 6 унилатерални) и 5 органни региона, като тук включихме и Валдайеровият пръстен, като съвкупност от лимфни структури – вж. Табл.2:

АНГАЖИРАН ЛИМФОНОДАЛЕН РЕГИОН	АНГАЖИРАН ОРГАН
горни цервикални ЛВ (вдясно и вляво)	Десен бял дроб/Ляв бял дроб
долни цервикални ЛВ (вдясно и вляво)	слезка
супраклавикуларни ЛВ (вдясно и вляво)	черен дроб
инфраклавикуларни ЛВ (вдясно и вляво)	кости
аксиларни ЛВ (вдясно и вляво)	
медиастинум	
ЛВ в белодробния хилус (вдясно и вляво)	
супрадиафрагмален рецесус (вдясно и вляво)	
ЛВ в хилуса на слезката	
ЛВ в хилуса на черния дроб	
мезентериални ЛВ	
Горни парааортални ЛВ	
Долни парааортални ЛВ	
илиачни ЛВ (вдясно и вляво)	
ингвинални ЛВ (вдясно и вляво)	

Позитивни за лимфомно ангажиране на PET се считаха региони с патологично повишен интензитет на натрупване на 18F-FDG.

При анализите използвахме понятието „екстранодално ангажиране“ предимно като аналогично на органно засягане – слезка, бял дроб, черен дроб, кости. Органното ангажиране се базираше на фокални тумор-суспектни лезии.

Проведохме честотен статистически анализ с определяне на броя и разпределението на позитив-

ните (лимфомно ангажираните), негативните (свободни от заболяване), реактивните неонкологични (с различен от лимфом произход) нодални и екстранодални региони, неясните PET- и СТ-лезии, както и на конкордантните и дискордантни лезии за отделните региони.

### Статистически методи:

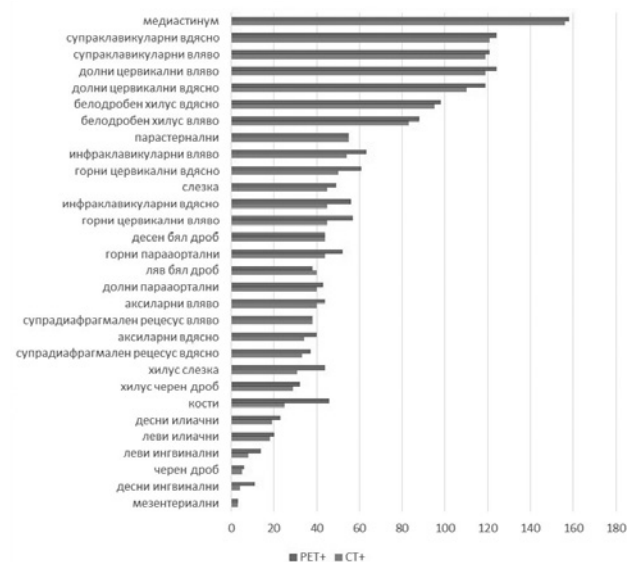
Получените резултати от изследванията на PET/CT бяха обработени статистически, използвайки методите на SPSS/ v.22 с ниво на достоверност на доверителния интервал 95%,  $p < 0,05$ . Резултатите от проучването са представени в табличен вид (Microsoft Excel) или като различни графични модели.

Диагностичната стойност на PET спрямо СТ при изобразяване на ХЛ в проведеното проучване беше определяна чрез изчисляване на показателите чувствителност, специфичност, точност, положителна (ППС) и отрицателна прогностична стойност (ОПС).

## РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от стадиращите PET и СТ бяха разглеждани „лезия по лезия“ със сравняване на отделните локализации.

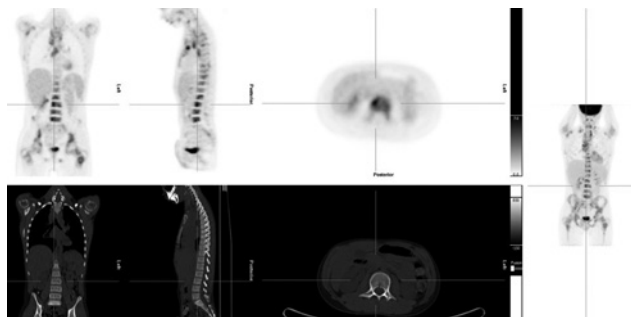
Най-често ангажирана нодална локализация и при двата метода (PET+ и СТ+) е медиастинума, следвана от супраклавикуларни и цервикални области и белодробен хилус. Най-често ангажирана екстранодална локализация /орган/ е слезката, следвана от белия дроб (фиг. 1).



Фиг.1. Честота на ангажиране – нодални и екстранодални локализации.

При находките в скелета се наблюдава по-значителен дискрепанс при сравняване на двата метода – костите са значително по-често позитивни за лимфомно ангажиране на PET отколкото на СТ,

като се наблюдава типичен фокален или мулти-фокален модел на засягане (фиг.2).



Фиг.2. PET(+)/CT(-) находки на нивото на телата на лумбални прешлени (L1-L5) на фона на суспектна нехомогенна фиксация по хода на гръбначния стълб, тазов пръстен и проксимални части на двете бедрени кости (по-изразено вляво). PET vs CT дискрепанс в 3D проекция на нивото на L3.

PET установява повече позитивни за лимфом находки в сравнение с CT в анализирания нодални и екстранодални региони, с изключение на белия дроб.

Най-рядко засегнати от лимфопрлиферативен процес и за двата метода (PET- и CT-) се оказаха: мезентериална област от нодалните структури и черният дроб от екстранодалните региони.

Въпреки сравнително малкия общ брой „неясни“ находки (20 за CT и 26 за PET), се наблюдава най-голям процент несигурност на заключението на CT за горни цервикални ЛВ, следвани от супрадиафрагмален речесус, а за PET – слезка, следвана от кости. PET определи окончателния статус на 19 неясни на CT находки, а CT съответно на 25 неясни PET-региона.

В групата на реактивните неонкологични, различни от лимфом находки (най-често с възпалителен, доброкачествен характер), PET показва по-голяма честота, при изследваните пациенти най-вече за аксиларна и илиачна области, бял дроб и кости.

При проведения честотен анализ и съпоставяне на PET и CT се установи най-голям брой конкордантно-негативни находки, следвани от конкордантно-позитивните, дискордантно-позитивни и най-малък брой дискордантно негативни – Табл.3:

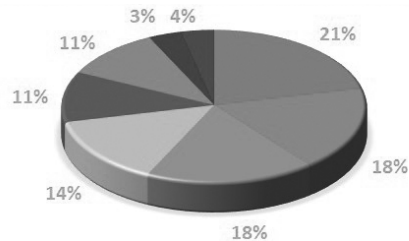
Табл.3. PET vs CT – брой находки.

конкордантност	PET (+) CT (+)	PET(-) CT (-)	PET (+) CT (-)	PET (-) CT (+)
брой находки	1542	3116	172	28

Цервикалната област се оказва най-често дискордантно-позитивна от нодалните региони, обичайно поради малки по размер (< 1 см), но метаболитно-активни ЛВ.

Най-честата екстранодална PET+CT- локализация в настоящето проучване се оказва скелета, следвана от белия дроб.

На фиг. 3 посочваме разпределението по региони на дискордантно-негативните нодални и екстранодални лезии.



- Бял дроб
- супрадиафрагмален речесус
- горни цервикални ЛВ
- инфраклавикуларни ЛВ
- Белодробен хилус
- долни цервикални ЛВ
- супраклавикуларни ЛВ
- илиакални ЛВ

Фиг.3. Честотно разпределение на дискордантно-негативните (PET-CT+) находки (нодални и екстранодални).

Най-честата дискордантно-негативна локализация е белият дроб, т.е. CT установи повече белодробни лезии от PET.

Промени в стадирането на базата на PET спрямо CT

Значително по-големият брой дискордантно-позитивни (PET+CT-) находки в нашето проучване оказва съответно и по-голямо влияние за промяна в стадия на базата на PET в сравнение с дискордантно-негативните.

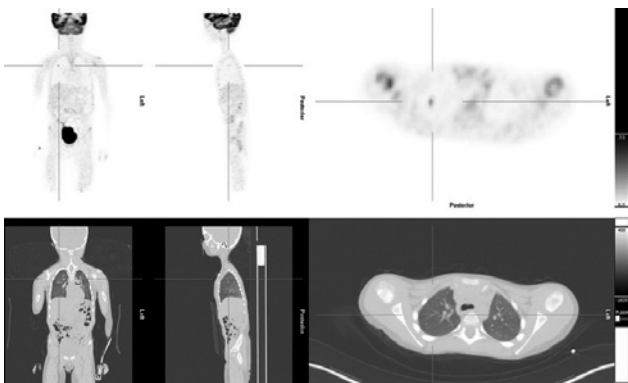
Установи се голяма степен на съгласуваност ( $K=0,838$ ,  $p=0,000$ ) в определянето на стадия от двата метода. PET и CT определиха еднакъв стадий при 145 болни (89,5%). В сравнение с CT, PET повиши стадия (upstaging) при 17 пациента (10,5%) на базата на дискордантно-позитивни находки. В нашия пациентски колектив PET не показва по-нисък в сравнение с CT стадий (downstaging), въпреки наличните дискордантно-негативни находки. Така например, ако крайното стадиране се определяше от PET, при пациент с PET-CT+ находки в бял дроб, PET би определила по-нисък стадий от CT.

Локализацията на дискордантно-позитивните (PET+CT-) находки, определили по-висок стадий на PET спрямо CT са съответно: 1) тимус /причислен към медиастиnum/ – при един пациент – PET установява огнище на патологична хиперфиксация на 18F-FDG на фона на общо дифузно леко повишено включване от реактивен тип; 2) параартален ЛВ и слезка – един пациент; 3) бял дроб – 3 пациента; 4) кости – 12 пациента – табл. 4.

Табл.4. PET спрямо СТ – повишаване на стадия.

СТ стадий	PET СТАДИЙ	ЛОКАЛИЗАЦИЯ	БРОЙ ПАЦИЕНТИ	ОБЩО
I	II	тимус	1	1
II	III	Слезка и парааортален ЛВ	1	1
II	IV	Кости	2	5
		Бял дроб	3	
III	IV	Кости	10	10

Поради липса на топографско картиране при двама болни определените от PET позитивни находки в бял дроб бяха локализирани от СТ на нивото на съответния белодробен хилус или в медиастинум – т.е. „фалшива“ дискордантно-позитивна PET-находка по отношение на белия дроб, но „истинска“ конкордантно-позитивна находка по отношение на белодробен хилус/медиастинум. При един пациент PET намери дребна метаболитно-активна лезия в бял дроб при липса на морфологичен корелат – истински дискордантна находка (фиг.4).



Фиг.4. Дребна метаболитно-активна лезия в десен бял дроб без морфологичен СТ-корелат.

При 12 болни PET установи фокални хиперметаболитни лезии в кости, без структурна патология на СТ – фиг. 2.

В нашия пациентски колектив всички огнища в кости, позитивни на стадиращата PET и негативни на СТ, показват след специфична противотуморна терапия напълно или поне частично нормализиран глюкозен метаболизъм на iPET (фиг. 5А/Б).



Фиг. 5А. Стадиране (стPET/СТ): PET(+) в тазови кости (червени стрелки), СТ(-).



Фиг.5Б. Рестадирание (iPET/СТ): тазови кости iPET (-).

Видимото функционално-метаболитно повлияване на тези PET+СТ- огнища след проведено специфично антинеопластично лечение определя истински-позитивна стPET(+) и истински-негативна iPET(-).

На базата на проучването стадиращата PET показва: чувствителност = 98,2%; специфичност = 94,8%; точност = 95,9%; ППС = 95,9%;ОПС = 99,1%.

## ОБСЪЖДАНЕ

Непрекъснато усъвършенстваща се и все по-налагаща се в диагностиката и стадирането на редица солидни тумори (16-19), 18F-FDG-PET потвърждава диагностичните си приноси и в нашето проучване при проследяване на деца и юноши с класически Ходжкинов лимфом (20). Сравнена с всеприетия понастоящем стандарт –СТ, 18F-FDG-PET подобри коректното стадиране, допълвайки структурно-анатомичната информация от СТ с данни за метаболитната активност на хематоонкологичното заболяване по региони. В нашето проучване стадиращата PET показва 98.2% чувствителност, 95.9% точност, 94.8% специфичност, 95.9% ППС и 99.1% ОПС – резултати, сходни до идентични с тези, публикувани в научната литература (7,13,21-23). Редно е да се отбележи обаче, че PET показва по-ниски показатели от КТ в настоящия анализ и поради приемането на КТ за „стандарт“.

Нашите резултати показват фокалния или мултифокален модел на костно-мозъчно засягане при клХЛ, характеризиращ се с отграничени едно от друго FDG-позитивни огнища в скелета и е в противовес с традиционната теза за хомогенност в

ангажирането на костния мозък. Наличието на метаболитно-активни костно-мозъчни фокуси извън зоната за стандартна костно-мозъчната биопсия – cristalliacs- би довело до фалшиво-негативен резултат от тази инвазивна процедура. Примери за това се посочват и в проучванията на други автори (24-26). Същевременно, с посочване на конкретни костно-мозъчни хиперметаболитни огнища за всеки индивидуален случай, стРЕТ/СТ може да се използва за определяне на оптималното място за КМБ, ако такава все пак е необходима (27).

Докато Raanani и съавтори (28) описват дискордантно-позитивни РЕТ-находки в 32% от пациентите с ХЛ, Kostakoglu и колектив (29) установяват, че РЕТ повишава стадия от ранен към напреднал, с преминаване към по-интензивна терапия, при 10-15% от случаите. В научните съобщения повишаване на стадия се дължи най-често на дискордантни с КТ, РЕТ-позитивни ЛВ < 1см или на патологична FDG-фиксация в черен дроб/слезка без морфологичен корелат (30). В нашите анализи РЕТ повиши стадия (upstaging) само при 10,5% от пациентите на базата на 18F-FDG-РЕТ-дискордантно-позитивни находки. Не всички дискордантно-позитивни региони обаче съответстваха на реално по-голям брой лезии. Намерените при двама пациенти РЕТ(+)/СТ(-)-находки в бял дроб напр., които след съпоставка с СТ бяха отнесени към съответно белодробен хилус и медиастинум, могат да бъдат разглеждани като „фалшиво-позитивно-дискордантни“, поради липса на анатомична корелация на чистите РЕТ-образи, но „истински конкордантни“ по отношение на реалната информация на метода. От особен интерес е и крайната интерпретация на дискордантно-позитивните находки в кости, имайки предвид установената им еволюция след 2 курса ХТ, т.е. към момента на рестадиране – iРЕТ. От друга страна, в изследванията от нас пациенти не се установи понижаване на стадия на базата на РЕТ.

Въпреки наличните структурни белодробни лезии на СТ, без повишена метаболитна активност, крайният стадий и за двата метода остана идентичен. В сходно проучване на Kabickovaetal. (7) само в 3% от пациентите РЕТ е пропуснала дребни, детектирани на СТ нодуларни лезии в бял дроб, поради което е определила по-нисък стадий.

По-голямата честота в нашия пациентски колектив на РЕТ-„патологични, но различни от лимфом находки“(най-често в аксиларна и илиачна области, бял дроб и кости), дискордантни с СТ, по всяка вероятност се дължи на по-ранната функционална изява на даден патологичен процес, предхождаща структурно-морфологичната и/или дори оставаща на функционално ниво, без да се развие морфологичен корелат и отшумяваща впоследствие като изява на реактивен или хроничен възпалителен процес.

В нашите проучвания РЕТ допринесе за определяне на окончателния стадий при 12 болни (7,4%)

с неясен СТ статус на ЛВ или екстранодални находки (цервикална област, слезка, кости). Това се дължи на специфичната особеност на РЕТ да отличава метаболитно-хиперактивни огнища в нормални или сграницен размер ЛВ или в дискретни, неоформени структурно-морфологични промени в органите.

Възможността на РЕТ да открива повече лезии от СТ епотенциално свързана не само с непосредствено произтичащото преминаване в по-висок стадий и евентуално по-интензифицирана лекарствена терапия, но и непо-маловажните последици за планирането на лъчетерапията. Според Connors и съавтори (31), наличието на РЕТ/СТ може да ръководи и „напасва“ дизайна, формата и дозиметрията на лъчетерапевтичните подходи (“involved field”, “involved nodal”) след завършване на химиотерапевтичния курс. По този начин може да бъде намален броят на рецидивите и да се повлияе общата прогноза на заболяването – както на базата на промяната в стадия, така и на базата на по-адекватната и изчерпателна оценка на отговора на лечението. Не на последно място, наличието на стРЕТ с данни за 18F-FDG-хиперфиксиращи, но различни от лимфом находки (възпалителни процеси, активирана кафява мастна тъкан) би намалило потенциалните грешки в оценката на терапевтичния отговор след проведено лекарствено лечение (в средата или края му) (32). Проблемът с интерпретацията при самостоятелната РЕТ в региони с активирана кафява мастна тъкан, макар и до голяма степен решен с хибридната РЕТ/СТ, понякога все още създава проблеми. Това са най-вече случаите, при които в непосредствена близост с хиперфиксацията на FDG в кафява мастна тъкан се намира остатъчна лимфомна тъкан или отделни ЛВ и съответно се наблюдава частично или пълно припокриване. Наличието на фиксация в кафявата мастна тъкан освен това може да доведе до намаляване на включването в туморните лезии поради общо редуцираното количество налична FDG (33). Предприеманите мерки срещу хиперфиксацията в активиранията мастна тъкан (поддържане на оптимална температура, прием на пропранолол, диазепам, фентанил и др.) могат до голяма степен да оптимизират качеството на получения образ и да улеснят интерпретацията.

В нашето проучване наличието на стадираща РЕТ беше от изключителна полза при директното сравнение с резултата на iРЕТ. Благодарение на стРЕТ можеха да бъдат коректно разграничени новопоявили се на iРЕТ, липсващи на стРЕТ метаболитно-активни региони (напр. с реактивно-възпалителен характер) от такива с недостатъчен отговор на лечението, които да се включат в изчисленията на метаболитните обеми и броя лезии. Така се повишава точността на оценката на метаболитния отговор, за което съобщават в свое проучване и van Ufford и съавтори (34).

Като се има предвид и чувствителността на дет-

ско-юношеската възраст към лъчево натоварване, провеждането на стРЕТ/СТ при нашия пациентски колектив има допълнително основание: ефективната доза от конвенционална диагностична СТ с обхващане на шия, гръден кош, коремна и тазова област, е в порядъка на 20-25 mSv (35), докато въщото време хибридна РЕТ/(нискодозова)СТ достига ефективна доза от същата величина, но предлага освен морфологична и безценна функционална информация (36), както и директно сравнение на резултата от лечението на iРЕТ. По този начин стадиращата РЕТ/СТ дава възможност за получаване на максимална диагностична информация при спазване на основния принцип на лъчезащитата ALARA.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като извод от настоящето проучване можем да обобщим, че РЕТ подобрява стадирането на неясни на СТ региони и открива по-голям брой лезии в сравнение с СТ, с промяна на стадия в 10,5% от пациентите.

Най-честа дискордантност между РЕТ(+) и СТ(-) находки се наблюдава в цервикалната област при нодалните и в скелета при екстранодалните региони.

В детско-юношеската възраст стадиращата РЕТ показва много високи диагностични възможности и намалява фалшиво-позитивните резултати на iРЕТ, което затвърждава мястото на метода като незаменима част от диагностичния и рестадиращ алгоритъм при това заболяване.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

- Schellong et al. High Cure Rates and Reduced Long-Term Toxicity in Pediatric Hodgkin's Disease: The German-Austrian Multicenter Trial DAL-HD-90. *J Clin Oncol* 1999; 17:3736-3744.
- Dörfel et al. Preliminary results of the multicenter trial GPOH-HD 95 for the treatment of Hodgkin's disease in children and adolescents: analysis and outlook. *Klin Padiatr*. 2003 May-Jun; 215(3):139-45.
- Schellong G. Paediatric Hodgkin's disease: treatment in the late 1990s. *Ann Oncol* (1998) 9 (suppl 5): S115-S119.
- Landman-Parker J et al. Localized childhood Hodgkin's disease: response-adapted chemotherapy with etoposide, bleomycin, vinblastine, and prednisone before low-dose radiation therapy—results of the French Society of Pediatric Oncology Study MDH90. *J Clin Oncol*. 2000 Apr; 18(7):1500-7.
- Körholz D. et al. The concept of the GPOH-HD 2003 therapy study for paediatric Hodgkin's disease: evolution in the tradition of the DAL/GPOH studies. *Klin Pädiatr* 2004; 216: 150-156.
- Van Beek R., Bone mineral density, growth, and thyroid function in long-term survivors of pediatric Hodgkin's lymphoma treated with chemotherapy only. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009 94:1904-1909.
- Kabickova E, Sumerauer D, Cumlivska E, et al. Comparison of 18F-FDG-PET and standard procedures for the pretreatment staging of children and adolescents with Hodgkin's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33: 1025-1031.
- Furth C. et al. Correlative imaging strategies implementing CT, MRI and PET for staging of childhood Hodgkin disease. *J Pediatr Hematol Oncol*; 2006; 28:501-512.
- Wickmann L. et al. 18-FDG-PET-Befunde bei Kindern und Jugendlichen mit Morbus Hodgkin: retrospektive Auswertung zur Korrelation mit anderen bildgebenden Verfahren bei der initialen Stagingdiagnostik und zum prädiktiven Wert bei Verlaufuntersuchungen. *Klin Pädiatr* 2003; 215:146-150.
- Pampaloni M. et al. F-18 FDG-PET imaging and correlation with CT in staging and follow-up of pediatric patients. *Pediatr Radiol* 2005; 36: 524-531.
- Czernin J, Allen-Auerbach M, Schelbert HR. Improvements in cancer staging with PET/CT: literature-based evidence as of September 2006. *J Nucl Med*. 2007;48 Suppl 1:78S-88S.
- Cheson, BD. Role of functional imaging in the management of lymphoma. *J Clin Oncol* 2011;29:1844-1854.
- la Fougere C, Hundt W, Brockel N, et al. Value of PET/CT versus PET and CT performed as separate investigations in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(12): 1417-1425.
- Schaefer NG, Hany TF, Taverna C, et al. Non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin disease: coregistered FDG PET and CT at staging and restaging: do we need contrast-enhanced CT? *Radiology* 2004; 232:823-829.
- Barrington SF, Mikhael NG, Kostakoglu L, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International conference on malignant lymphomas Imaging working group. *J Clin Oncol* 2014;32:3048-3058.
- Piperkova E, Raphael B, Altinyay ME, et al. Impact of PET/CT in comparison with same day contrast enhanced CT in breast cancer management. *Clin Nucl Med*. 2007;32(6):429-34.
- Piperkova E, Mounir M, Mousavi, Ali et al. Impact of PET and CT in PET/CT Studies for Staging and Evaluating Treatment Response in Bone and Soft Tissue Sarcomas. *Clin Nucl Med*. 2009; 34(3):146-150. doi: 10.1097/RLU.0b013e3181966f9d.
- Kligerman S, Digumarthy S. Staging of Non-Small Cell Lung Cancer Using Integrated PET/CT. *AJR*. 2009;193:1203-1211.
- Mohandas A, Marcus C, Kang H, et al. FDG PET/CT in the Management of Nasopharyngeal Carcinoma. *AJR*. 2014; 203(2):146-157.
- Чавдарова Л. „Мултимодална нуклеарно-медицинска диагностика при малигнени лимфоми“. Дисертационен труд. София, 2017г.
- Stumpe KD, Urbinelli M, Steinert HC, et al. Whole-body positron emission tomography using fluorodeoxyglucose for staging of lymphoma: effectiveness and comparison with computed tomography. *Eur J Nucl Med*. 1998; 25(7):721-8.
- Isasi CR, Lu P, Blaurock MD. A metaanalysis of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography in the staging and restaging of patients with lymphoma. *Cancer*. 2005;104(5):1066-1074.
- Kwee TC, Kwee RM, Nievelstein RA. Imaging in staging of malignant lymphoma: a systematic review. *Blood*. 2008;111(2):504-16.
- Purz S, Mauz-Koerholz C, Koerholz D, et al. [18F]Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Detection of Bone Marrow Involvement in Children and Adolescents with Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3523-3528.
- Moulin-Romsee G, Hindie E, Cuenca X, et al. (18F)-FDG PET/CT bone/bone marrow findings in Hodgkin's lymphoma may circumvent the use of bone marrow trephine biopsy at diagnosis staging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37:1095-1105.
- Adams HJ, Kwee TC, Fijnheer R, et al. Bone marrow FDG-PET/CT in Hodgkin lymphoma revisited: do imaging and pathology match? *Ann Nucl Med*. 2015; 29(2):132-7.
- Noy A, Schoeder H, Goenen M, et al. The majority of transformed lymphomas have high standardised uptake values (SUVs) on positron emission tomography (PET) scanning similar to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Ann Oncol* 2010;20:508-512.
- Raanani P, Shasha Y, Perry C, et al. Is CT scan still necessary for staging in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients in the PET/CT era? *Ann Oncol*. 2006; 17(1):17-22.
- Kostakoglu L, Evens A. FDG-PET Imaging for Hodgkin Lymphoma: Current use and future applications. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014;12(1):20-35.
- Seam P, Juweid ME, Cheson BD. The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. *Blood* 2007; 110(10):3507-3516.
- Connors JM. Positron Emission Tomography in the Management of Hodgkin Lymphoma. *ASH Education Book*. 2011; 2011(1): 317-322.
- Kluge R, Körholz D. Role of FDG-PET in Staging and Therapy of Children with Hodgkin Lymphoma. *Klin Padiatr*. 2011; 223(6):315-9.
- Christensen CR, Clark PB, Morton KA. Reversal of hypermetabolic brown adipose tissue in F-18 FDG PET imaging. *Clin Nucl Med*. 2006; 31(4):193-6.
- Van Ufford HQ, Hoekstra O, de Haas M, et al. On the added value of baseline FDG-PET in malignant lymphoma. *Mol Imaging Biol*. 2010; 12:225-232.
- Barentsz J, Takahashi S, Oyen W, et al. Commonly used imaging techniques for diagnosis and staging. *J Clin Oncol*. 2006; 24:3234-3244.
- Brix G, Lechel U, Glatting G, et al. Radiation exposure of patients undergoing whole-body dualmodality 18F-FDG PET/CT examinations. *J Nucl Med*. 2005; 46:608-613.

# БЪБРЕЧЕН КАРЦИНОМ И БОЛЕСТ НА ГОШЕ – ДВЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ, ВЕРОЯТНО ПАТОГЕНЕТИЧНО СВЪРЗАНИ ЧРЕЗ НАМАЛЕНАТА ЕНЗИМНА АКТИВНОСТ НА $\beta$ -ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗА.

*В. Върбанова<sup>1</sup>, И. Гълъбова<sup>2</sup>, И. Амин<sup>2</sup>, В. Иванова<sup>2</sup>, Г. Георгиев<sup>2</sup>*

*1-Клиника по клинична хематология, ВМА, София;*

*2-Клиника по Хематология, Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда, София.*

## RENAL CELL CARCINOMA AND GAUCHER DISEASE – TWO DISEASES PROBABLY PATHOGENETICALLY LINKED BY THE DECREASED ENZYME ACTIVITY OF $\beta$ -GLUCOCEREBROSIDASE.

*V. Varbanova<sup>1</sup>, I. Galabova<sup>2</sup>, I. Amin<sup>2</sup>, V. Ivanova<sup>2</sup>, G. Georgiev<sup>2</sup>*

*1-Clinic of Hematology – Military Medical Academy;*

*2-Clinic of Hematology, Acibadem City Clinic Hospital Tokuda, Sofia*

---

**Резюме.** Болест на Гоше (БГ) тип 1 е рядко автозомно-рецивно заболяване на лизомните натрупвания с индолентен ход и хетерогенна клинична изява. Представен е клиничен случай на БГ тип 1, „скрит“ зад диференциалната диагноза чернодробна цирроза с неясна причина. Диагнозата БГ е поставена 30 години след началните симптоми на хепато-спленомегалия и тромбоцитопения след спленектомия по повод на солиден тумор. По-ранното диагностициране на БГ и започване на ензим-заместваща терапия с голяма вероятност биха ограничили хепато-спленомегалията, отклоненията в хематологичните показатели и предотвратили ненужната спленектомия. Докладваният клиничен случай потвърждава важността на препоръките за скрининг за БГ с тест за ензимна активност на  $\beta$ -глюкоцеребросидаза при всички пациенти с неясна тромбоцитопения и/или анемия и/или спленомегалия и/или хепатомегалия и/или костна болест, особено в случаите, когато се планира диагностична спленектомия. Наличието на съпътстващо онкологично заболяване не изключва диагнозата, напротив доказана е по-висока честота на тези заболявания при БГ тип 1.

**Ключови думи.** Болест на Гоше, неоплазия, спленомегалия

**Abstract.** Gaucher disease (GD) type 1 is a rare autosomal recessive inherited disease of lysosomal accumulations with indolent stroke and heterogeneous clinical manifestation. A clinical case of GD type 1, “hidden” behind the differential diagnosis of cryptogenic liver cirrhosis, diagnosed about 30 years after the initial symptoms of hepatosplenomegaly and thrombocytopenia is presented. The diagnose was defined after splenectomy because of solid tumor. It can be assumed that earlier diagnosis of GD and initiation of enzyme replacement therapy with high probability would improve hepato-splenomegaly and haematological deviations, as well as conduction of unnecessary splenectomy. In conclusion, the reported clinical case confirms the importance of the recommendations for GD screening with  $\beta$ -glucocerebrosidase enzyme activity test in all patients with undefined thrombocytopenia and/or anemia and/or splenomegaly and/or hepatomegaly and/or bone disease, especially when a diagnostic splenectomy is planned. The presence of a concomitant malignancy does not rule out the diagnosis; on the contrary, there is a higher incidence of these diseases in GD type 1.

**Key word.** Gaucher Disease, malignancy, splenomegaly

---

### ВЪВЕДЕНИЕ

Болестта на Гоше (БГ) е рядко автозомно-рецивно заболяване от групата на болестите на лизомните натрупвания<sup>1,2</sup>, с изчислена заболеваемост 1 на 40 000 – 60 000 за общата популация<sup>3</sup> до 1 на 800

новородени при ашкеназките евреи<sup>4,5</sup>.

Дължи се на мутации в GBA1 гена, разположен на хр.1 (1q21-q22)<sup>6</sup>, кодиращ ензима  $\beta$ -глюкоцеребросидаза (acid -glucosidase, GBA)<sup>7</sup>. GBA метаболизира глюкоцеребросида в церамид и глюкоза<sup>1,2</sup>. В резултат на понижената/липсваща

ензимна активност, глюкоцереброзида се натрупва прогресивно в лизозомите на макрофагите от ретикулоендотелната система. „Препълнените“ с глюкоцереброзид тъканни макрофаги, известни като клетки на Гоше, инфилтрират различни органи, предилекционно слезка, черен дроб и костен мозък.

Въпреки че механизмът на заболяването е генетично детерминирано нарушение в ензимната активност на глюкоцереброзидаза, клиничната картина варира значително. Тип 1 БГ (неневропатична) е най-честата форма (92%)<sup>8,9</sup>. Характеризира се с различното съчетание на най-честите клинично-лабораторни констелации: тромбоцитопения (60%), анемия (37%), левкопения, хепатомегалия (65%), спленомегалия (86%), костни промени (59-83%), изоставане в половото развитие и забавен растеж, паркинсонизъм, вариации в тежестта на отделните прояви между пациентите и индолентния ход<sup>10</sup>. Описаната клинична хетерогенност значително затруднява диагностиката с широк панел изследвания в диференциално-диагностичен план<sup>9,11</sup>.

**За поставяне на диагнозата може да се използва:**

1. Цитологично/хистологично изследване на костно-мозъчен аспират или биопсия или биопсия от засегнати паренхимни органи (черен дроб, слезка) с оцветяване за липиди или желязо.
2. Изследване на ензимната активност на GBA в проба от периферна кръв.
3. Молекулярно-генетичен анализ за определяне на вида на мутацията в GBA1.

Препоръчва се потвърждаване на диагнозата БГ чрез провеждане на тест за ензимна активност и молекулярно-генетичен анализ на всички пациенти с хистологични/цитологични данни за БГ, както и молекулярно-генетично изследване на всички пациенти с установена понижена ензимната активност на GBA.

С подобряване на диагностиката на БГ се натрупват все повече данни за повишен риск от малигнени заболявания при БГ<sup>9,12-15</sup>. Резултатите на различните изследователски екипи са противоречиви, но е безспорен повишеният риск от мултиплен миелом (ММ)<sup>9,12-15</sup>, лимфом<sup>14,16</sup> и някои солидни тумори като хепатоцелуларен карцином (hepatocellular carcinoma, НСС)<sup>15</sup>, бъбречен карцином<sup>9,12,14,15</sup> и рак на панкреаса<sup>16</sup>. Изказана е причинно-следствена връзка между БГ и повишения риск от малигнени заболявания, въпреки че точната патогенетична констелация не е изяснена. Според една от хипотезите, повишената склонност към малигнена трансформация при БГ се дължи на променената среда, съпътстваща заболяването. Доказано е, че клетките на Гоше секретират цитокини като интерлевкин (IL) 6 (IL-6), IL-1, IL-10, тумор-некротизиращ фактор-α (tumor necrosis factor, TNF-α)

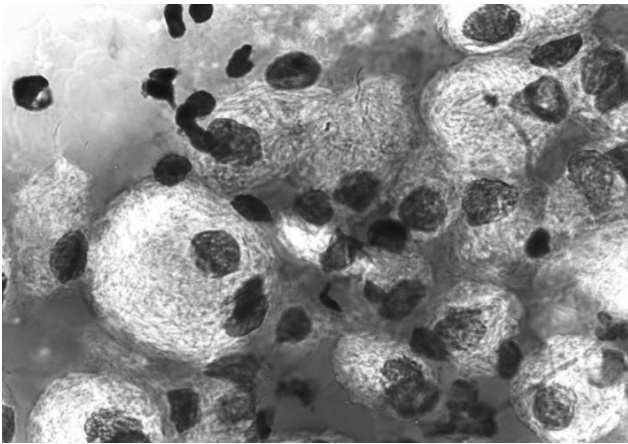
в заобикалящата ги среда с автокринен ефект и супресивно влияние върху Т- и НК-клетъчната функция, които са с основно значение за антитуморния имунен отговор<sup>17-19</sup>. При БГ феритинът е повишен<sup>20</sup>. Той има карциногенен ефект като индуктор на продукцията на свободни радикали<sup>21,22</sup> и същевременно допълнително потиска Т-клетъчната и НК-клетъчната активност<sup>23</sup>. Втората хипотеза допуска първоначалните стъпки към неопластична трансформация да произхождат не от околната среда, а от самата (бъдеща) злокачествена клетка, в която е нарушена обмяната на сфинголипидите. Натрупването на глюкозилцерамид или намалено образуване на церамид, води до вредно въздействие и промени в антипролиферативното равновесие<sup>24</sup>. Повишеният риск от неопластични заболявания при БГ се обсъжда още и в контекста на периферната инсулинова резистентност, асоциирана със заболяването<sup>25</sup>, водеща до хиперинсулинемия, която може да подпомага растежа и развитието на пред-малигнени клетки<sup>26</sup>.

## КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

Г. Й. на 66 год. е преминал оперативно лечение – десностранна нефректомия с отстраняване на тумор, спленектомия, холецистектомия и чернодробна биопсия по повод карцином на бъбрека (м.06.2015 г.). Предоперативната компютърна томография (КТ) на корем и малък таз е с данни за:

1. Туморна-формация в хилуса на десен бъбрек 55/53 мм
2. Значително уголемена слезка с множество хетерогенни лезии, суспектни за разпад, най-голямата 110/126 мм; дилатирани в. лиеналис и в. порте
3. Без други патологични промени и лимфаденомегалия.

Пациентът е с анамнестични данни за сплено-хепатомегалия от млада възраст, по-късно съпътствана от тромбоцитопения. По този повод са провеждани многократни консултации, включително чернодробна биопсия преди 17 години с хистологичен резултат хроничен персистиращ хепатит и окончателна диагноза чернодробна цироза с хиперспленизъм. Пациентът е с придружаващи заболявания: исхемична болест на сърцето, артериална хипертония, сърдечна недостатъчност II функционален клас NIHA, инсулино-независим захарен диабет. Предоперативните лабораторни данни са за панцитопения (Leu 2.8 x 10<sup>9</sup>/l, Hgb 102 g/l, Er 3.7 x 10<sup>12</sup>/l, PLT 51 x 10<sup>9</sup>/l; ДКК: Gran 67%, Мо 8%, Ео 2%, Лym 23%), без отклонения в биохимичните показатели и чернодробните ензими. Хистологичният резултат от спленектомията показва наличието на големи пенести клетки, суспектни за болест на натрупването (възможно БГ) (фиг. 1) и масивен инфаркт на слезката. Хистологичната картина от чернодробната биопсия е идентична с находката в слезката.



Фигура 1. Хистологичен препарат от слезка с клетки, суспектни за БГ (HE, 40x).

Диагнозът БГ е потвърден чрез ензимен анализ и молекулярно-генетичен изследване. Резултат от тест за ензимна активност на  $\beta$ -глюкозидаза 32.78 pmol/spot\*20 h. (норма 200-2000). Полимеразна-верижна реакция (PCR): хомозиготна мутация на GBA1 (p.[N409S];[N409S]). След доказване БГ, пациентът е насочен за ензим-заместваща терапия (enzyme replacement therapy, ERT). Липсва проследяване поради личен избор за продължаване на лечението на онкологичното заболяване извън страната.

## ДИСКУСИЯ

Представен е клиничен случай на БГ, диагностициран приблизително 30 години след началните симптоми, лекуван ненужно и без ефект за чернодробна цироза с неясна причина. Наличието на метаболитно заболяване е установено след спленектомия по друг медицински повод. Спленектомията се асоциира с 20-52% постоперативни усложнения (инфекции, хеморагии, тромбоемболични усложнения) и 1.2-2.4% следоперативна смъртност в общата популация<sup>27-29</sup>. Допълнително спленектомията при пациенти с БГ увеличава риска от висцерални и костни усложнения на БГ (пулмонарна хипертония, сърдечно-съдови увреждания, костни фрактури)<sup>30,31</sup>. В ерата на съвременната ERT и субстрат-редуцираща терапия (substrate reduction therapy, SRT) за пациентите с БГ тип 1, спленектомията не е терапевтична опция, освен в случаи на спленален инфаркт с образуване на некроза и абсцедиране. Ползите от ERT и SRT за повишаване на хематологичните показатели, намаляване големината на слезката и черния дроб са доказани, при минимален риск от нежелани лекарствени реакции. Данните от клинични изпитвания, подчертават компроментиранието на терапевтичната ефективност на ERT при късно започване на терапията, напредване на клиничната симптоматика и развитието на костни некрози<sup>30,31</sup>. В началото на 2018 г. е публикуван ек-

пертен консенсус на Европейската работна група за БГ (European working group on Gaucher disease), в който се препоръчва ранно диагностициране на БГ и започване на ERT или SRT<sup>32</sup>. Съгласно международните стандарти скрининг за БГ се препоръчва при всички пациенти с неясна тромбоцитопения и/или анемия и/или спленомегалия и/или хепатомегалия. Удачно е провеждането на предоперативен скрининг за БГ при всички пациенти насочени за планова спленектомия с диагностична (неясна спленомегалия) и/или с терапевтична цел (неясен хиперспленизъм) поради:

1. Липсата на риск за пациента от скрининговото изследване
2. Възможните ползи от започване на ERT или SRT при доказване на БГ като етиологична причина
3. Избягване на рисковете от ненужна спленектомия.

В представения клиничен случай, БГ е диагностицирана след спленектомия при радикална операция поради карцином на бъбрека. Съществуват литературни данни за повишен риск от неопластични заболявания, включително карцином на бъбрека при БГ тип 1<sup>12,14</sup>. В препоръките от 2018 г. е изказано консенсусно становище, че една от целите на терапията и проследяването на пациенти с БГ тип 1, е ранна диагностика на хематологични и нехематологични неоплазии, включващи насочени изследвания за бъбречен карцином, НСС, ММ, лимфом, амилоидоза<sup>34</sup>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представен е клиничен случай на пациент с БГ тип 1, „скрит“ зад диференциалната диагноза чернодробна цироза с неясна причина. Диагнозът БГ е поставена след спленектомия по повод на солиден тумор, въпреки хепато-спленомегалията и тромбоцитопения с давност от около 30 г. Докладваният клиничен случай потвърждава значението на препоръките за скрининг за БГ с тест за ензимна активност на  $\beta$ -глюкоцереброзидаза на всички пациенти с неясна тромбоцитопения и/или анемия и/или спленомегалия и/или хепатомегалия и/или костна болест (патологични фрактури, остеопения, костни болки), особено в случаите, когато се планира диагностична спленектомия. Наличието на съпътстващо онкологично заболяване не изключва диагнозата, напротив доказана е по-висока честота на тези заболявания при БГ тип 1<sup>35</sup>.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Pastores G.M., Hughes D.A. Gaucher Disease. In: GeneReviews. Seattle (WA) University of Washington, Seattle, 1993: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1269/>.
2. Grabowski G.A., Petsko G.A. and Kolodny E.H. Gaucher Disease. In: The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, Inc., 2014: <http://mhmedical.com/content.aspx?aid=1102895727>.
3. Meikle P.J., Hopwood J.J., Clague A.E., Carey W.F. Prevalence of lysosomal storage disorders et al., Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA, 1999; 281(3):249–254.
4. Grabowski, G.A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. Lancet 2008, 372, 1263–1271.
5. Stirnemann J., Vigan M., Hamroun D., et al. The French Gaucher's disease registry: Clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. Orphanet J. Rare Dis, 2012; 7:7.
6. Stenson P.D., Mort M., Ball E.V., et al. The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. Hum Genet, 2014; 133(1):1–9.
7. Brady R.O., Kanfer J.N. and Shapiro D. Metabolism of glucocerebrosides. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. Biochem Biophys Res Commun, 1965; 18:221–225.
8. Beutler E., Grabowski G.A. Gaucher disease; in The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th edn. New York: McGraw-Hill, 1995:2641–2670.
9. Rosenbloom B. E., Weinreb N.J., Zimran A. Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. Blood, 2015; 105(12):4569–4572.
10. Biegstraaten M., van Schaik I.N., Aerts J.M.F.G., et al., A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher phenotypes. Blood Cells Mol Dis, 2011; 46(1):39–41.
11. Azuri J., Elstein D., Lahad A., et al. Asymptomatic Gaucher disease implications for large-scale screening. Genet Test, 1998; 2(4):297–299.
12. Lee R.E. The pathology of Gaucher disease. Progress in Clinical and Biological Research, 1982; 95:177–217.
13. Shiran A., Brenner B., Laor A., et al. Increased risk of cancer in patients with Gaucher disease. Cancer, 1993; 72:219–224.
14. Taddei T.H., Kacena K.A., Yang M., et al. The underrecognized progressive nature of N370S Gaucher disease and assessment of cancer risk in 403 patients. Am J Hematol, 2009; 84: 208–214.
15. de Fost M., Vom Dahl S., Weverling G.J., et al. Increased incidence of cancer in adult Gaucher disease in Western Europe, Blood Cells Mol Dis, 2006; 36(1): 53–58.
16. Landgren O., Turesson I., Gridley G., Caporaso N.E. Risk of malignant disease among 1525 adult male US Veterans with Gaucher disease. Arch. Intern. Med, 2007; 167:1189–1194.
17. Boven L.A., van Meurs M., Boo R.G., et al. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. American Journal of Clinical Pathology, 2004; 122:359–369.
18. Braudeau C., Gravelea J., Rimbart M., et al. Altered innate function of plasmacytoid dendritic cells restored by enzyme replacement therapy in Gaucher disease. Blood Cells Mol. Dis, 2013; 50:281–288.
19. Burstein Y., Zakuth V., Rechavi G., Spierer Z. Abnormalities of cellular immunity and natural killer cells in Gaucher's disease. J Clin Lab Immunol, 1987; 23:149–151.
20. Morgan M.A., Hoffbrand A.V., Laulich M., Luck W. & Knowles, S. Serum ferritin concentration in Gaucher's disease. British Medical Journal (Clinical Research Ed.), 1983; 286:1864.
21. Selby J.V. & Friedman G.D. Epidemiologic evidence of an association between body iron stores and risk of cancer. International Journal of Cancer, 1988; 41:677–682.
22. Stevens R.G., Jones D.Y., Micozzi M.S. & Taylor P.R. Body iron stores and the risk of cancer. The New England Journal of Medicine, 1988; 319:1047–1052.
23. Bassan R, Montanelli A, Barbui T. Interaction between a serum factor and T-lymphocytes in Gaucher disease. Am J Hematol, 1985; 18:381–384.
24. Astudillo L., Therville N., Colacio C., et al. Glucosylceramidases and malignancies in mammals. Biochimie, 2015; 125:267–280.
25. Langeveld M., Ghauharali K.J., Sauerwein H.P., et al. Type I Gaucher disease, a glycosphingolipid storage disorder, is associated with insulin resistance. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2008; 93:845–851.
26. Godsland I.F. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. Clin Sci (Lond), 2009; 118(Pt 5):315–332.
27. Shute P.G. Splenectomy and susceptibility to malaria and babesiae infection. BMJ, 1975; 1:516.
28. Teo K.G., Anavekar N.S., Yazdabadi A., Ricketts S. Asplenic fulminant sepsis secondary to a dog bite complicated by toxic epidermal necrolysis/Steven's Johnson syndrome. N Z Med J, 2012; 125:74–7.
29. Rotbain E.C., Hansen D.L., de Muckadell O.S., et al. Splenomegaly – Diagnostic validity, work-up, and underlying causes. PLOS ONE, 2014; 14: 1–11.
30. Ganz M.L., Stern S., Ward A. A new framework for evaluating the health impacts of treatment for Gaucher disease type 1. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2017; 12:38.
31. Charrow J., Scott C.R. Long-term treatment outcomes in Gaucher disease. Am J Hematol, 2015; 90 (Suppl 1):S19–24.
32. Biegstraaten M., Cox T.M., Belmatoug N., et al. Management goals for type 1 Gaucher disease: An expert consensus document from the European working group on Gaucher disease Blood Cells, Molecules and Diseases, 2018; 68:203–208.
33. Weinreb N., Barranger J., Packman S., et al. Imiglucerase (Cerezyme) improves quality of life in patients with skeletal manifestations of Gaucher disease. Clin Genet, 2007; 71:576–588.
34. Mark T., Dominguez C. & Rywlin A.M. Gaucher's disease associated with chronic lymphocytic leukemia. Southern Medical Journal, 1982; 75:361–363.
35. Arends M., van Dussen L., Biegstraaten M., & Hollak C.E.M. Malignancies and monoclonal gammopathy in Gaucher disease; a systematic review of the literature. British Journal of Haematology, 2013; 161:832–842.

### Адрес за кореспонденция

Д-р Виктория Пламенова Върбанова  
Клиника по Хематология, Военномедицинска  
Академия, МБАЛ София  
бул. "Св. Георги Софийски" № 3 София 1606  
тел: 0884674160 e-mail: viktorii1982@abv.bg

# ПРОУЧВАНЕ ЧЕСТОТАТА НА СВЪРЗАНИ С ПРОТИВОТУМОРНО ЛЕЧЕНИЕ МИЕЛОИДНИ НЕОПЛАЗИИ

*И.Ненова<sup>1,4</sup>, Ж.Грудева-Попова<sup>2,4</sup>, В.Гръкланов<sup>2,5</sup>, Е.Спасов<sup>2,5</sup>, Е.Белева<sup>1,4</sup>,  
В. Попов<sup>3,4</sup>, К.Сотирова<sup>2,5</sup>, Д.Тумбева<sup>1</sup>*

*1-Клиника по медицинска онкология,*

*2-Клиника по клинична хематология*

*3-Клиника по лъчелечение – УМБАЛ „Св. Георги“ – ЕАД, Пловдив*

*4-Катедра по клинична онкология,*

*5-Първа катедра по вътрешни болести Медицински Университет,*

*Медицински Факултет – Пловдив*

## ANALYSIS OF THERAPY-RELATED MYELOID NEOPLASIA OCCURRENCE

*I.Nenova<sup>1,4</sup>, Zh.Grudeva-Popova<sup>2,4</sup>, V.Graklanov<sup>2,5</sup>, E.Spasov<sup>2,5</sup>, E.Beleva<sup>1,4</sup>,  
V. Popov<sup>3,4</sup>, K.Sotirova<sup>2,5</sup>, D.Tumbeva<sup>1</sup>*

*1-Clinic of Medical Oncology,*

*2-Clinic of Clinical Hematology,*

*3-Clinic of Radiation Oncology University Hospital “Sv. Georgi”- Plovdiv*

*4-Department of Clinical Oncology,*

*5-First Department of Internal Diseases Medical University, Medical Faculty – Plovdiv*

---

**Резюме.** От свързаните с противотуморна терапия малигнени хематологични заболявания най-чести и добре проучени са миелоидни неоплазии (t-MN). Те включват МДС (t-MDS), остра миелоидна левкемия (t-AML) и миелодиспластични/миелопролиферативни синдроми (t-MDS/MPNs), обособени като самостоятелни нозологични единици в класификация на СЗО от 2016 г. Прогнозата е неблагоприятна, а терапевтичната стратегия няма строги правила.

**Целта** на нашето проучване беше да се изследва честотата, характеристиката и прогнозата на пациентите с t-MN за 10 годишен период, лекувани в УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив.

**Пациенти и методи.** Изследвани са ретроспективно медицинските досиета на новодиагностицирани възрастни пациенти от УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив за периода от 2009-2018. Пациентите са с предшестващо малигнено заболяване – солиден тумор, лекуван с хирургични методи, с или без химиотерапия и лъчетерапия. Анализирани са случаите с втора MN, като от тях се обособи група на наблюдавани болни с t-MN. Диагностицирането и лечението на пациентите е съобразено със стандарта на Българското медицинско сдружение по хематология. При анализ на резултатите са приложени методи на дескриптивен анализ и методът на Каплан-Мейер за определяне на преживяемостта.

**Резултати.** Честота на t-MN. Общият брой на новодиагностицирани случаи с миелоидни неоплазии за 10 годишен период е 240 (остра миелоидна левкемия 166 и миелодисплазиен синдром 74). Регистрирани са 37 случаи на MN, като второ малигнено заболяване, от които оценени като t-MN – 22 (ОМЛ 5 и МДС 17). Честотата на свързана с терапия ОМЛ в нашето проучване е 3.01%, на МДС 22.97%, а общо за групата t-MN 9.16%. Характеристика на пациенти с t-MN. Повечето пациенти с t-MN са от женски пол (77.2%) с предшестващ карцином на гърдата лекуван – оперативно с химиотерапия и лъчетерапия. Латентният период варира в широки граници (8м.-30г). 41,17% от регистрираните t-MDS са с висок прогностичен риск (RAEB и CMML). Повечето пациенти от групата са екзитирали – 78.6%. Медианата на преживяемост е 12 месеца [95% С.І. 0-37.6 мес.]. Средната преживяемост е 28 мес [95% С.І. 14.6-41.5 мес.]. За сравнение при болните с ОМЛ и МДС, като второ, несвързано с терапия малигнено заболяване най-висок е броят на пациенти с предшестващ коло-ректален карцином.

**Обсъждане.** Повечето автори считат, че този късен феномен е рядък. Счита се, че при солидните тумори има по-ниска честотата на t-MN в сравнение с преболедувалите от хематологични заболявания. Честотата на t-MN в нашето проучване е 9.16%. Преживяемостта е сравнима с данните

от други проучвания. **Заключение:** t-MN имат сравнително ниска честота, но прогнозата е неблагоприятна, като се има предвид кратката преживяемост на пациентите. Наблюденията в тази насока имат специфични трудности, изискват продължително проследяване, добре организирана регистрация и съхранение на данни, както и насоченост в диспансерното наблюдение на пациенти със солидни неоплазии.

**Ключови думи.** Терапевтично свързани миелоидни неоплазии (t-MN), противотуморно лечение, преживяемост.

**Abstract.** Of all therapy related hematologic malignancies the most common and extensively studied is the group of myeloid therapy related neoplasms (t-MN). It comprises of MDS (t-MDS), acute myeloid leukemia (t-AML) and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (t-MDS/MPN). They have been defined as separate entities in the latest edition of WHO Classification from 2016. Prognosis is unfavorable and therapeutic strategy does not abide to strict guidelines.

**Aim** of our study was to determine incidence, features and prognosis of patients with t-MN, who have been diagnosed and treated at the University Hospital "Sveti Georgi" for a ten-year period. Case files of newly diagnosed patients were reviewed retrospectively for the period 2009-2018. Selected patients were with an antecedent solid tumor and had been treated surgically, either or not having received cytostatics and/or radiotherapy. Cases with second myeloid neoplasia were analyzed and a group of therapy related MNs was derived. Diagnosis and treatment of patients had been tailored according to the Bulgarian Hematology Association guidelines. Statistical methods included descriptive statistics and Kaplan-Meier survival analysis.

**Results.** Incidence of t-MN. Total number of registered newly diagnosed cases with myeloid neoplasia for ten-year period is 240 (AML 166 and MDS 74). Of those 37 were second malignancy and 22 of them were considered therapy related (AML 5 and MDS 17). Incidence of t-AML was found to be 3.01%, of MDS – 22.97% and cumulative incidence of t-MN was 9.16%. Patient characteristics. Majority of patients were female (77.2%) breast cancer survivors who had undergone chemo- and radiotherapy. Latency period ranged variably between 8 mo and 30 years, 41.17% of t-MDS cases had high risk (RAEB and CMML). Mortality rate at 5 years is 78.6%. Median survival is 12 mo (95% CI 0-37.6), mean survival time is 28 mo (95% CI 14.6-41.5). By comparison, among the patients with second primary therapy unrelated AML and MDS colorectal cancer was the solid tumor with highest incidence.

**Discussion.** Most authors consider t-MN a rare and late occurrence. It is reported that solid tumors have lower incidence than hematologic malignancies after previous anti-neoplastic therapy. Our reported incidence of t-MN is 9.16%. Survival time is comparable to reports by other authors.

**In conclusion.** Even though incidence of t-MN in our study is not high prognosis is dismal as judged by shortened survival time. We consider those cases of special interest since they require long-term follow up, good data acquisition and storage and would yield guidance for cancer patients surveillance.

**Key word.** Therapy related myeloid neoplasms (t-MN), antineoplastic treatment, survival.

---

## ВЪВЕДЕНИЕ

Съвременните тенденции в развитието на онкологията и хематологията създават предпоставки за дефиниране на нови термини като второ малигнено заболяване и свързани с терапията неоплазии. Свързаните с терапията неопластични заболявания се считат за пряка последица на предшестващо противотуморно лечение на първо малигнено заболяване, така че двата термина частично се припокриват. Най-чести и добре проучени са свързаните с лечение миелоидни неоплазии (t-MN), а те включват МДС и остра миелоидна левкемия (t-MDS и t-AML). На практика броят на пациентите е малък<sup>1,2</sup>. Въпреки това за важноста на проблема свидетелствуват данните, публикувани във вторичните информационни източници за медицинска литература от последните 15 години – седем проведени рандомизирани многоцентро-

ви клинични проучвания и над 150 публикации<sup>3,4,5</sup>. Освен това t-MN се обособяват като самостоятелни нозологични единици в класификацията на WHO 2016.<sup>6</sup> Цитираната честота на t-MN след конвенционална противотуморна терапия варира между 0.8%-6.3% за 20 годишен период, а след автоложна стволково-клетъчна трансплантация на 5 година 1.1%-24.3%.<sup>7,8,9,10,11</sup> Прогнозата е неблагоприятна, а терапевтичната стратегия няма строги правила.<sup>12,13</sup>

## ЦЕЛ

Целта на нашето проучване е да се изследва честотата, характеристиката и прогнозата на случаите с t-MN за 10-годишен период на пациенти, лекувани в УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив.

## ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

Изследвахме ретроспективно данните от медицинските досиета на новодиагностицирани възрастни пациенти, регистрирани в Клиниките по хематология, Клиника по Медицинска онкология и Клиника по лъчелечение на УМБАЛ Св“ Георги“- Пловдив за периода от 2009-2018. Използвани са и данни от регистрите за заболяемост на КОЦ, Пловдив. Пациентите са с регистрирано предшестващо малигнено заболяване – солиден тумор, лекуван с хирургични методи, с или без цитостатична химиотерапия и лъчетерапия. Анализираха се случаите с втора MN и от тях се обособи група на наблюдавани болни с t-MN. Диагностицирането на остра миелоидна левкемия и МДС бе в съответствие на възприетите от Българското медицинско сдружение по хематология (БМСХ) критерии, отговарящи на международно приетите. Приложен бе методът на конвенционален цитогенетичен анализ на костен мозък за определяне на прогностичния риск на MN. Лечението на пациентите е съобразено със стандарта за лечение на хематологични заболява-

ния на БМСХ.

При анализ на резултатите се приложиха методи на дескриптивна статистика. За анализ на преживяемостта се използва методът на Каплан-Мейер. Латентният период се определи като интервал между диагностицирането на първото малигнено заболяване и MN. Преживяемостта се определи на базата, на интервала между датата на диагноза на MN и смъртта на болния, респективно последната дата на проследяване.

## РЕЗУЛТАТИ

Честота на t-MN. Общият брой на новодиагностицирани случаи за 10 годишен период е: остра миелоидна левкемия 166 и миелодисплазиен синдром 74, общо 240. Регистрирани са 37 случаи на MN като второ малигнено заболяване. От тях, случаите, оценени като t-MN са 22 (ОМЛ 5 и МДС 17). Така честотата на свързана с терапия ОМЛ в нашето проучване е 3.01%, на МДС 22.97%, а общо за групата t-MN 9.16%, Табл.1.

Общ брой	ПОЛ М:Ж	СРЕДНА ВЪЗРАСТ	ПЪРВО МАЛИГНЕНО ЗАБОЛЯВАНЕ БРОЙ БОЛНИ	ВИД НА Т-MN	Латентен период	Вид лечение
22	5:17	66.42 г. (46-89 г.)	карц.гърда 5 карц.колон/ректум 3 овариален карц. 3 меланом 2 карц.пик.мехур 1 белодр.карц. 1 ендометр.карц. 1 М.Ходжин 1 кожен карц. 2 карц.простата 1 гърда+пик.мехур 1 Гърда+церв.утери +кожен 1	ОМЛ 5 МДС 17	126 мес (8мес-30г)	ХТ 9 ЛТ 3 ХТ+ЛТ 8 няма данни 2

*ХТ – химиотерапия; ЛТ – лъчетерапия; ХТ+ЛТ – химио/лъчетерапия*

Повечето пациенти с t-MN са диагностицирани с карцином на гърдата, имат последваща ХТ и лъчетерапия. Нямаше регистриран случай с първо малигнено кръвно заболяване и t-MN. Латентният период варираше в широки граници (8 м-30 г). 41,17% от регистрираните t-MDS са с висок прогностичен риск (RAEB и CMML). Само при един пациент с левкемия са намерени множествени бройни аномалии 46 XX,-9mar(3)/46,XX,-22+mar[4]/47,XX, +mar[17]/48,XX,+16,+21[1]. Един пациент от наблюдаваната група е с три малигнени заболявания – карцином на гърда, пикочен

мехур с последващ МДС. При друг пациент малигнените заболявания са 4 – карцином на гърда, шийка на матка и кожа, последващ МДС. Повечето пациенти от групата са починали – 78.6%. Медианата на преживяемост определена по метода на Каплан-Мейер е 12 месеца [95% С.І.0-37.6 мес.]. Средната преживяемост е 28 мес [95% С.І. 14.6-41.5 мес.]. 5-годишната преживяемост е 21.4%. fig.1. За сравнение е дадена характеристиката на болните с ОМЛ и МДС като второ, несвързано с терапия малигнено заболяване, табл. 2:

Общ брой	ПОЛ М:Ж	СРЕДНА ВЪЗРАСТ	ПЪРВО МАЛИГНЕНО ЗАБОЛЯВАНЕ БРОЙ БОЛНИ	ВИД НА Т-MN	Латентен период	Вид лечение
14	9:5	70.81 г. (43-87 г.)	карц.гърда 3 карц.колон/ректум 4 карц.пик.мехур 2 белодр.карц. 1 простата 1 астроцитом 1 пик.мех+ректум 1	ОМЛ 4 МДС 7 други 3	65.37мес (5мес-21г)	хирург.

В тази група най-висок е броят на пациентите, преболедували от коло-ректален карцином. 14.28% от t-MDS са с висок прогностичен риск (RAEB). С три малигнени заболявания, е един болен (карцином на ректум и на пикочен мехур с последваща ОМЛ). Между двете групи болни има разлика в демографската характеристика на пациентите – преобладаващият пол засегнат от t-MN са жените.

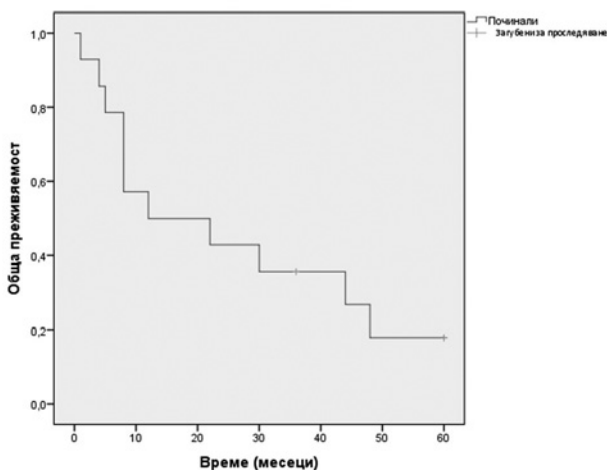


Fig.1. Преживяемост на пациенти с t-MN

## ОБСЪЖДАНЕ

Едни от първите наблюдения на t-MN са направени при проследяване на болни, след лечение на Ходжкинов и неходжкинови лимфоми. 14,15 Терапевтично-свързани миелоидни неоплазии (t-MNs) включват, терапевтично свързаните случаи на остра миелоидна левкемия (t-AML), миелодиспластични синдроми (t-MDS) и миелодиспластични/миелопролиферативни неоплазии (t-MDS/MPNs). За първи път като самостоятелна нозологична единица терминът се среща в СЗО-класификацията на миелоидните неоплазии (2008г.) като се запазва и в ревизираното издание от 2017г. С оглед нарастващата преживяемост на пациентите с неопластични заболявания се очаква и ръст на t-MNs. 6,16

Съобщава се, че 10% до 20% от всички случаи на ОМЛ, МДС, МДС/МПН са терапевтично свързани. 17 Повечето автори считат, че този късен феномен е рядък. 1 60- 70% от пациентите с t-MNs са лекувани от предшестващ солиден тумор, 20-30% за малигнена хемопатия и 5-10% за бенигнено заболяване (автоимунно). 18,19 Преобладават пациентите с карцином на гърдата и неходжкинов лимфом. В последното десетилетие нарастват случаите на пациенти, лекувани с вискодозова химиотерапия и последваща автоложна стволово-клетъчна терапия при немиелоидни неоплазии. 1,3,4. В нашето проучване също преобладаващия солиден тумор бе карцином на гърдата. Това обяснява донякъде и преобладаването на жените сред t-MN.

Съществуват хипотези относно патогенезата на t-MN. Счита се, че основна роля играят генетични рискови фактори поради високата честота на цитогенетични нарушения в костния мозък – 64% от случаите, при което високорисков е кариотипът на 39% от болните. 4,20,21,22 Неблагоприятният кариотип и високата честота на TP53 мутация имат определяща прогностична роля. В това отношение роля играят герминативни мутации свързани с гени, създаващи вродено предразположение към неоплазии. Такива се установяват при 8.5-12.6% от болните с онкологични заболявания. 22,23 Тази генетична чувствителност може да е причина за независимо от терапията развитие на второ малигнено заболяване. Подобно обяснение може да има при регистрираните от нас пациенти с три и четири малигнени неоплазии, особено тези с коло-ректален карцином.

Една от хипотезите допуска клонална селекция на преди-съществуващ мутантен клон стволови клетки, което обяснява и терапевтичната им резистентност.\* След една линия ХТ при 15% от пациентките с карцином на гърда/овариум се установява клонална хемопоеза, а след две линии – при 27%. 17 TP53 мутация е откриваема в кръвта на пациенти с t-MN още преди начало на лечение. Противотуморното лечение индуцира допълнително левкемогенни мутации.

Друга хипотеза извежда на преден план дефекти в микросредата и т.н. костно-мозъчна ниша, като посочва нарушената диференциация на стромалните мезенхимни клетки при МДС.17

Изненадващи са резултатите от някои генетични изследвания за съпоставимост на t-MN de novo AML. Приема се, че при t-MN има по-висока честота (70%) на високорисков кариотип (комплексен, абнормности на 5 и 7 хромозомна двойка) в сравнение с de novo ОМЛ (20%). Но случаите на t-MN с високорисков кариотип не се различават по мутационен, клиничен и морфологичен профил от de novo ОМЛ с високорисков кариотип, т.е. двете групи заболявания не са различни на генетично ниво.17

Прогнозата на t-MN е лоша, в повечето случаи това са агресивни, летални болести.17,24,25,26 Счита се, че t-MN са основна причина за смърт след автologna стволоро-клетъчна трансплантация и при ремисия на предшестващия тумор. 11 Медианната преживяемост посочена в литературата е 8 и 8.6 месеца 5,17, а 5-годишната 10%. 17,27,28,29,30 Според Маунг и съавт. 5 средната преживяемост при t-MDS е 8.6 месеца, на t-AML 6.9 мес. Нашите данни сочат медианна преживяемост 12 мес., което бихме могли да свържем с по-високия брой регистрирани от нас случаи с t-MDS, а не t-AML, с наличието на нормален кариотип при повечето болни, както и с факта, че болните са преживели солиден тумор, а не онкохематологично заболяване.

Съществуват съществени разминавания в посочената от различни изследователи честота на t-MN. Счита се, че при солидните тумори е по-ниска честотата на t-MN – 38.4% сравнение с 61.5% при хематологичните. 5 Други автори, обобщавайки и анализирайки резултатите от 4 клинични проучвания на пациентки (общ брой 9679) с карцином на гърда установяват 0,4% t-MN, която честота е близка до тази на общата популация над 60 год. възраст.1 В нашето проучване, върху сравнително малък брой обследвани случаи, установихме честота на t-MN 9.16%. При анализ на нашите данни елимирахме пациенти, лекувани с медикаменти с недоказан генотоксичен ефект (хормонотерапия). Възможни са и някои неточности при регистрирането особено при подобен ретроспективен анализ.

Латентният период за поява на t-MN след лечение на солидни тумори в нашето проучване е средно 126 мес. с много широк интервал. Посочените данни в литературата са оскъдни. Маунг и съавт. определят този период на 60 мес, 5 но в анализирания от него група преобладават болните с първо малигнено кръвно заболяване – 61.5%, следователно и с предварително увредена хемопоеза и предразположение към ОМЛ и МДС. Изследователите изтъкват, че при t-MN след солидни тумори има по-продължителен латентен период в сравнение с хематологичните неоплазии като първо заболяване.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашето ретроспективно проучване установихме честота на t-MN след лекуван малигнен солиден тумор 9,16% (ОМЛ 3.01%, на МДС 22.97%). Рискът от това усложнение беше повишен при пациентки с карцином на гърдата. Прогнозата е неблагоприятна, като се има предвид медианата на преживяемост от 12 мес и средната 28 месеца.

Считаме, че наблюденията в насока вторични неоплазии поставят специфични трудности, изискват продължително проследяване, добре организирана регистрация и съхранение на данни, както и насоченост в диспансерното проследяване на пациентите.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Freedman RA, Seisler D, Foster, J et al. Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among older women receiving anthracycline-based adjuvant chemotherapy for breast cancer on Modern Cooperative Group Trials (Alliance A151511). *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Jan; 161(2):363–373
2. Carlos E, Bueso-Ramos M, Kanagal-Shamanna R, Mark J. et al. Therapy-Related Myeloid Neoplasms“ *Am J Clin Pathol* August 2015; 144:207-218
3. Hulegardh E, Christer Nilsson, Vladimir Lazarevic et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: A report from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Am J Hematol*, 2015; 90:208-214
4. Fianchi L, Pagano L, Piciocchi A et al. Characteristics and outcome of therapy-related myeloid neoplasms: Report from the Italian network on secondary leukemias. *Am J Hematol.* 2015 May;90(5):E80-5
5. Maung S W, Burke C, Hayde J et al. A review of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia (t-MDS/AML) in Irish patients: a single centre experience. *Hematology* 2017, 22:341-6.
6. Vardiman J, Arber D, Brunning R, et al. Therapy-Related Myeloid Neoplasms WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 153-155
7. Dores M, Tucker M, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood* 2013; 121:2996-3004
8. Gale R, Bennett J, Hoffman F, et al. Therapy-related AML: a slip of the lip can sink a ship. *Leuk Res* 2014; 38:418-420
9. Hoyle C, de Bastos M, Wheatley K, et al. AML associated with previous cytotoxic therapy, MDS or myeloproliferative disorders: results from the MRC's 9th AML trial. *Br J Haematol* 1989; 72: 45–53 [PMID: 2736242 DOI: 10.1111/j.1365-2141.1989.tb07650.x]
10. Godley L, Larson R. Therapy-related myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2008; 35: 418–429 [PMID: 18692692 DOI: 10.1053/j.seminoncol.2008.04.012]
11. Bhatia S. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Semin Oncol* 2013; 40:666–675 [PMID: 24331189 DOI: 10.1053/j.seminoncol.2013.09.013]
12. Morton LM, Dores GM, Tucker MA, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood.* 2013 Apr 11;121(15):2996-3004
13. Fianchi L, Pagano L, Piciocchi A, et al. Characteristics and outcome of therapy-related myeloid neoplasms: Report from the Italian network on secondary leukemias. *Am J Hematol.* 2015 May;90(5):E80-5
14. Travis LB1, Curtis RE, Glimelius B et al. Second cancers among long-term survivors of non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Dec 1;85(23):1932-7.
15. Pui CH1, Ribeiro RC, Hancock ML et al. Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 1991 Dec 12;325(24):1682-7.

16. Pagana L, Pulsoni A, Tosti ME, et al. Clinical and biological features of acute myeloid leukaemia occurring as second malignancy: GIMEMA archive of adult acute leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 112: 109–117 [PMID: 11225603 DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02527.x]
17. McNerney ME, Godley LA, Le Beau MM. Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nat Rev Cancer*. 2017 Aug 24;17(9):513-527
18. Sill H, Olipitz W, Zebisch A, et al. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *Br J Pharmacol* 2011; 162: 792–805 [PMID: 21039422 DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01100.x]
19. Singh ZN1, Huo D, Anastasi J, Smith SM, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome: morphologic subclassification may not be clinically relevant. *Am J Clin Pathol*. 2007 Feb;127(2):197-205
20. Smith SM1, Le Beau MM, Huo D, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003 Jul 1;102(1):43-52.
21. Schoch C, Kern W, Schnittger S, et al. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia* 2004; 18:120–125 [PMID: 14586477 DOI: 10.1038/sj.leu.2403187]
22. Andersen M, Johansson B, Larsen SO, et al. Chromosomal abnormalities in secondary MDS and AML: relationship to drugs and radiation with specific emphasis on the balanced rearrangements. *Haematologica* 1998;83:483-488
23. Schulz E, Valentin A, Ulz P, et al. Germline mutations in the DNA damage response genes BRCA1, BRCA2, BARD1 and TP53 in patients with therapy related myeloid neoplasms. *J Med Genet*. 2012;49:422-428 Link DC, Schuettpeiz LG, Shen D, et al. Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through wholegenome sequencing of a patient with therapy-related AML. *JAMA* 2011; 305:1568-1576
24. Godley L, Njiaju U, Green M, et al. Treatment of therapy-related myeloid neoplasms with high-dose cytarabine/mitoxantrone followed by hematopoietic stem cell transplant. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 995–1006 [PMID: 20536346 DOI: 10.3109/10428191003763468]
25. Kantarjian H, Estey E, Keating M. Treatment of therapy-related leukemia and MDS. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7: 81–107 [PMID: 7680643]
26. Larson R, Wernli M, Le Beau M, et al. Short remission durations in therapy-related leukemia despite cytogenetic complete responses to high-dose cytarabine. *Blood* 1988; 72: 1333–1339 [PMID: 3167210]
27. Litzow M, Tarima S, Pérez W, et al. Allogeneic transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Blood* 2010; 115:1850–1857 [PMID: 20032503 DOI: 10.1182/blood-2009-10-249128]
28. Klimek V, Dolezal E, Tees M, et al. Efficacy of hypomethylating agents in therapy-related MDS. *Leuk Res* 2012; 36:1093–1097 [PMID: 22608310 DOI: 10.1016/j.leukres.2012.04.025]
29. Friedberg J, Neuberger D, Stone R, et al. Outcome in patients with MDS after autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:3128–3135 [PMID: 10506609]
30. Yakoub-Agha I, de La Salmonière P, Ribaud P, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for therapy-related MDS and acute myeloid leukemia: a long-term study of 70 patients—report of the French society of bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 2000; 18: 963–971 [PMID: 10694545]

### Адрес за кореспонденция

Проф. Д-р Жанет Грудева-Попова, д.м.

УМБАЛ "Св.Георги" – гр.Пловдив

Началник клиника по клинична хематология

Медицински университет, Медицински факултет –Пловдив

mail : dr\_grudeva@yahoo.com

тел/факс: 032/602 777(880), GSM: 0888 254 816

### Correspondence address:

Prof. Zhanet Grudeva-Popova, MD, PhD, MHM

University Hospital "Sv. Georgi" – Plovdiv

Head of Clinical Hematology Department

Medical University, Medical Faculty – Plovdiv

mail : dr\_grudeva@yahoo.com

tel./fax: 032/602 777(880), GSM: 0888 254 816

**НАСТОЯЩО И БЪДЕЩО МЯСТО НА PONATINIB ПРИ ЛЕЧЕНИЕТО  
НА ХРОНИЧНА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ И RH ПОЗИТИВНА ОСТРА  
ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ**

**Joanna Wąclaw Tomasz Sacha**

*Katedra i Klinika Hematologii Uniwersytet Jagiellonski – Collegium Medicum, Krakow Kierownik:  
prof. dr hab. Aleksander B. Skotnicki*

**CURRENT AND FUTURE PLACE OF PONATINIB IN THE  
TREATMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA AND  
PH+ ACUTE LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**

**Joanna Wąclaw Tomasz Sacha**

*Katedra i Klinika Hematologii Uniwersytet Jagiellonski – Collegium Medicum, Krakow Kierownik:  
prof. dr hab. Aleksander B. Skotnicki*

**Резюме.** Ponatinib е тирозинкиназен инхибитор (ТКИ) от трето поколение с мощно действие срещу BCR-ABL1 и всички единични резистентни мутации, включително „gatekeeper“ мутацията /мутация „пазач“/ T315I. Ponatinib е одобрен за лечение на възрастни пациенти с хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) в хронична фаза (ХФ), фаза на акцелерация /обостряне/ (ФА) или фаза на бластна трансформация /бластна криза/ (БК), които са резистентни или имат непоносимост към dasatinib или nilotinib или такива с мутация T315I; както и за лечение на възрастни пациенти с Филадельфия-позитивна остра лимфобластна левкемия (Ph+ ОЛЛ), които са резистентни или имат непоносимост към dasatinib, или такива с мутация T315I. В пилотното, фаза II проучване PACE участват 267 пациенти с ХМЛ-ХФ, 83 с ХМЛ-ФА и 94 пациенти с ХМЛ-БК или Ph+ОЛЛ. Мутация T315I се установява съответно при 64, 18 и 46 пациенти. Два или повече предходни ТКИ са използвани при 93%, а три или повече ТКИ при 58% от пациентите преди включването на ponatinib. Средното проследяване е продължило 4 години. Сред пациентите с ХМЛ-ХФ, 4-годишните показатели за преживяемост без прогресия (PFS) и обща преживяемост (OS) са съответно 56% и 77%; 82% от тези пациенти постигат голям цитогенетичен отговор (МСуR), а голям молекулярен отговор (MMR) – 61%. Средната обща преживяемост на пациентите с ХМЛ-БК и Ph+ ОЛЛ е 6.9 месеца. Данни за ефикасността на ponatinib като първа линия лечение на пациенти с ХМЛ-ХФ са получени в проучвания от фаза II и фаза III. Поради сериозните нежелани събития (предимно артериална оклузия), проучването EPIC, изследващо ponatinib като първа линия на лечение, е преустановено. Ponatinib е ценно лекарствено средство в терапията на пациенти с ХМЛ и Ph+ ОЛЛ, резистентни или с непоносимост към други ТКИ, и такива с мутация T315I.

**Ключови думи.** ponatinib, инхибитори на тирозинкиназата, хронична миелоидна левкемия Филадельфийска хромозома

**Abstract.** GPonatinib is a third-generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) with potent activity against BCR-ABL1 and all single resistance mutants, including the gatekeeper mutant T315I. Ponatinib is approved for the treatment of adult patients with chronic phase (CP), accelerated phase (AP), or blast phase (BP) chronic myeloid leukemia (CML) who are resistant or intolerant to dasatinib or nilotinib or who have the T315I mutation and for the treatment of adult patients with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL) who are resistant or intolerant to dasatinib or who have the T315I mutation. In a pivotal phase II PACE study 267 patients with

CP-CML, 83 with AP-CML and 94 patients with BP-CML or Ph+ALL were enrolled. T315I mutation were detected in 64, 18 and 46 patients, respectively. Two or more or three or more TKIs were used before ponatinib in 93% and 58% of patients, respectively. The median follow-up was 4 years. Among patients with CP-CML, 4-year rates for progression-free survival (PFS), overall survival (OS), major cytogenetic response (MCyR) and major molecular response (MMR) were 56%, 77%, 82% and 61%, respectively. Median OS for BP-CML and Ph+ ALL was 6.9 months. Efficacy of ponatinib as a first-line treatment for CP-CML patients was suggested in phase II and phase III trials. However, due to serious adverse events, predominantly arterial occlusion, the EPIC trial investigating ponatinib in a first line setting was discontinued. Ponatinib is a valuable agent for patients with CML and Ph+ ALL resistant or intolerant to other TKIs and those with T315I mutation.

**Key word.** ponatinib, tyrosine kinase inhibitors, chronic myeloid leukemia, Philadelphia chromosome

## ВЪВЕДЕНИЕ

Въвеждането на тирозинкиназните инхибитори (ТКИ) значително промени прилаганите начини за лечение на хроничната миелоидна левкемия (ХМЛ). В днешно време, повечето пациенти с ХМЛ в хронична фаза имат продължителност на живота, сравнима с тази на общото население. Въпреки това, ТКИ от първа генерация – imatinib се оказва неефикасен за до 40% от пациентите поради възникнала резистентност или непоносимост [1]. Освен това, 37 до 52% от тези пациенти не се повлияват и от втора генерация ТКИ (nilotinib, dasatinib и bosutinib) [2-6]. Резистентността към ТКИ често се предизвиква от мутации в областта на BCR-ABL1 киназата.

При пациентите с Ph + или BCR-ABL1-позитивна остра лимфобластна левкемия (Ph+ ОЛЛ), които формират около 25% от пациентите с В-клетъчна ОЛЛ, се наблюдава твърде неблагоприятна прогноза при системна химиотерапия, и по специално, ако не бъдат подложени на аlogenна трансплантация на стволови клетки след първа ремисия. Въвеждането на ТКИ от първа и втора генерация в комбинация с химиотерапия, революционизира лечението на Ph+ ОЛЛ и подобри резултата от терапията, превръщайки го в стандарт за лечение на такива пациенти. Въпреки високата степен на ефикасност на тази комбинация, тригодишната преживяемост без рецидив (PFS) и общата преживяемост (OS) при възрастни пациенти с Ph+ ОЛЛ остава едва около 40% и съответно 60% [7,8]. Тази относително ниска преживяемост се дължи най-вече на резистентност към ТКИ. Както при ХМЛ, резистентността към ТКИ при Ph+ ОЛЛ може да е предизвикана от мутации в областта на BCR-ABL1 киназата. Ponatinib (Iclusig®) е трето поколение ТКИ с мощно действие срещу BCR-ABL1 и срещу всички единични резистентни мутации, включително „gatekeeper“ мутацията / мутация „пазач“/ T315I, показваща резистентност към всички други ТКИ. В предклинични in vitro изследвания, 40 nM ponatinib (концентрация, постигната при пациенти, получавали дневна доза > 30 mg) подтиска появата на единични мутации [9,10]. Ponatinib е одобрен за лечение на възрастни пациенти с ХМЛ в хронична фаза, фаза на акцелера-

ция или бластна криза, които са резистентни към dasatinib или nilotinib или такива с непоносимост към dasatinib или nilotinib и за които последващото лечение с imatinib не е клинично показано, включително и при пациенти с мутация T315I. Лекарственото средство е одобрено и за пациенти с Ph+ ОЛЛ, които са резистентни към dasatinib или такива с непоносимост към dasatinib и за които последващото лечение с imatinib не е клинично удачно, както и в случаи на мутация T315I [11].

В настоящата статия разглеждаме сегашното и бъдещото място на ponatinib в лечението на ХМЛ и Ph+ ОЛЛ въз основа на данни от последните срещи на ASCO (Американско сдружение по клинична онкология), ASH (Американско сдружение по хематология) и Втория експертен семинар по ХМЛ и Ph+ОЛЛ, проведен в Будапеща на 24-25 ноември 2016 г.

## PONATINIB ПРИ ХМЛ В ХРОНИЧНА ФАЗА

Ефикасността и безопасността на ponatinib са оценени в проучване от фаза 1 при 81 пациенти с резистентни/неподатливи на лечение хематологични злокачествени заболявания. Пациентите са лекувани с ponatinib с начална доза 2 mg/d – 60 mg/d. През м. октомври 2013 г. е приложено намаляване на дозата в резултат на повишената честота на артериално-оклузивни събития (АОС) заедно с по-продължително проследяване, в рамките на клиничната програма за ponatinib. По време на 58-ата годишна среща на ASH, бяха представени данните от четиригодишното проследяване на пациенти с ХМЛ в хронична фаза (ХМЛ-ХФ) от това проучване. Средното проследяване е 53.1 месеца. При включването, средната възраст е била 55 години, а средното време от диагнозата – 6.6 години. Мутации в областта на BCR-ABL1 киназата се отчитат при 63% от пациентите, като T315I се потвърждава от централна лаборатория при 28% от пациентите. Пациентите са били сериозно претретирани, като 37% са приемали 2 предходни ТКИ, а 60% са приемали > 3 предходни ТКИ. От 43 пациенти с ХМЛ-ХФ, 22 (51%) продължават лечението с ponatinib към датата на прекъсване на събирането на данни. Кумулативните нива на

отговор към терапията са: голям цитогенетичен отговор (МСуR) 72%, пълен цитогенен отговор (ССуR) 65%, голям молекулярен отговор (MMR) 56%, молекулярен отговор 4.0 (MR 4.0) 42%, молекулярен отговор 4.5 (MR 4.5), 28% (Табл. I). Отговорите са устойчиви, като средна устойчивост на отговора не е постигната за МСуR, ССуR, и MMR. Сред пациентите, които приемат ponatinib в начални дози < 30 mg/d (n = 15), МСуR е постигнат при 67%, ССуR от 53%, а MMR при 47%; към момента на отговора, дозата ponatinib е < 30 mg/d при всички, с изключение на един от тези пациенти. От 22 продължаващи приема пациенти, към момента на представяне на анализа, 18 (82%) са с ССуR, а 17 (77%) – с MMR или по-добър отговор. Нежелани лекарствени реакции (НЛС) при 26%, и прогресия на заболяването при 9% от пациентите, са били най-честите причини за преустановяване на терапията. Обрив (65%), уморяемост (63%), коремни болки (58%), главоболие (58%) и артралгия (53%) с най-честите НЛС, възникнали по време на лечението. Честотата на АОС (всички/сериозни) е 40%/30% (по подкатегории: сърдечно-съдови – 30%/21%; мозъчно-съдови – 9%/7%; периферно-съдови – 14%/9%) [12].

В проучване на ponatinib от фаза 2 при Ph+ левкемии (РАСЕ), участват 449 претретиранни пациенти, с ХМЛ или Ph+ ОЛЛ с резистентност или нетолерантност към dasatinib или nilotinib, както и такива с мутация Т315I. Ponatinib се е прилагал с първоначална доза от 45 mg веднъж дневно. По време на годишното среща на ASCO през 2016 г. са представени данните от четиригодишното проследяване в проучването РАСЕ. Намаление на дозата ponatinib е препоръчана през м. октомври 2013 г. поради наблюдавани АОС. Към момента на анализа 41% (110/270) от пациентите с ХМЛ-ХФ (средно проследяване 48.2 месеца) продължават участието си в проучването. Прогнозните 4-годишни стойности за преживяемостта без прогресиране (PFS), общата преживяемост (OS), и поддържането на МСуR и MMR са съответно 56%, 77%, 82% и 61%. Чести (при > 30% от пациентите) НЛС (всички степени) са тромбоцитопения 44%, коремни болки 43%, обрив 42%, констипация 37%, главоболие 37%, суха кожа 36%, уморяемост и повишено артериално налягане 30%. Нивата на АОС (всички степени)/сериозни АОС е 23%/19%, включващи кардио- 13%/9%, cerebro 9%/7%, и периферно-васкуларни 9%/7% нежелани събития. От всички пациенти с АОС (n=104), 38% продължават участието си в проучването. Почти 2 години след препоръчаното намаление на дозата за 87% (114/131) и 74% (70/95) от пациентите с ХМЛ-ХФ се установява, че поддържат МСуR и MMR, а 8% (6/75) от всички пациенти с намалена доза без предишни АОС в проучването, претърпяват АОС [13].

За установяване на възможните предиктивни фактори за отговора към ponatinib, Hochhaus и коле-

ги провеждат последващ анализ на резултатите сред пациенти с ХМЛ-ХФ, включени в проучването РАСЕ, според броя ТКИ приемани преди включване в проучването. Пациентите с ХФ- ХМЛ са оценени въз основа на предходно лечение с 1,2, 3 или 4 ТКИ, одобрени за употреба при ХМЛ-ХФ (т.е., imatinib, dasatinib, nilotinib, и bosutinib). Нивата на цитогенетичния и молекулярния отговор към ponatinib са по-високи при по-малък брой прилагани предходни ТКИ. Честотата на НЛС клас > 3 изглежда се увеличава спрямо броя приемани по-рано ТКИ (съответно 68%, 86%, 89%, и 100%). Подобна зависимост се наблюдава и в честотата на сериозните НЛС, каквито възникват при 58%, 53%, 62%, и 92% от пациентите приемали по-рано съответно 1,2, 3, и 4 одобрени ТКИ. Честотата на АОС е съответно 32%, 26%, 28%, и 42%, съобразно увеличаването на предходните ТКИ [14].

Jabbour и колеги провеждат анализ на ефикасността и безопасността на ponatinib в субгрупата от пациенти с ХМЛ-ХФ и с мутация Т315I от фаза 1 и фаза 2 (РАСЕ) проучванията. В анализа са включени общо 76 пациенти с Т315I+ ХМЛ-ХФ (фаза 1, n=12; РАСЕ, n=64). Към момента на анализа, средната продължителност на проследяването при пациентите с Т315I+ ХМЛ-ХФ е 40 (диапазон: 1.5-74) месеца; 37 пациента (49%) продължават участието си в проучването. Средната плътност на базовата доза ponatinib е 33 mg дневно; 25/37 (68%) от продължилите участието си пациенти, приемат 15 mg дневно като актуална доза към момента на прекъсване събирането на данни. Основните причини за преустановяване участието на пациентите с Т315I+ ХМЛ-ХФ е прогресия на заболяването [10/76 (13%)] и НЛС [9/76 (12%)]. Кумулативните нива на отговор при пациентите с Т315I+ ХМЛ-ХФ (n=76) са: МСуR, 75%; ССуR, 72%; MMR, 61%, и MR4.5, 37%. Данните за OS и PFS са оценени единствено за подгрупата от проучването РАСЕ. Критериите за прогресия на заболяването включват смърт, развиване на ХМЛ в напреднала фаза, загубване на пълен хематологичен отговор (CHR) (при отсъствие на цитогенетичен отговор) и загуба на МСуR. Прогнозните стойности за 3-годишна PFS и OS за 64 пациента с Т315I+ ХМЛ-ХФ са съответно 60% и 78%, (медианите не са достигнати). Най-честите възникнали при лечението НЛС (> 40%) в избраната група от пациенти с Т315I+ ХМЛ-ХФ (n=76, фаза 1 и РАСЕ) са: обрив, 55%; суха кожа, 49%; главоболие, 46%; коремни болки, 43%; гадене, 41% и уморяемост, 41%. Сред тези пациенти, кумулативните нива на АОС – всички степени/АОС степен 3/4 е 32%/20%; по подкатегории: сърдечно-съдови 20%/15%, мозъчно-съдови 12%/5%, и периферно-съдови 13%/8% събития [15].

Проучването EPIC (The Evaluation of Ponatinib versus Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia) представлява рандомизирано, отворено, проучване от фаза 3, предназначено за проверка на ефикас-

ността и безопасността на ponatinib в сравнение с imatinib при новодиагностицирани пациенти с ХМЛ-ХФ.

На включване в проучването подлежат пациенти на възраст поне 18 години, не по-късно от 6 месеца след диагностициране, Ph+ според цитогенетична оценка, които не са били третирани по-рано с ТКИ. 307 пациенти са рандомизирани за прием на ponatinib (45 mg) (n=155) или imatinib (400 mg) (n=152). Проучването е прекратено предсрочно през м. октомври 2013 поради притеснения, касаещи съдови нежелани събития, наблюдавани при пациенти, приемащи ponatinib в други проучвания. Прекратяването на проучването ограничава оценката на първичната крайна цел – MMR след 12 месеца, тъй като едва 13 пациента в групата с imatinib и десет пациента в групата с ponatinib подлежат на оценяване към посочения момент. При прекратяване на проучването, медианата на проследяването за цялата популация на проучването е 5.1 месеца (5.0 за групата с ponatinib и 5.3 за групата с imatinib). Частта от пациентите, които постигат MMR след 12 месеца, не се различава съществено между двете групи: осем от всеки десет пациента, които приемат ponatinib, и пет от 13 пациента, които приемат imatinib. По отношение на вторичните крайни цели, частта от пациентите, които постигат MMR след 3, 6 и 9 месеца, е значително по-висока в групата с ponatinib, отколкото при imatinib: съответно 31%, 62% и 86% в сравнение с 3%, 22% и 33%. Значително повече пациенти постигат MMR, MR4.0 и MR4.5 във всеки един момент в групата с ponatinib спрямо групата с imatinib (съответно 41%, 21% и 15% в сравнение с 18%, 1% и 0%). Тази констатация е сходна, независимо от оценката на риска по Sokal. Процентът от пациентите, които постигат равнища на BCR-ABL1 транскриптите под 10% (IS; международна скала) след 3 месеца е значително по-висок при пациентите приемащи ponatinib, отколкото при третираните с imatinib (94% спрямо 68%), независимо от категорията на риска по Sokal. Значително повече оценявани пациенти, третирани с ponatinib (74% и 86% спрямо 53% и 60%), постигат CCyR, по всяко време и съответно след 6 месеца. Единадесет (7%) от 154 пациента, които приемат ponatinib, и трима (2%) от 152 пациента, които приемат imatinib имат АОС (p=.052); АОС са определени като сериозни при 10 (6%) от 154 пациенти, приемащи ponatinib, и при 1 (1%) от 152 пациенти, приемащи imatinib (p=.010). НЛС от степен 3 или 4, наблюдавани при повече от 5% от пациентите в групата с ponatinib, са: повишена липаза (14% в сравнение с 2% при imatinib), тромбоцитопения (12% в сравнение с 7% при imatinib), обрив (6% в сравнение с 1% при imatinib). В групата с imatinib, НЛС от степен 3 или 4 наблюдавани при повече от 5% от пациентите са неутропения (8% в сравнение с 3% при ponatinib) и тромбоцитопения (7% в сравнение с 12% при ponatinib). Сериозните НЛС, които възникват при трима или повече пациенти,

приемащи ponatinib, са панкреатит (n=5), предсърдно мъждене (n=3) и тромбоцитопения (n=3). Не се наблюдават сериозни НЛС при трима или повече пациенти, в групата с imatinib [16].

Друго еднорамно проучване от фаза 2, изследващо ефективността и безопасността на ponatinib като първа линия лечение при пациенти с ХФ- ХМЛ, е проведено в Онкологичен център MD Anderson в Хюстън, САЩ. В него участват 51 пациенти със средна възраст 48 години (диапазон 21-75) с раннодиагностицирана (< 6 месеца) ХФ- ХМЛ. Оценката по Sokal

е за нисък риск при повечето пациенти; резултатът според EUTOS е нисък риск при 41 (91%) от 45 оценени пациента и висок риск при четирима (9%). Не се е допускала предхождаща терапия за ХМЛ, различна от хирокси-карбамид или не повече от 1 месец терапия с одобрени ТКИ. Първоначално пациентите са приемали начална доза ponatinib 45 mg/d. Поради проблеми с поносимостта, дозата е намалена до 30 mg/d. След предупреждение от FDA (US Food and Drug Administration) през м. октомври 2013 г за съдови усложнения свързани с ponatinib, всички пациенти започват прием на аспирин 81 mg дневно; дозата ponatinib е намалена до 30 mg или 15 mg/d за всички пациенти. Проучването е прекратено през м. юни 2014 г. по препоръка на FDA, поради притеснения относно повишения риск от тромбоемболия, свързан с ponatinib. Средното проследяване е 20.9 месеца (interquartile range, IQR – 14.9-25.2). При 43 пациенти започва прилагане на ponatinib 45 mg/d, осем пациенти – 30 mg/d. Кумулативния процент на пациентите, постигнали CCyR, е 96% (48 от 50), MMR е 80% (40 от 50), и MR4.5 – 55% (28 от 50). При никой от 50-те пациенти няма прогресиране, включително трансформация към акцелерирала форма или бластна криза през целия период на наблюдение, и всички пациенти са живи към момента на последното проследяване. Прогнозните стойности за PFS (преживяемост без прогресиране), и OS (обща преживяемост) след 24 месеца са 100%. Повечето чести прояви на токсичност включват кожни въздействия (n=35; 69%) и повишена липаза (n=32; 63%). Сърдечно-съдови събития (основно повишено артериално налягане) се наблюдават при 25 (49%) пациенти. Миелосупресия от степен 3-4 се наблюдава при 15 (29%) пациенти. Петима пациенти (10%) развиват мозъчно-съдови или вазооклузивни заболявания. 43 пациенти (85%) се нуждаят от прекъсване на лечението в даден момент, а 45 (88%) – от намаляване на дозата [17].

Тъй като това изследване и проучването EPIC са прекратени преждевременно, тепърва предстои установяване на ефикасността и безопасността на ponatinib при използване като първа линия терапия.

Таблица 1

Устойчивост на отговора при пациенти с ХМЛ-ХФ (n=43) третиран с ponatinib. Проучване от фаза I, 4-годишно проследяване[12].

	ОТГОВОР N	ИЗГУБИЛИ ОТГОВОР NA	ПРОГНЗ.УСТОЙЧИВОСТ НА ОТГОВОРА СЛЕД 4 ГОДИНИ % (95% CI)*В
MCyR	31	8	71 (49 – 84)
CCyR	28	8	70 (48 – 84)
MMR	24	11	50 (28 – 69)

а) Не постигат критериите за всеки тип отговор във всеки момент, след първоначален отговор б) Оценка по Карл-Мейер \* Confidence interval – доверителен интервал

### РОНАТИНИВ ПРИ ХМЛ В НАПРЕДНАЛА ФАЗА И PH+ ОЛЛ

В проучване от фаза 1 на Ponatinib при рефрактерна Ph+ левкемия, участват 9 пациенти с ХМЛ във фаза на акцелерация (ХМЛ-ФА), 8 с ХМЛ в бластна криза (ХМЛ-БК), и 5 с Ph+ ОЛЛ. Те са третиран с ponatinib с начална доза 2 mg/d – 60 mg/d. При всички тествани пациенти заболяването е в рецидив или резистентно към одобрените ТКИ (imatinib, dasatinib, или nilotinib). Деветдесет и един процента от пациентите с Ph+ са приемали два или повече одобрени ТКИ: 40% са приемали imatinib последван от dasatinib или nilotinib, а 51% са приемали imatinib последван от dasatinib и nilotinib. При включване в проучването 19 от 22 пациенти (86%) в напреднал стадий на болестта носят поне една мутация в областта на BCR-ABL1 киназата; най-честата мутация е T315I. Медианата на проследяването към момента на анализа е 66 седмици. От 22-та пациенти в напреднал стадий на болестта, 8 (36%) постигат голям хематологичен отговор (MaHR), 7 (32%) постигат MCyR, а 2 (9%) постигат MMR. Сред пациентите със MaHR, средното време до отговор е 8 седмици, а устойчивостта на отговора варира от 0.1 до 64 седмици (средно 16). Най-честите нехематологични, свързани с лечението НЛС са кожни оплаквания (напр. обрив, акнеподобен дерматит, и суха кожа) и конституционални симптоми (напр. артралгия, уморяемост и гадене), като по-голямата част от тях са от степен 1 или 2. Свързаната с лечението миелосупресия, най-вече от степен 3 или 4 е честа, но рядко присъства и към датата на изходната визита, в частност при пациенти в напреднал стадий на заболяването [10].

В проучването PACE участват 65 пациенти с ХМЛ-ФА и резистентност или нетолерантност към dasatinib или nilotinib, 18 с ХМЛ-ФА и мутация T315I, 48 с ХМЛ-БК или Ph-позитивна ОЛЛ и резистентност или нетолериращи dasatinib или nilotinib и 46 с ХМЛ-БК или Ph-позитивна ОЛЛ и мутация T315I. Ponatinib се прилага при първоначална доза от 45 mg веднъж дневно. Средно-

то проследяване е 15 месеца. Сред пациентите с ХМЛ-ФА, 55% постигат MaHR в рамките на 6 месеца (първична крайна цел). MCyR се наблюдава при 39%, 24% постигат CCyR, а 16% MMR. Времето до постигане на MaHR е средно 3 седмици (диапазон, 2 до 25), а устойчивостта на отговора варира от 1 месец до 21 месеца или повече (средно 12 месеца); прогнозният процент на запазилите отговор в продължение на поне 12 месеца е 48%. Средното време за постигане на MCyR е 3.7 месеца (диапазон, 0.8 до 9.7), а прогнозният процент на запазилите отговор в продължение на поне 12 месеца е 73%. Прогнозният процент за PFS е 55% след 12 месеца (средно 18 месеца), а процентът на OS – 84% след 12 месеца. Както при пациентите с ХМЛ-ХФ, така и при пациентите с ХМЛ-ФА приемали по-малко на брой предходни ТКИ, се наблюдават по-високи проценти

на отговор. Високи проценти на отговор се наблюдават сред пациентите с BCR-ABL1 мутации, включително тези с мутация T315I, и тези без BCR-ABL1 мутации. Сред пациентите с ХМЛ-БК, 31% постигат MaHR в рамките на 6 месеца (първична крайна цел), 23% – MCyR, а 18% – CCyR. Средното време до MaHR при пациенти с ХМЛ-БК е 4.1 седмици (диапазон, 1.7 до 16.1), устойчивостта варира от 1 месец до 20 месеца или повече (средно – 5 месеца), а прогнозният процент на запазилите отговор в продължение на поне 12 месеца е 42%. Средното време до MCyR при пациентите с ХМЛ-БК е 1.9 месеца (диапазон, 0.9 до 5.5), а прогнозният процент на запазилите отговор в продължение на поне 12 месеца е 66%. Сред пациентите с Ph+ ОЛЛ, 41% (95% CI, 24 до 59) постигат MaHR, 47% – MCyR, а 38% – CCyR. Средното време до MaHR при пациенти с Ph+ ОЛЛ е 2.9 седмици (диапазон, 1.6 до 24), устойчивостта е от 2 до 14 месеца или повече (средно 3 месеца), а прогнозният процент на запазилите отговор в продължение на поне 12 месеца е 8%. Средното време до MCyR при пациенти с Ph+ ОЛЛ е 1 месец (диапазон, 0.9 до 3.7), средната устойчивост е 3.7 месеца и прогнозният процент на запазилите отговор в продължение на поне 12 месеца е 32% [18]. В данните от четиригодишното проследяване от изследването PACE, средната обща преживяемост за ХМЛ-БК и Ph+ ОЛЛ е 6.9 месеца [13].

Въз основа на данните от проучването PACE, нито една единична мутация в областта на BCR-ABL1 киназата не е свързана с резистентност към ponatinib. В някои случаи обаче, при пациенти с неподдържан MaHR, се наблюдават случаи на комплексни мутации (> 2 мутации в един и същи алел на ген BCR-ABL1). Предишни проучвания показват, че определени комплексни мутации могат да предизвикат резистентност към ponatinib, но за тези мутации е установено, че са редки при пациенти с ХМЛ-ХФ [19]. Pritchard и колеги използват стратегия за многослойно секвениране с комбиниране на Sanger секвениране (Sanger

Sequencing, DS) за профилиране на мутационните механизми, които може да са отговорни за неблагоприятните резултати свързани с преживяемостта, наблюдавани при пациенти с ХМЛ-БК/Ph+ ОЛЛ в проучването PACE. Броят мутации BCR-ABL1 при пациентите с ХМЛ-БК/Ph+ ОЛЛ, първоначално установени със SS, не дава възможност за надеждно предвиждане на резистентността към ponatinib у рефрактерни пациенти с вероятностни коефициенти (odds ratio, OR) 1.0 (0.2-4.9 95% CI) за MaHR и 2.4 (0.5-12.5 95% CI) за MСyR. По-голяма част от пациентите с ХМЛ-БК/Ph+ ОЛЛ, обаче, 30/61, получават мутации в BCR-ABL1 в края на лечението, спрямо 19/130 пациенти с ХМЛ-ХФ (OR 7.7 [1.5-53.3 95% CI]). Почти всички пациенти с ХМЛ-БК/Ph+ ОЛЛ, но не и с ХМЛ-ХФ получили мутации, имат BCR-ABL1 мутации, първоначално установени със SS: 27/30 спрямо 10/19 пациенти с ХМЛ-ХФ (OR 5.6 [2.7-12.1 95% CI]). Поне 19/27 пациенти с ХМЛ-БК/Ph+ ОЛЛ имат комплексни мутации в края на лечението, включително 2-ма пациента с 3 мутации в един и същи алел. Тъй като наличието на съществуващи от по-рано мутации от предходна терапия с ТКИ е

свързано с получаване на допълнителни мутации при лечение с ponatinib, използвано е свръхчувствително двойно секвениране (ultra-sensitive DS), за да се установи дали тези резистентни мутации биха могли да бъдат установени първоначално. При проверени 3/18 пациенти, резистентната мутация се установява директно в началото на проучването в много малка част от клетките. Чрез методи на по-точно математическо моделиране се демонстрира, че повечето, ако не и всички резистентни мутации в BCR-ABL1 при пациенти с ХМЛ-БК/Ph+ ОЛЛ, които се наблюдават по време на лечение с ponatinib, съществуват и от по-рано [20].

Комбинацията от химиотерапия и ТКИ е стандарта за лечение при Ph+ ОЛЛ. Ефикасността и безопасността на комбинирането на химиотерапия с ponatinib при пациенти с Ph+ ОЛЛ е оценена в проспективно проучване от фаза 2. Възрастни пациенти с новодиагностицирана Ph+ ОЛЛ и добри показатели приемат 8 цикъла хипер-CVAD, редуващи се с висока доза methotrexate/ cytarabine на всеки 21 дни. Ponatinib се прилага по 45 mg дневно в продължение на първите 14 дни от цикъл 1, а след това непрекъснато в продължение на последващите. Пациентите с пълна ремисия (complete remission, CR) приемат поддържаща доза ponatinib 45 mg дневно заедно с vincristine/ prednisone веднъж месечно в продължение на 2 години, а след това ponatinib за неограничен период от време. Третираны са 37 пациента в средна възраст 51 години. Общите стойности на CCyR, MMR и пълен молекулярен отговор (CMR) са съответно 32/32 (100%), 35/37 (95%), и 29/37 (78%). Чрез многопараметрова флоу цитометрия, при 35 пациента (97%) не се констатира наличие на установимо минимално остатъчно заболяване след

средно 3 седмична терапия (Табл. II). Токсичност от степен > 3 включва инфекции по време на въвеждащото лечение (20 пациенти), увеличени чернодробни функционални параметри (14 пациента), тромботични събития (3 пациента), инфаркт на миокарда (3 пациента), повишено артериално налягане (6 пациента), кожен обрив (8 пациента) и панкреатит (6 пациенти). Два смъртни случая се констатират като потенциално свързани с инфаркт на миокарда. Девет пациента са подложени на алогенна трансплантация на стволови клетки (allogenic stem cell transplantation, ASTC). При средно проследяване 26 месеца (диапазон, 15-39 месеца), 29 (78%) пациента са в пълна ремисия, а 9 пациента (24%) приемат ASTC при прогнозна стойност на 2-годишна преживяемост 80% (95% CI, 63%-90%), ниво на устойчивост на пълната ремисия 97% (95% CI, 80%- 99.6%) и PFS – 81% (95% CI, 64%-90%) [21].

**Таблица II**

**Най-добър общ отговор при комбинация на хипер-CVAD с Ponatinib при първа линия терапия на пациенти с Ph+ ALL [21].**

Параметър	N (%)
пълна ремисия (complete remission, CR) <sup>1</sup>	36/36 (100)
CCyR <sup>2</sup>	32/32 (100)
MMR	35/37 (95)
CMR	29/37 (78)
Флоу негативизиране <sup>3</sup>	35/36 (97)
Ранна смърт	0 (0)

\* 1 пациент с CR при стартиране

\*\* 5 пациента са диплоидни след конвенционална цитогенетика при стартиране

\*\*\* за 1 пациент не е изпратена проба за флоу цитометрия

Клиничната ефикасност на хипер-CVAD плюс ponatinib не е сравнявана с тази на хипер-CVAD плюс dasatinib в рандомизирано клинично проучване. Sasaki и колеги обаче, анализират 110 пациенти с новодиагностицирана Ph+ ОЛЛ, участващи в 2 последователни проспективни клинични проучвания от фаза 2 на лечение с хипер -CVAD с dasatinib (63 пациента) или с ponatinib (47 пациента). Анализ по метода на сравняване на оценките за предразположение /Propensity score matching, PSM/ с 1:1 оценка на съответствието с най-близкия „двойник“ и измерване на обратнопропорционалната вероятностна лечебна стойност (inverse probability of treatment weighting, IPTW) базирана на PSM, са извършени за оценка на нивата на отговор, PFS и OS между отделните групи. Методът на „двойниците“ идентифицира 41 пациенти във всяка кохорта. По метода на двойниците 3-годишните стойности за PFS за пациенти лекувани с хипер-CVAD плюс ponatinib и хипер-CVAD плюс dasatinib, са съответ-

но 69% и 46% ( $P=0.04$ ), а 3-годишните стойности за OS са съответно 83% и 56% ( $P=0.03$ ). IPTW анализа, използвайки установените съответстващи си кохорти показва, че при пациентите третирани с хипер-CVAD плюс ponatinib се наблюдават значително по-високи стойности за отсъствие на минимално остатъчно заболяване (minimal residual disease, MRD) чрез флоу цитометрия на ден 21, CCyR при пълен отговор, MMR при пълен отговор и след 3 месеца и пълен молекулярен отговор след 3 месеца. IPTW потвърждава, че лечението с хипер-CVAD плюс ponatinib е свързано с по-продължителна PFS ( $P=0.003$ ) и OS ( $P=0.001$ ) в сравнение с лечението с хипер-CVAD плюс dasatinib. От 27-те смъртни случая, отчетени в цялата група, не се наблюдават съществени разлики по отношение на причината за смъртта между 2-те групи ( $P=0.209$ ) [22].

Филадельфийската хромозома е най-честата цитогенна аномалия при пациентите с ОЛЛ в напреднала възраст (на възраст > 60) [23]. След въвеждането на ТКИ, са разработени два подхода за тази пациентска популация: възрастово-адаптирана химиотерапия плюс ТКИ или самостоятелно ТКИ плюс стероиди. Последният подход се е доказал като ефективен и безопасен [24, 25]. По настоящем Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIMEMA) извършва проучване от фаза 2, което оценява терапевтичния ефект на ponatinib плюс стероиди, като първа линия терапия при пациенти с Ph+ ОЛЛ на възраст > 60 години, или противопоказани за химиотерапия и трансплантация на стволови клетки (NCT01641107). Първичната крайна цел на изследването е процентът на пациентите, които са в MaHR след 6 месеца. Предварителните резултати, представени по време на Втория експертен семинар по ХМЛ и Ph+ ОЛЛ изглеждат доста окуражителни [26].

## ОБСЪЖДАНЕ

Imatinib осигурява изключително подобрена прогноза за пациентите с ХМЛ-ХФ. Dasatinib и nilotinib използвани като първа линия терапия, допълнително подобряват степента, дълбочината и времето до отговор. ТКИ от втора генерация обаче, не водят до подобряване на OS или PFS в сравнение с пациентите, третирани с imatinib. Освен това, значителна група от резистентните към imatinib пациенти не реагират и на ТКИ от втора генерация, или при наличие на отговор, той не е устойчив [27,28]. Поради тази причина, въпреки значителното подобрение в резултатите за повечето пациенти, са нужни допълнителни възможности за лечение не само за предотвратяване на резистентността към ТКИ и BCR-ABL1 мутациите, но и за индуциране на по-дълбок и устойчив отговор в ранна фаза при всички пациенти. Ponatinib е трета генерация ТКИ, който предотвратява появата на резистентни мутации в предклинични

проучвания и демонстрира значителни клинични ползи за пациентите с рефрактерна ХМЛ (всички фази) и Ph+ ОЛЛ. Тъй като наличието на варианти на атипични BCR-ABL1 транскрипти налага екзактни процедури за наблюдение, тези пациенти не са включвани в клинични проучвания [29]. Настоящите препоръки на Европейската мрежа за левкемия (European LeukemiaNet) предлагат терапия с ponatinib като опция при пациенти с ХМЛ-ХФ като 2-ра или последваща терапевтична линия, в случай че лечението от първа линия е неуспешно и всяка линия на лечение при наличие на мутация T315I. Лекарственото средство се препоръчва и при пациенти, претретирани с ТКИ с ХМЛ-ФА или -БК, прогресирали от ХФ, ако медикаментът не е използван по-рано и винаги в случай на мутация T315I [30]. Резултатите от две изследвания за оценяване на ефикасността на ponatinib при пациенти с ХМЛ-ХФ като първа линия терапия предполагат, че ponatinib е ефикасен и в тази популация. И двете проучвания обаче, са прекратени предсрочно, по препоръка на FDA поради притеснения от повишен риск от тромбоемболия, свързан с ponatinib. АОС са наблюдавани при всички ТКИ. При мета-анализ на всички рандомизирани контролирани проучвания сравняващи imatinib с dasatinib, nilotinib, ponatinib или bosutinib, рискът от съдови оклузивни събития е увеличен при всички инхибитори, с изключение на bosutinib [31]. По време на Втория експертен семинар по ХМЛ и Ph+ ОЛЛ в Будапеща експертите подчертаха факта, че последователното редуване на ТКИ при пациенти с ХМЛ и Ph+ОЛЛ може да селектира комплексни, резистентни към лечение BCR-ABL1 мутации. Освен това, резултатите от двата последващи post-hoc анализа на пациентите, участвали в проучването PACE, показват по-добри показатели на цитогенетичния и молекулярния отговор, при по-малък брой предходни ТКИ използвани преди ponatinib; освен това, честотата на НЛС от степен > 3 изглежда се увеличава заедно с броя предходни ТКИ [14,32]. Поради тази причина, експертите от втория Експертен семинар по ХМЛ и Ph+ ОЛЛ, считат за удачно да се разгледа идеята за по-ранно включване на ponatinib при терапия на ХМЛ и Ph+ ОЛЛ. Препоръчителната доза ponatinib при пациенти с ХМЛ и Ph+ ОЛЛ е 45 mg/d, с обсъждане на по-ниски начални дози при пациенти със селектирани коморбидности. Няма данни обаче, които да показват че 15 mg/d биха били достатъчни за потискане на възникването на клинично значими единични резистентни мутации [33]. Друго проучване показва, че плътността на дозата е в пряка пропорционалност с честотата на НЛС, като всяко намаление от 15 mg дневно се счита, че намалява риска от АОС с около 40% [34]. Поради тази причина, намаляването на дозата до 15 mg дневно следва да се разглежда като възможност при пациенти с ХМЛ-ХФ, които са постигнали МСyR, на базата на оценката на рисковите фактори за всеки отделен пациент. [11] Две продължаващи в момента

проучвания изследват ефекта от 30 mg/d и 15 mg/d начална доза при пациенти с ХМЛ-ХФ като втора или последваща линия терапия (NCT02467270 и NCT02627677). Като обобщение, ponatinib е мощен и ценен медикамент за лечение на пациенти с ХМЛ и Ph+ ОЛЛ, резистентни или с непоносимост към други ТКИ и такива с мутация Т315I. Независимо от това, ползите от лекарственото средство трябва да превишават риска от развитие на АОС. Поради тази причина ponatinib не се препоръчва, като първа линия терапия при пациенти с ХМЛ-ХФ без установена мутация Т315I. Актуалните данни показват, че ponatinib може да осигури значително по-добри показатели на цитогенетичен и молекулярен отговор при използване като трета линия терапия в сравнение с ТКИ от втора генерация. Все още обаче, предстои установяване на оптималното му място сред наличните ТКИ.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A. et al: International randomized study of interferon Vs ST1571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood* 2009; 114: 1126.
2. Cortes JE, Kantarjian HM, Brummendorf TH, Kim DW, Turkina AG. et al: Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011; 118: 4567-4576.
3. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, Rea D, Dorland Llacer PE. et al: Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 3204-3212.
4. Shah NP, Cortes JE, Schiffer CA, Le Coutre P, Bahceci E. et al: Four-year follow-up of patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia (CP-CML) receiving 100 mg of dasatinib once daily. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 6512.
5. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G. et al: Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007; 110: 3540-3546.
6. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, Pinilla-Ibarz J, Larson RA. et al: Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood* 2011; 117: 1141-1145.
7. Fielding AK, Rowe JM, Buck G, Foroni L, Gerard G. et al: UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2014; 123: 843-850.
8. Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Faderl S, Jones D. et al: First report of phase II study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome-positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010; 116: 2070-2077.
9. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM. et al: AP24534, a pan-BCRABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell.* 2009; 16: 401-412.
10. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ. et al: Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2075-2088.
11. Iclusig. Summary of product characteristics 2017: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002695/WC500145646.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002695/WC500145646.pdf) Accessed 22 March 2017
12. Mauro MJ, Cortes JE, Kantarjian HM, Shah NP, Bixby DL. et al: Ponatinib in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients: final report from a phase 1 trial. *Blood* 2016; 128: 3063.
13. Cortes JE, Pinilla-Ibarz J, Le Coutre PD, Paquette R, Chuah C. et al: 4-year results of the ponatinib phase II PACE trial in patients (pts) with heavily pretreated leukemia. *J Clin Oncol.* 2016; 34: 7013.
14. Hochhaus A, Cortes JE, Kim D-W, Pinilla-Ibarz J, Le Coutre PD. et al: Efficacy and safety of ponatinib in CP-CML patients by number of prior tyrosine kinase inhibitors: 4-year follow-up of the phase 2 PACE trial. *Blood* 2015; 126: 4025.
15. Jabbour EJ, Cortes JE, Talpaz M, Baccarani M, Mauro MJ. et al: Long-term follow-up of the efficacy and safety of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemia patients with the T315I mutation. *Blood* 2016; 128: 3067.
16. Lipton JH, Chuah C, Guerci-Bresler A, Rosti G, Simpson D. et al: Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 612-621.
17. Jain P, Kantarjian H, Jabbour E, Gonzalez GN, Borthakur G. et al: Ponatinib as first-line treatment for patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase: a phase 2 study. *Lancet Haematol.* 2015; 2: 376-383.
18. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, Le Coutre PD, Paquette R. et al: A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2013; 369: 1783-1796.
19. Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, Vellore NA, Estrada J. et al: BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell.* 2014; 26: 428-442.
20. Pritchard JR, Schmitt MW, Hodgson JG, Lustgarten S, Tang S. et al: Analysis of the sub-clonal origins of compound mutations in patients with refractory Ph+ malignancies treated with ponatinib. *Blood* 2016; 128: 1061.
21. Jabbour E, Kantarjian H, Ravandi F, Thomas D, Huang X. et al: Combination of hyper-CVAD with ponatinib as first-line therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 1547-1555.
22. Sasaki K, Jabbour E, Ravandi F, Short NJ, Thomas DA. et al: Hyper-CVAD plus ponatinib versus hyper-CVAD plus dasatinib as frontline therapy for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a propensity score analysis. *Cancer* 2016; 122: 3650-3656.
23. Burmeister T, Schwartz S, Bartram CR, Gokbuget N, Hoelzer D, Thiel E: GMALL study group. Patients' age and BCR-ABL frequency in adult B-precursor ALL: a retrospective analysis from the GMALL study group. *Blood* 2008; 112: 918-919.
24. Vignetti M, Fazi P, Cimino G, Martinelli G, Di Raimondo F. et al: Imatinib plus steroids induces complete remissions and prolonged survival in elderly Philadelphia chromosome-positive patients with acute lymphoblastic leukemia without additional chemotherapy: results of the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto (GIME-MA) LAL0201-B protocol. *Blood* 2007; 109: 3676-3678.
25. Foa R, Vitale A, Vignetti M, Meloni G, Guarini A. et al: Dasatinib as first-line treatment for adult patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 118: 6521-6528.
26. Giovanni Martinelli, personal communication, November 24, 2016.
27. Shah NP, Guilhot F, Cortes JE, Schiffer CA, Le Coutre P. et al: Long-term outcome with dasatinib after imatinib failure in chronic-phase chronic myeloid leukemia: follow-up of a phase 3 study. *Blood* 2014; 123: 2317-2324.
28. Giles FJ, Le Coutre PD, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N. et al: Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study. *Leukemia* 2013; 27: 107-112.
29. Link-Lenczowska D, Sacha T, Zawada M, Czekalska S, Florek I. et al: Nietypowe odmiiany transkryptu BCR-ABL u chorych na przewlektq biaczkowski szpikowq - schemat postpowania diagnostycznego w monitorowaniu minimalnej choroby resztkowej. *Przegl Lek.* 2014; 71: 258-262.
30. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S. et al: European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122: 872-884.
31. Douxfils J, Haguet H, Chatelain CJ, Grux C, Dogne J-M: BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia: a systematic review and

*meta-analysis on the risk of cardiovascular events, major molecular response and overall survival. Blood 2015; 126: 2785.*

32. Levy MY, McGarry LJ, Lustgarten S, Yang M, Haluska FG: Relationship of line of therapy to efficacy for ponatinib in 3rd-line versus 4th-line chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* 2015; 126: 1588.
33. Gozgit JM, Schrock A, Chen T-H, Clackson T, Rivera VM: Comprehensive analysis of the in vi-tro potency of ponatinib, and all other approved BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors (TKIs), against a panel of single and compound BCR-ABL mu-tants. *Blood* 2013; 122: 3992.
34. Hochhaus A, Pinilla-Ibarz J, Kim D-W, Le Coutre PD, Paquette R. et al: Clinical impact of dose modification and dose intensity on response to ponatinib in patients with Philadelphia chromosome-positive leukemias. *J Clin Oncol.* 2014; 32: 7084.

**Адрес за кореспонденция**

Joanna Wąclaw

Katedra Hematologii UJCM 31-501

Kraków, ul Kopernika 17

тел: 12 424 76 00

факс: 12 424 74 26

e-mail: joanna.waclaw89@gmail.com

**Correspondence address:**

Joanna Wąclaw

Katedra Hematologii UJCM 31-501

Kraków, ul Kopernika 17

tel: 12 424 76 00

fax: 12 424 74 26

e-mail: joanna.waclaw89@gmail.com

# ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ И БРЕМЕННОСТ

*Камелия Милчева, Бранимир Спасов*

*Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания – София*

## THROMBOCYTOPENIA AND PREGNANCY

*Kameliy Milcheva, Branimir Spasov*

*National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases- Sofia*

**Резюме.** Тромбоцитопения по време на бременност се наблюдава при 6 – 15 % от бременните жени. Най – честата причина за тромбоцитопения при бременни е гестационната тромбоцитопения – 70-80% от случаите, около 20 % от случаите са свързани със специфична за бременността патология – прееклампсия, а едва 3-4 % от случаите се дължат на автоимунен процес. В повечето случаи тромбоцитопенията е лека до умерена и не се свързва със значима заболеваемост за майката, плода или новороденото. В някои случаи тромбоцитопенията е част от комплексни клинични синдроми, които могат да доведат до сериозни, животозастрашаващи усложнения, както за плода, така и за майката. Основна задача на лекаря е да определи патофизиологията на тромбоцитопенията, риска, който представлява за майката и плода и целите на лечението, които се променят динамично в хода на бременността и по-специално по време на раждането.

**Ключови думи.** тромбоцитопения, бременност, гестационна тромбоцитопения, имунна тромбоцитопения, неонатален риск, тромботични микроангиопатии

**Abstract.** Thrombocytopenia during pregnancy affects 6-15% of pregnant women. The most common cause of thrombocytopenia in pregnant women is gestational thrombocytopenia – 70-80% of cases, about 20% of cases are associated with pregnancy-specific pathology – pre-eclampsia, and only 3-4% of cases are due to an autoimmune process. In most cases, thrombocytopenia is mild to moderate and is not associated with significant morbidity for the mother, the fetus or the newborn. In some cases, thrombocytopenia is part of complex clinical syndromes that can lead to serious, life-threatening complications for both the fetus and the mother. The clinician's task is to determine the pathophysiologic nature of the thrombocytopenia, the risk it poses to both mother and fetus, and the treatment goals, that change with the dynamic state of parturition and during delivery.

**Key word.** thrombocytopenia, pregnancy, gestational thrombocytopenia, immune thrombocytopenia, neonatal risk, thrombotic microangiopathies

### ВЪВЕДЕНИЕ

Тромбоцитопенията, дефинирана като тромбоцитен брой (PLT) < 150 × 10<sup>9</sup>/L, е втората по честота хематологична патология на бременността след анемията. Честотата на тромбоцитопения при бременни, определена като < 100 × 10<sup>9</sup>/L, съгласно International Working Group, е едва 1 %. В хода на нормално протичаща бременността се наблюдава физиологично понижаване на PLT с около 10 % от обичайните стойности преди забременяване.

В повечето случаи тромбоцитопенията е лека до умерена и не се свързва със значима заболеваемост за майката, плода или новороденото. В някои случаи тромбоцитопенията е част от комплексни клинични синдроми, които могат да доведат до сериозни, животозастрашаващи усложнения, както за плода, така и за майката. Тяхното ранно ди-

агностициране и лечение изискват мултидисциплинарен подход и комплексна медицинска грижа.

### ЕТИОЛОГИЯ

Причините за тромбоцитопения могат да бъдат свързани с бременността или независими от нея. В табл. 1 са представени най-честите причини и относителна честота на тромбоцитопения по време на бременността.

Гестационна тромбоцитопения -70% -80% от случаите на инцидентно появяла се в хода на бременността тромбоцитопения, при липса на анамнеза за тромбоцитопения (освен при предишна бременност), с неясна патогенеза, включваща различни механизми, като хемодилуция и ускорен клирънс. Обичайно се извява в средата на второ до третото тримесечие като лека до умерена тромбоцитопения (130-150 × G/L). Счита се, че ди-

агнозата гестационната тромбоцитопения е малко вероятна, ако броят на тромбоцитите е  $< 50 \times G/L$ , изключително рядко са случаите на гестационна тромбоцитопения със стойности на PLT под  $40-50 \times 10^9/L$ , при стойности  $< 80 \times G/L$  е необходимо изключването на алтернативна етиология. Тромбоцитният брой се възстановява спонтанно в рамките на 1-2 месеца след раждането и не се наблюдава тромбоцитопения на плода/новороденото.

Първична имунна тромбоцитопения (ITP) е втората по честота,  $\sim 3\%$ , причина за изолиран нисък брой на тромбоцити при бременност, понякога трудно различима от гестационна тромбоцитопения, особено в случаите на отсъстваща анамнеза за ITP. По правило пациентките са с тромбоцити  $< 100 \times G/L$  още в началото на бременността и броят им спада с напредването и. Не е изключено ITP да се развие и през третия триместър.

Рядка наследствена причина за тромбоцитопения е болестта на Вилбленд тип IIb (VWD). Жените с това състояние могат да развият тромбоцитопения за първи път по време на бременност и да бъдат погрешно диагностицирани с ITP. Броят на тромбоцитите към термин може да спадне до нива от порядъка на  $10-20 \times G/L$ , обикновено с най-ниска стойност 1-3 дни преди раждането, но бързо се повишават след раждането. Болест на Вилбленд тип IIb (VWD) трябва да се включи в диференциалната диагноза на тромбоцитопения по време на бременност, особено при жени с лична или фамилна анамнеза за необичайно кървене или ако терапията за ITP е неефективна.

**Таблица 1. Причини и относителна честота на тромбоцитопения при бременност**

#### СПЕЦИФИЧНИ ЗА БРЕМЕННОСТТА

##### Изолирана тромбоцитопения

Гестационна тромбоцитопения (70%-80%)

##### Тромбоцитопения, асоциирана със системни заболявания

Преeklampсия (15%-20%)

HELLP синдром ( $< 1\%$ )

AFLP ( $< 1\%$ )

#### НЕСПЕЦИФИЧНИ ЗА БРЕМЕННОСТТА

##### Изолирана тромбоцитопения

Първична имунна тромбоцитопения – ITP (1%-4%)

Вторична ITP ( $< 1\%$ )

Медикаментозно предизвикана тромбоцитопения ( $< 1\%$ )

Тип IIb VWD ( $< 1\%$ )

Вродена ( $< 1\%$ )

##### Тромбоцитопения, асоциирана със системни заболявания

TTP/HUS ( $< 1\%$ )

Лупус SLE ( $< 1\%$ )

Антифосфолипиден синдром ( $< 1\%$ )

Вирусни инфекции ( $< 1\%$ )

Костномозъчно заболяване ( $< 1\%$ )

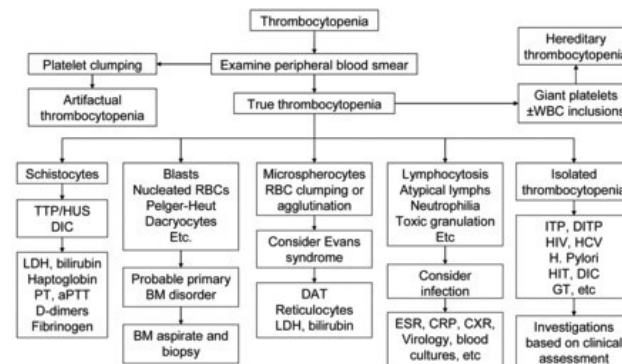
Хранителен дефицит ( $< 1\%$ )

Спленална секвестрация

## ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ

Включва широк панел от изследвания – ПКК с ДКК, коагулационен статус (PT, APTT, INR, фибриноген, D-димери), оценка на чернодробната функция (билирубин, албумин, общ протеин, трансферази и алкална фосфатаза) и функционалния статус на щитовидната жлеза. Антифосфолипидни антитела и lupus антикоагулант и серология за системен лупус еритематозус (SLE) се извършват, ако лабораторните данни, историята и физикалният статус предполагат вторична тромбоцитопения. Препоръчителните тестове включват вирусологичен скрининг (HIV, HCV, HBV) и тест за носителство на *Helicobacter pylori*, както и серумни имуноглобулини при минала анамнеза за рецидивиращи инфекции. Таблица 2.

**Таблица 2. Диагностичен алгоритъм за оценка на бременна с изолирана тромбоцитопения**



Изключително рядко се налага извършване на костномозъчна аспирация/биопсия за оценка на бременна тромбоцитопенична пациентка и не се изисква задиагностата ITP. Както при небременния пациент, тестването за антиромбоцитни антитела няма никаква стойност при диагностицирането на ITP по време на бременност, то не е нито чувствително, нито специфично, нито пък предсказва неонаталната тромбоцитопения.

## МОНИТОРИРАНЕ

Няма установен алгоритъм. Честота на проследяване на пациентка с тромбоцитопения е базирано на клиничното протичане на бременността.

При сигурна гестационна тромбоцитопения проследяването съвпада с изследването на ПКК в рамките на рутинната „Женска консултация“. Задължително е ПКК да бъде повторена 1-3 месеца след раждането, за да се потвърди спонтанното възстановяване на тромбоцитния брой.

В случаите на ITP или при несигурна диагноза, броят на тромбоцитите се проверява на всеки 2-4 седмици. При тромбоцити  $< 80 \times G/L$  след 34 гестационна седмица, се наблюдават ежеседмично.

## ИНДИКАЦИИ ЗА ЛЕЧЕНИЕ НА ИТР ПО ВРЕМЕ НА БРЕМЕННОСТ

### Maternity Guidelines – Thrombocytopenia in Pregnancy (GL927) October 2017

- Осигуряване достатъчен брой PLT на майката:
  - първи два триместъра – лечение само при хеморагична диатеза или –  $PLT \leq 20-30 \text{ G/L}$ .
  - последен триместър – хеморагична диатеза или  $PLT < 50 \text{ G/L}$ .
- Минимални безопасни нива за анестезия/аналгезия и операция: –  $\geq 80 \text{ G/L}$  за спинална/епидурална; –  $\geq 50 \text{ G/L}$  за Цезарово сечение.

## ЛЕЧЕНИЕ НА ИТР ПО ВРЕМЕ НА БРЕМЕННОСТ

Целта на лечението е постигане на адекватен контрол на заболяването, което изисква тясна колаборация между акушер ↔ хематолог ↔ анестезиолог ↔ неонатолог. Терапевтични възможности при бременни жени с ИТР са представени в Таблица 3.

Първа линия на терапия включва кортикостероиди (КС) и високи дози интравенозен имуноглобулин (IVIg). Обикновено се започва с перорален преднизон или преднизолон в ниска доза (10 mg дневно). Дозите се коригират, за да се поддържа безопасен PLT брой ( $> 30 \times \text{G/L}$ ), но никога не надхвърля 30 mg/ден, с постепенно намаляване на дозата след раждане. Въпреки че е сравнително безопасен по време на бременност, преднизонът може да доведе до наддаването на тегло, да предизвика хипергликемия, да влоши хипертонията и да допринесе за неблагоприятното протичане на бременността. Антенаталното приложение на стероид не повишава неонаталния тромбоцитен брой и не трябва да бъде прилаган с тази цел. При субоптимален отговор към КС лош толеранс или необходимост от бързо покачване на PLT, може да бъдат приложени IVIg (1 g/kg в единична или 2 дози), самостоятелно или в комбинация с ниски дози преднизон, за да се поддържа безопасен PLT брой. Не се препоръчва приложението на анти-RhДимуноглобулин като първа линия терапия, поради риска от остра хемолитична анемия.

Неуспех от първа линия терапия, налага преминаване към медикаменти от втора линия, включващи азатиоприн, висока доза метилпреднизолон (HDMP 1000 mg) в комбинация с IVIg или азатиоприн. Циклоспорин А не се свързва със значима токсичност за майката или фетуса по време на бременност, когато се използва при лечение на възпалителни чревни заболявания, но липсват публикувани данни за употребата му при ИТР по време на бременност и трябва да се има предвид само когато други безопасни лекарства от втора линия са неефективни.

Спленектомията остава подход на избор при терапевтично рефрактерни бременни. Най-безопасно е да бъде извършена през втория триместър, лапароскопски. Трансплацентното преминаване

на циркулиращи антитела срещу тромбоцитите в кръвта и риска от неонатална тромбоцитопения не се повлияват от спленектомия.

Голяма част от медикаментите, използвани при пациенти с ИТР, не са безопасни по време на бременност. Има ограничени данни за приложението на ритуксимаб по време на бременност, но той не може да бъде препоръчан, поради възможността му да преминава през плацентата. Краткосрочната терапия с даназол в комбинация с високи дози IVIg и кортикостероиди е използвана при рефрактерна тромбоцитопения през последното тримесечие. Въпреки това, употребата му трябва да се избягва, е установено, че даназол причинява вродени аномалии при плози е определен за категория X от FDA. Винка алкалоидите и циклофосфамид не се считат за безопасни по време на бременност. Няма публикувани данни за употребата на агонисти на рецептора на тромбопоетин при бременност, техните ефекти върху плода са неизвестни и не могат да бъдат препоръчани.

Таблица 3. Терапевтични опции при лечение на ИТР и бременност

Първа линия	Кортикостероиди и IVIg
Втора линия	Комбинирана терапия кортикостероид и IVIg
	Спленектомия
Други терапевтични опции	
Относително противопоказни	Анти- Димуноглобулин {C}
	Азатиоприн {D}
Не се препоръчват	Циклоспорин А {D}
	Дапсон {C}
	Тромбопоетинов рецепторен агонист {C}
	Сампатх {C}
	Ритуксимаб {C}
Противопоказни	Микофенолатмофетил {C}
	Циклофосфамид {D}
	Винка алкалоид {D}
	Даназол {X}

## НЕОНАТАЛЕН РИСК И ИТР. МОНИТОРИРАНЕ И ПОВЕДЕНИЕ

Около 10 % от новородените на майки с ИТР са с  $PLT < 50 \text{ G/L}$ , едва около 5 % със стойности под  $20 \text{ G/L}$ . Честотата на интракраниална хеморагия е 0%-1.5%. Най-добрият предиктор за тежестта на тромбоцитопенията при раждане е анамнезата за интракраниална хеморагия при предшестващо раждане на брат/сестра. От една страна добрият отговор към терапията на майка с ИТР не протек-

тира автоматично новороденото от развитие на тромбоцитопения, от друга страна няма сигурни доказателства, че новороденото на майка с тежка тромбоцитопения, рефрактерна на лечение, има по-висок риск да бъде с по-тежка тромбоцитопения.

Броят на тромбоцитите на новороденото се проверява непосредствено след раждането му, с изследване на кръв от пълна връв или периферен съд, но не и от пета. При нормални стойности на PLT, изследването не се повтаря, но в рамките на седмица новороденото се проследява за прояви на хеморагична диатеза. Новородените с тромбоцитопения се мониторираат ежедневно, очакваният надир на PLT е 2-5 дни след раждане. Спонтанно възстановяване на PLT се наблюдава след около седмица, но може и в рамките на няколко седмици – месеци. При стойности на PLT < 50 G/L, дори при липса на клинични признаци за кървене, се провежда краниална УЗД. Установяването на интракраниална хеморагия изисква незабавно лечение – трансфузия на тромбоцити + IVIg 1g/kg за 2 дни. IVIg може да бъде прилагана през няколко седмици, при необходимост за поддържане на безопасен PLT брой или до спонтанното им възстановяване.

### **ТРОМБОТИЧНИ МИКРОАНГИОПАТИИ ПРИ БРЕМЕННОСТ**

Преeklampсия, HELLP синдром (хемолиза, повишени чернодробни ензими и ниски тромбоцити) и остър мастен черен дроб на бременността (AFLP) имат припокриващи се клинични и лабораторни характеристики на тромботична микроангиопатия, които не са специфични за бременността и могат да бъдат значително диагностично предизвикателство.

Преeklampсията е втората най-честа причина за развитие на тромбоцитопения в края на втория или третия триместър, което представлява 21% от случаите на тромбоцитопения по време на раждането. Дефинира се като новопоявила се хипертония с  $\geq 140$  mmHg систола или  $\geq 90$  mmHg диастола след 20-та г.с. в комбинация с протеинурия (около 0,3 g белтък в 24-часова проба). При някои жени признаците на преeklampсия могат да се появят до 4-6 седмици след раждането. Тромбоцитопенията може да бъде единствената първоначална проява на преeklampсия. Броят на тромбоцитите < 50 × G/L се среща при < 5% от преeklampсните жени. Интраваскуларна хемолиза, получена от фрагментацията на червените клетки, може да придружава тежка преeklampсия, но обикновено не е значима особеност. Аномалии на коагулацията са малко вероятни, ако броят е > 100 × G/L. Трансаминазите и нивата на LDH могат да бъдат повишени, макар и по-малко, отколкото се наблюдават при HELLP синдрома.

Диагнозата eklampсия се поставя с появата на гърчове, несвързани с предшествващи неврологични състояния, при бременна с преeklampсия.

Синдромът HELLP засяга 10% -20% от жените с тежка преeklampсия. Критериите за диагностициране на HELLP синдрома са публикувани от Sibai и включват хемолиза (абнормна периферна, LDH > 600 U/L или билирубин > 1.2 mg/dL), аспартатаминотрансфераза > 70 U/L и брой на тромбоцитите < 100 × G/L. Критериите на Martinetal са по-малко строги и включват LDH > 600 U/L, аспартатаминотрансфераза > 70 U/L и брой на тромбоцитите < 150 × G/L. Описана е и частична форма на заболяването при жени с тежка преeklampсия, при която са налични само 1 или 2 от 3-те критерия. Тромбоцитопенията, която е най-ранната аномалия на коагулацията, определя тежестта на HELLP според системата Mississippi-TripleClass, въпреки че тежките усложнения, като хепатит и кръвоизлив, се появяват при пациентите дори преди броят на тромбоцитите да спадне под 100 × G/L.

AFLP е рядко, животозастрашаващо усложнение през третия триместър на бременността. Приблизително 50% от пациентите с AFLP отговарят на критериите за преeklampсия, но често се припокрива и с HELLP синдрома. В приблизително 15% -20% от случаите няма симптоми. Лабораторните изследвания показват наличието на нормохромна, нормоцитна анемия без или с микроангиопатична хемолиза, повишен брой левкоцити /по-висок, отколкото обикновено се наблюдава при бременност, тромбоцитопения. Тромбоцитопенията понякога е тежка (брой на тромбоцитите < 20 × G/L) и обикновено се свързва с наличието на DIC, повишени серумни трансаминази (които могат да надвишават 1000 IU/L), повишени нива на билирубина, главно конюгирания и други отклонения като метаболитна ацидоза, повишен креатинин (отразяващ остра бъбречно увреждане, често прогресиращо до олигурична бъбречна недостатъчност), хипогликемия, висок амоняк.

### **ТЕРАПЕВТИЧНО ПОВЕДЕНИЕ – „DELIVERY IS THE ULTIMATE CURE“**

Предизвикването на раждане е единственият ефективен терапевтичен подход при състояние на преeklampсия, HELLP и AFLP. Може да бъде отложено до 48 часа, с цел приложение на кортикостероид за стимулиране зрелостта на белодробния паренхим на плода, при бременни < 34 г.с. Пациентките остават под интензивно наблюдение след раждането, тъй като лабораторните показатели обикновено се влошават значимо през първите 24-48 часа след раждането – пик в стойността на LDH и достигане на надира на тромбоцитите. При отсъствието на други усложнения, като тежък DIC, бъбречна недостатъчност и асцит, броят на тромбоцитите трябва да започне да се повишава до четвъртия ден след раждането и да достигне 100 × G/L до шестия ден. Употребата на високи дози стероиди при лечението на синдрома на HELLP остава спорна. A Cochrane мета-анализ показва, че пациентите, приемащи и кортикостероиди, са имали значително по-голямо подобрене на броя на тромбоцитите в сравнение с тези, които не са,

но не е имало положителен ефект върху майчината смъртност тежестта на майчината заболяемост, или перинатална/натална смъртност. Избор за лечение на пациенти с тежък HELLP (тромбоцити < 50 x G/ L) е интравенозно приложение на дексаметазон 10 мг на всеки 12 часа в продължение на 2-4 дози преди раждане и още 2 дози 10 мг интравенозно на всеки 12 часа след раждането.

Терапевтичен плазмения обмен се препоръчва, ако тромбоцитопенията, хемолизата или бъбречната недостатъчност продължават да се влошават 48-72 часа след раждането или диференциалната диагноза между прееклампсия/HELLP/AFLP и тромботична тромбоцитопенична пурпура/атипичен хемолитичноуремичен синдром не е възможна.

### **ТРОМБОТИЧНА ТРОМБОЦИТОПЕНИЧНА ПУРПУРА /ТТР/ И ХЕМОЛИТИЧНО-УРЕМИЧЕН СИНДРОМ /HUS/**

Въпреки различната патофизиология, ТТР и HUS споделят припокриващи се клинични признаци и могат да бъдат трудно разпознаваеми един от друг, от специфичните за бременността усложнения, описани по-горе, и от някои автоимунни заболявания.

Честотата на ТТР/HUS при бременност /1 на 25 000/е значително по-висока, отколкото при общото население. Времето на появата на ТТР/HUS при бременност е променливо, но изключително рядко се наблюдава през първия триместър.

ТТР се свързва с дефицит на ADAMTS13, който рядко е вроден и наследен (синдром на Upshaw-Schulman) и може да се прояви за първи път по време на бременност. В повечето случаи се касае за придобит дефицит, дължащ се на обрзуване на автоантитела, неутрализиращи активността на ADAMTS13. Дефицит на протеазата, разцепващ VWF, може да възникне и при DIC, HUS, прееклампсия и HELLP. Специфичен за ТТР е тежкият дефицит на ADAMTS 13 (< 5% активност в плазмата).

HUS е по-хетерогенно заболяване. Най-честата форма на HUS (90% от случаите) е причинена от инфекция със Shiga-токсин продуциращи Escherichia coli (особено типове O157: H7 и O104: H4). Най-честата форма на HUS при бременност е атапичната, свързана с вродени дефекти на алтернативния път на системата на комплемента.

### **ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПЕВТИЧНО ПОВЕДЕНИЕ**

Ранната диагностика и незабавното започване на лечение на ТТР/HUS са от съществено значение, тъй като при нелекувани пациенти, честотата на фаталните събития е най-висока през първите 24 часа от клиничната изява. Лабораторните изследвания показват наличието на микроангиопатична хемолитична анемия, негативен (с редки изклю-

чения) директен антиглобулинов тест, нормални коагулационни тестове (протромбиново време, активирано парциално тромбoplastиново време, фибриноген и D-димери), повишени нива на креатинин, лека протеинурия, микроскопска хематурия.

Първоначалното поведение при ТТР/HUS по време на бременност не се различава от това при останалите пациенти. Най-ефективната терапия е плазменият обмен, който трябва да започне възможно най-рано, дори при несигурна диагноза, тъй като рисковете от усложненията на ТТР/HUS значително превишават тези, свързани с плазмообмена.

Плазменият обмен първоначално се извършва ежедневно, докато броят на тромбоцитите достигне стойности > 150 x G/ L в продължение на най-малко 3 дни и серумните нива на LDH достигнат нормални или почти нормални нива, след което за период от 2 седмици, честотата на процедурите постепенно се намалява. При липса на отговор към терапията – родоразрешение. При достигане на PLT > 50 x G/ L, според някои автори, се препоръчва започване на аспиринов 75 mg/ден и нискомолекулен хепарин в профилактични дози подкожно. Дори при развитие на ТТР през първия триместър, редовният плазмообмен може да позволи продължаване на бременността при раждане на живо дете. Предизвикване на раждане се препоръчва за жени, които не отговарят на терапевтичния плазмообмен. По отношение на наследствения ТТР, профилактичните плазмените инфузии (10-15 mL/kg) при майките могат да бъдат напълно достатъчни. Те трябва да започнат възможно най-рано през първия триместър. Честотата на плазмената терапия се определя от показателите на кръвната картина и нивото на LDH. Преди раждане се препоръчва провеждане на плазмен обмен, който да осигури адекватни нива на ADAMTS13. Рискът от рецидив при последваща бременност в случаите на наследствен ТТР без профилактична плазмена терапия е 100%. Рискът от рецидив по време на последваща бременност при жени с придобит ТТР, свързана с тежък дефицит на ADAMTS13, е около 20 %. В тези случаи се препоръчва внимателно проследяване жените по време на бременността и започване на профилактичен плазмен обмен, при спадане активността на ADAMTS13 под < 10%, или появата на шизоцити в кръвната натрилка.

### **ФЕТАЛНО-НЕОНАТАЛНА АЛОИМУННА ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ**

Най-честата причина за тежка тромбоцитопения и интракраниални хеморагии при новородените с честота 1: 1000-3000 живородени. Патофизиологично се асоциира със сенсibiliзация на майката с антигени от повърхността на феталните PLT – HPA-1a, като това може да настъпи в 50 % от случаите още при първата бременност и не се влияе от стойността на PLT на майката. Основ-

но лечението включва – IVIG, стероиди, фетални тромбоцитни трансфузии с облъчени тромбоцити, най-често донор е майката.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Sullivan CA, Martin JN Jr. Management of the obstetric patient with thrombocytopenia. *Clin Obstet Gynecol* 1995;38(3):521-534.
2. Burrows RF, Kelton JG. Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1993;329(20):1463-1466.
3. Boehlen F, Hohlfeld P, Extermann P, Perneger TV, de Moerloose P. Platelet count at term pregnancy: a reappraisal of the threshold. *Obstet Gynecol* 2000;95(1):29-33.
4. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 2009;113(11):2386-2393.
5. Burrows RF, Kelton JG. Thrombocytopenia at delivery: a prospective survey of 6715 deliveries. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162(3):731-734.
6. Win N, Rowley M, Pollard C, Beard J, Hambley H, Booker M. Severe gestational (incidental) thrombocytopenia: to treat or not to treat. *Hematology* 2005;10(1):69-72.
7. ACOG practice bulletin: Thrombocytopenia in pregnancy. Number 6, September 1999. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 1999;67(2):117-128.
8. Kujovich JL. von Willebrand disease and pregnancy. *J Thromb Haemost* 2005;3(2):246-253.
9. Lescale KB, Eddleman KA, Cines DB, et al. Antiplatelet antibody testing in thrombocytopenic pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174(3):1014-1018.
10. McCrae KR. Thrombocytopenia in pregnancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:397-402.
11. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L Jr, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011;117(16):4190-4207.
12. Т. Лисичков. Тромбоцитопени. В: Клинична хематология (част II). София 2004, 807-33
13. Методично указание за диагностициране, лечение и проследяване на пациенти със заболявания на кръвта и кръвоотворните органи. Версия 2, Май 2011 г.
14. Maternity Guidelines – Thrombocytopenia in Pregnancy (GL927) October 2017
15. Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, et al. Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology* 2000;62(6):385-392.
16. Michel M, Novoa MV, Bussel JB. Intravenous anti-D as a treatment for immune thrombocytopenic purpura (ITP) during pregnancy. *Br J Haematol* 2003;123(1):142-146.
17. Alstead EM, Ritchie JK, Lennard-Jones JE, Farthing MJ, Clark ML. Safety of azathioprine in pregnancy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1990;99(2):443-446.
18. Sukenik-Halevy R, Ellis MH, Fejgin MD. Management of immune thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2008;63(3):182-188.
19. Reddy D, Murphy SJ, Kane SV, Present DH, Kornbluth AA. Relapses of inflammatory bowel disease during pregnancy: in-hospital management and birth outcomes. *Am J Gastroenterol* 2008;103(5):1203-1209.
20. Griffiths J, Sia W, Shapiro AM, Tataryn I, Turner AR. Laparoscopic splenectomy for the treatment of refractory immune thrombocytopenia in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 2005;27(8):771-774.
21. Payne SD, Resnik R, Moore TR, Hedriana HL, Kelly TF. Maternal characteristics and risk of severe neonatal thrombocytopenia and intracranial hemorrhage in pregnancies complicated by autoimmune thrombocytopenia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(1):149-155.
22. Fujimura K, Harada Y, Fujimoto T, et al. Nationwide study of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnant women and the clinical influence on neonates. *Int J Hematol* 2002;75(4):426-433.
23. Chakravarty EF, Murray ER, Kelman A, Farmer P. Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab. *Blood* 2011;117(5):1499-1506.
24. Orisaka M, Shukunami K, Orisaka S, Goto K, Yoshida Y, Kotsuji F. Combination therapy for a pregnant woman with severe refractory ITP. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005;121(1):119-120.
25. Kaplan C, Daffos F, Forestier F, et al. Fetal platelet counts in thrombocytopenic pregnancy. *Lancet* 1990;336(8721):979-982.
26. American Society of Anesthesiologists Task Force on Obstetric Anesthesia. Practice guidelines for obstetric anesthesia: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Obstetric Anesthesia. *Anesthesiology* 2007;106(4):843-863.
27. Koyama S, Tomimatsu T, Kanagawa T, Kumasawa K, Tsutsui T, Kimura T. Reliable predictors of neonatal immune thrombocytopenia in pregnant women with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 2012;87(1):15-21.
28. Christiaens GC, Nieuwenhuis HK, Bussel JB. Comparison of platelet counts in first and second newborns of mothers with immune thrombocytopenic purpura. *Obstet Gynecol* 1997;90(4):546-552.
29. Burrows RF, Kelton JG. Low fetal risks in pregnancies associated with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163(4):1147-1150.
30. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 2002;99(1):159-167.
31. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome. Clinical issues and management: a review. *BMC Pregnancy Childbirth* 2009;9:8. Cross-RefPubMedGoogle Scholar
32. Sibai BM. Evaluation and management of severe preeclampsia before 34 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205(3):191-198.
33. Martin JN Jr, Files JC, Blake PG, et al. Postpartum plasma exchange for atypical preeclampsia-eclampsia as HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(4 Pt 1):1107-1125. discussion 1125-1107.
34. Dashe JS, Ramin SM, Cunningham FG. The long-term consequences of thrombotic microangiopathy (thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome) in pregnancy. *Obstet Gynecol* 1998;91(5):662-668.
35. Noris M, Caprioli J, Bresin E, et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5(10):1844-1859.
36. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. 2010. *Blood* 2010;116(20):4060-4069.
37. Veyradier A, Stepanian A, Coppo P. ADAMTS13, thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy. *Hereditary Genetics* 2012:1-6.
38. Vesely SK, Li X, McMinn JR, Terrell DR, George JN. Pregnancy outcomes after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Transfusion (Paris)* 2004;44(8):1149-1158.

## Адрес за кореспонденция

Национална болница за активно лечение на хематологични заболявания

Адрес: ул. Пловдивско поле №6, София, п.к.1756  
Тел.: +359 2 45 42 115

## Correspondence address:

National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematology Diseases  
Address: 6 Plovdivsko Pole Street, Sofia, 1756  
Phone : + 359 2 45 42 115

# КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА КРИПТОГЕННА СПЛЕНОМЕГАЛИЯ С ВТОРИЧНА ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ

**Виктория Върбанова**

Клиника по Хематология, ВМА – София

## CRYPTOGENIC SPLENOMEGALY WITH SECONDARY THROMBOCYTOPENIA – CLINICAL CASE PRESENTATION

**Viktorija Varbanova**

Клиника по Хематология, ВМА – София

**Резюме.** Представен е клиничен случай на неясна спленомегалия и тромбоцитопения с давност от 27 години, при пациент с хистологично доказан метастатичен колоректален карцином. Извършена е спленектомия с диагностична и терапевтична цел. Хистологичното изследване на слезката не доказва ясна етиологична причина за спленомегалията. Прие се диагноза криптогенна спленомегалия с хиперспленизъм. Отчетен е пълен терапевтичен отговор по отношение на тромбоцитния брой, но в постоперативния период са регистрирани две фатални усложнения- постоперативен сепсис и смърт. В заключение криптогенната спленомегалия е труден диагностичен казус. Нужен е мултидисциплинарен подход и дискусия при обсъждане на диагностичната и терапевтичната стойност на спленектомията в тези случаи с прецизна оценка на ползите и риска съобразно индивидуалните характеристики на конкретния пациент.

**Ключови думи.** спленомегалия, хиперспленизъм, спленектомия

**Abstract.** A clinical case of splenomegaly with unknown origin and thrombocytopenia with a duration of at least 27 years in a patient with histologically proven metastatic colorectal carcinoma is presented. A splenectomy was performed with a diagnostic and therapeutic purpose. The histological investigation of the spleen did not demonstrate a clear etiological reason for splenomegaly. Diagnosis of cryptogenic splenomegaly with hypersplenism was accepted. A complete therapeutic response regarding to platelet count was reported, but two fatal complications of postoperative sepsis and death were recorded in the postoperative period. In conclusion, cryptogenic splenomegaly is a difficult, but not excluded, diagnostic case. A multidisciplinary approach is needed to discuss the diagnostic and therapeutic value of splenectomy in these cases with a precise assessment of the benefits and risks according to the individual characteristics of the particular patient.

**Key word.** splenomegaly, hypersplenism, splenectomy

### ВЪВЕДЕНИЕ

Понятието хиперспленизъм се отнася за клиничен синдром, включващ спленомегалия и намаляване на поне една клетъчна линия от кръвната картина при нормална костно-мозъчна функция с доказателства за повишено освобождаване на незрели клетки от костния мозък в периферното русло, като ретикулоцити или незрели тромбоцити (PLT)<sup>1</sup>. Спленомегалията обикновено влиза в комплексна клинично-лабораторна констелация на друго основно заболяване. Още в началото на 20-ти век Osler отбелязва, че спленомегалията почти винаги е причинена от заболявания извън далака<sup>2</sup>. В най-висок процент спленомегалия се асоциира с хематологично заболяване (16–66%), черnodробно увреждане (9–41%), инфекция (9–36%),

системно възпалително заболяване или застойна слезка (4–10%). В 1–2% от случаите обаче етиологичната причина остава неопределена (криптогенна спленомегалия)<sup>3-7</sup>. За приемане на диагноза криптогенна спленомегалия е необходима хистологична верификация.

Ретроспективен анализ на медицинската документация на 129 спленектомирани пациенти с диагноза спленомегалия/хепатоспленомегалия неклафицирана по друг начин от Датския Национален регистър, показва, че дори след хистологична верификация етиологичната причина остава неидентифицирана при една четвърт (25%) от случаите<sup>6</sup>. Данните са в подкрепа на твърдението, че при неясна спленомегалия спленектомията има висока диагностична стойност.

## КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ.

Пациентка на 76 год., която постъпва за пръв път в хематологично отделение за диагностично и терапевтично уточнява по повод на тромбоцитопения (PLT 44 x 10<sup>9</sup>/l), насочена от специалист по медицинска онкология. При пациентката е планирана системна химиотерапия, поради новодиагностициран метастатичен коло-ректален карцином.

След анамнеза и физикален статус се установиха данни за спленомегалия и тромбоцитопения с давност от 27 години, които до момента не са уточнявани.

На табл. 1 са представени проведените диагностични процедури за определяне на етиологичната причина на спленомегалията в последователността на провеждането им.

Таблица 1. Проведени диагностични процедури в представения клиничен случай

Етиологична причина	КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ МЕТОДИ	ЗАКЛЮЧЕНИЕ
Инфекциозен причинител	подробна анамнеза за тропически заболявания, включително малария HIV: (-) <b>отр.</b>	отхвърлен
Чернодробно заболяване	HbsAg: (-) <b>отр.</b> HCV: (-) <b>отр.</b>	отхвърлен
Хематологично злокачествено заболяване	КАТ на цяло тяло: <b>липсва лимфаденомегалия</b> Трепанобиопсия: <b>хипоцелуларен к.м, представени и трите кръвни редици</b>	Не може да се изключи, но се отхвърля с голяма вероятност
Болести на натрупванията	Болест на Гоше Нийман-пик: <b>ензимна активност на β-глюкоцереброзидаза в норма</b>	отхвърлен
Секвестрация в слеката	Хемолитични анемии: <b>няма антиеритроцитни антитела</b> Таласемия: <b>Hgb 142 gr/L</b>	отхвърлен
Системни възпалителни заболявания	<b>Липсват други клинични прояви</b>	Не може да се изключи, но се отхвърля с голяма вероятност
Застойна слезка	УЗИ на коремни органи: <b>спленомегалия</b> <b>Липсват други клинични прояви</b>	отхвърлен
Тромбоцитопения поради инфилтрация на костния мозък от съпътстващия коло-ректален карцином	Трепанобиопсия: <b>хипоцелуларен к.м, представени и трите кръвни редици</b>	отхвърлен
ИТП със спленомегалия	Трепанобиопсия; <b>хипоцелуларен к.м, представени и трите кръвни редици</b> Терапия с КС за ИТП: <b>липсва терапевтичен отговор</b>	отхвърлен

Hgb – хемоглобин; ИТП – имунна тромбоцитопенична пурпура

От проведените диагностични процедури бе отхвърлена спленомегалия с вторична тромбоцитопения поради системно възпалително заболяване, инфекция, чернодробно заболяване, бенигна хемопатия с хемолиза, ИТП. Липсата на инфилтрация на костния мозък от метастатичен карцином на дебелото черво или лимфом/левкемия и липсата на КАТ данни за лимфаденомегалия отхвърлят костно-мозъчна инфилтрация от злокачествено онкологично/онкохематологично заболяване. За коректно определяне

на причината за спленомегалията беше обсъдено насочване на пациента за спленектомия с диагностична цел.

### ТЕРАПЕВТИЧНА СТРАТЕГИЯ

Спленектомия с диагностична и терапевтична цел. Пациентката бе насочен за планова спленектомия след обсъждане на мултидисциплинарен комитет. Целта на процедурата е диагностично уточняване и подобряване на PLT брой, осигуряващи безопасно провеждане на планираната химиотерапия за метастатичния карцином. Плановата спленектомия е извършена ноември 2017 г.

### ХИСТОЛОГИЧЕН РЕЗУЛТАТ ОТ СПЛЕНЕКТОМИЯ

Слезка с размери 19x13x7 cm., 922 gr. Субкапсулно: обилно еритроцитно маси (застойни промени).

### ЕФЕКТ ОТ СПЛЕНЕКТОМИЯТА И НАСТЪПИЛИ УСЛОЖНЕНИЯ.

За пръв път от 27 години, пациентката е с нормален тромбоцитен брой (табл. 2). В следоперативния период са регистрирани следните компликации: перитонит декември 2018 г, сепсис януари 2018 г. Следоперативно стойностите на хемоглобина (Hgb) достигнаха 62 gr/L с доказан железен дефицит, което свързахме с вероятно кървене и сепсис. Проведена е заместителна терапия с изогрупов еритроцитен концентрат и тройна антимикуробна и противогъбична терапия с отчетен терапевтичен отговор: афебрилна при дехоспитализация, Hgb 106 gr/L, WBC 5.7 x 10<sup>9</sup>/L, PLT 480 x 10<sup>9</sup>/L, CRP 21.1

Таблица 2. Хематологични показатели

	ПРЕДИ СПЛЕНЕКТОМИЯ	СЛЕД СПЛЕНЕКТОМИЯ
Hgb gr/L	142	106
WBC x 10 <sup>9</sup> /L	4.65	7.7
Neu x 10 <sup>9</sup> /L	3.8	6.3
ДКК	Neu 81.6%, Lym 12.0%, Mo 6.0%	Neu 81.2%, Lym 10.4%, Mo 8.4%
PLT x 10 <sup>9</sup> /L	85	204
Хипохромия	не	да
Анизоцитоза	не	да
Пойкилоцитоза	не	да

WBC – левкоцити; Neu – неутрофили; Lym- лимфоцити; Мо – моноцити; ДКК – диференциална кръвна картина

### ДИСКУСИЯ

Първата спленектомия е извършена през 1826 г. от Quittenbaum и от тогава спленектомията е рутинна хирургична процедура<sup>8</sup>. По настоящем индикациите за спленектомия се разделят на абсолютни и относителни. Абсолютни индикации са травма (руптура) на слезката, спленален абсцес, спленална киста, аневризма на спленалната артерия, част от радикална ексцизия на тумор директно инфилтриращ слезката. При абсолютни индикации спленектомията е с минимална диагностична стойност, но може да се окаже животосъхраняваща интервенция. При пациентите с относителни индикации диагностичната и нейната терапевтична стойност са спорни. За някои нозологии като ИТП, спленектомия доказано осигурява терапевтичен отговор в приблизително 70% от случаите<sup>9</sup>. Хематологичен отговор е регистриран в 70% от пациенти с аутоимунна хемолитична анемия и 100% от случаите с наследствена сфероцитоза<sup>10</sup>. При криптогенна спленомегалия с цитопения подобни данни не са публикувани.

В представения клиничен случай бе извършена планова спленектомия при относителни индикации с диагностична и терапевтична цел. Въпреки проведената оперативна интервенция с хистологично изследване на слезката, етиологичната причина за спленомегалията и тромбоцитопенията не се идентифицира. Лабораторните и хистологични данни изключват наличието на активно системно заболяване, засягащо далака или локално заболяване на органа. Прие се, че се касае за криптогенен хиперспленизъм. Криптогенна спленомегалия е докладвана и от други изследователски екипи<sup>3-7</sup>. Въпреки, че диагностичната стойност на проведената спленектомията бе минимална, по отношение на PLT брой беше отчетен пълен терапевтичен отговор. В постоперативния период бяха наблюдавани тежки усложнения – перитонит и сепсис.

До 1952 г. се е приемало, че спленектомията е безопасна процедура, когато King и Schumacher описват повишен риск от инфекциозни усложнения след премахване на слезката<sup>11</sup>. От тогава извършването на процедурата е усъвършенствана, но рисковете остават<sup>12</sup>. В скорошни проучвания се съобщава за 20-52% постоперативните усложнения и 1.2-2.4% следоперативна смъртност<sup>13-15</sup>, която достига до 33.6% на 90-тия ден<sup>15</sup>. Най-честите усложнения свързани със спленектомия са инфекции, хеморагии и тромбоемболични инциденти. Постоперативно инфекциозни усложнения, обикновено със Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis и H influenzae, се наблюдават в 0.1% до 0.5% от спленектомираните и завършват фатално в 50% от случаите<sup>16,17,18</sup>. Смъртността при пневмококава инфекция достига до 60%<sup>11,16</sup>. Затова при всички пациенти над 2 годишна възраст се препоръчва ваксина срещу

Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis и H influenzae type, поне 2 седмици преди интервенцията, за да се осигури оптимална продукция на антитела. Според повечето международни препоръки е удачна и периперативна профилактика с широко-спектърни антимикубни агенти 19,20. Смъртността вследствие на хеморагия е 3-15%8. Тромбоемболични усложнения се наблюдават в до 10% от пациентите с подлежащо хематологично заболяване и може да се манифестира с тромбоза на vena portae, белодробна тромбоемболия и дълбока венозна тромбоза 21,22. Няма ясни препоръки за постоперативна антиромботична профилактика. Някои автори обсъждат прилагане на Heparin за седем дни или по-дълъг период 23 или ниски дози Aspirin при постоперативен PLT брой над 800 G/l8.

От представената медицинска документация след спленектомията се установи, че при представения клиничен случай не е проведена препоръчаната предоперативна ваксинация, антимикубна и антиромботична профилактика, което с голяма вероятност е причината за настъпилите следоперативни усложнения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При пациенти с неясна спленомегалия усложнена от хиперспленизъм, спленектомията е с диагностична стойност и потенциална терапевтична полза, но и с висок риск от оперативно-свързани компликации и смъртност. Нужно е провеждането на голям брой специфични диагностични тестове и мултидисциплинарен подход преди приемането на диагноза криптогенна спленомегалия, в който клиничния хематолог има основно значение за планирането и осигуряването на диагностичния и терапевтичен алгоритъм, както и прецизна оценка на ползите и риска съобразно индивидуалните характеристики на конкретния пациент.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

- Hoffbrand A.V., Moss P.A.H., Pettit J.E. Essential Haematology. Wiley-Blackwell Publishing Ltd., Massachusetts, USA 2008, 126
- Osler W. Discussion on splenic enlargements other than leukaemic. Brit Med J. 1908; ii:1151-8.
- O'Reilly RA. Splenomegaly in 2,505 patients at a large university medical center from 1913 to 1995. 1963 to 1995: 449 patients. West J Med. 1998; 169(2):88-97.
- O'Reilly RA. Splenomegaly at a United States County Hospital: diagnostic evaluation of 170 patients. Am J Med Sci. 1996; 312(4):160-5.
- Swaroop J, O'Reilly RA. Splenomegaly at a university hospital compared to a nearby county hospital in 317 patients. Acta haematologica. 1999; 102(2):83-8.
- Rotbain E. C., Hansen D. L., de Muckadell O. S., et al. Splenomegaly – Diagnostic validity, work-up, and underlying causes. PLOS ONE 2014; 14: 1-11.

- Sathakis N.E., Papayannis A.G., Dervenoulas J., et al. Multiple Coagulation Abnormalities in a Case of Cryptogenic Splenomegaly. British Medical Journal, 1974, 4, 142-143.
- Clarke PJ, Morris PJ. Surgery of the spleen. In: Oxford textbook of Surgery, vol. 2. Morris and Matt Oxford University Press; 1994.
- Wang M, Zhang M, Zhou J. et al. Predictive factors associated with long-term effects of laparoscopic splenectomy for chronic immune thrombocytopenia. Int J Hematol. 2013; 97(5):610-6.
- Balagué C, Targarona EM, Cerdán G, Long-term outcome after laparoscopic splenectomy related to hematologic diagnosis. Surg Endosc. 2004; 18(8):1283-7.
- King H, Schummacher HB. Splenic studies: Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. Ann Surg 1952; 136:704-6.
- Thomsen RW, Schoonen WM, Farkas DK, et al. Risk for hospital contact with infection in patients with splenectomy: a population-based cohort study. Ann Intern Med 2009; 151(8):546-55.
- Shute PG. Splenectomy and susceptibility to malaria and babesiae infection. BMJ 1975; i:516.
- Teo KG, Anavekar NS, Yazdabadi A, Ricketts S. Asplenic fulminant sepsis secondary to a dog bite complicated by toxic epidermal necrolysis/Stevense Johnson syndrome. N Z Med J 2012; 125:74-7.
- Yong M, Thomsen RW, Schoonen WM, et al. Mortality risk in splenectomised patients: a Danish population-based cohort study. Eur J Intern Med 2010; 21(1):12-6.
- Sarangi J, Coleby M, Trivella M, Reilly S. Prevention of post splenectomy sepsis: a population based approach. J Public Health Med 1997; 19(2):208-12.
- Davies JM, Lewis MPN, Wimperis J, et al. Guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen. Prepared on behalf of the British Committee for standards in Haematology by a Working Party of the Haematology-Oncology Task force. Br J Haematol 2011; 155:308-17.
- Frackle EL, Neu HC. Post splenectomy infection. Surg Clin North Am 1981; 61: 135-55.
- Davies JM, Barnes R, Milligan D. Update of guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen. Clin Med 2002; 2: 440-443.
- Davies I.L., J Cho, MH Lewis. Splenectomy results from an 18-year single centre experience. Ann R Coll Surg Engl 2014; 96: 147-150.
- Crary SE, Buchanan GR. Vascular complications following splenectomy for hematologic disorders. Blood 2009; 114:2861-8.
- Mohren M, Markmann I, Dworschak U, et al. Thromboembolic complications after splenectomy for hematologic diseases. Am J Hematol 2004; (76): 143-7.
- Rattner DW, Ellman L, Warshaw AL. Portal vein thrombosis after elective splenectomy. An underappreciated, potentially lethal syndrome. Arch Surg 1993; 128:565-9.

## Адрес за кореспонденция

Виктория Върбанова

Клиника по Хематология, ВМА – София

Д-р Виктория Пламенова Върбанова

Клиника по Хематология, Военномедицинска

Академия, МБАЛ София

бул. "Св. Георги Софийски" № 3, София 1606

тел: 0884674160

e-mail: viktoriia1982@abv.bg

# НОВ ИНОВАТИВЕН МЕТОД ЗА БЪРЗ АНАЛИЗ НА МУТАЦИИТЕ В ХЕМОГЛОБИНОВИЯ ГЕН ЗА ПАЦИЕНТИ, СЪМНИТЕЛНИ ЗА НОСИТЕЛСТВА

*Виолета Йорданова, Тодор Черкезов -дм,*

*Молекулярно- генетична лаборатория*

*МБАЛ „Д-р Атанас Дафовски” гр. Кърджали*

## INNOVATIVE METHOD FOR QUICK ASSESSMENT OF MUTATIONS IN THE HEMOGLOBIN GENE WITH PATIENTS SUSPECTED FOR CARRIERS

*Violeta Yordanova, Todor Tcherkezov MD, PhD*

*Molecular – genetics laboratory*

*Hospital for Active Treatment “dr. Atanas Dafovski” Kardzali, Bulgaria*

---

### **Резюме.**

**Въведение.**  $\beta$ -Таласемията е сред най-често срещаните генетични заболявания с тежки последици и разпространение в цял свят. Независимо от изследванията и превенцията все още съществуват повече от 10000 регистрирани хомозиготни носители. Назначени са успешни генетични програми към специфични особености и територии. Клинично болестта се изразява с анемия, която е в три форми: таласемия майор- хомозиготна, таласемия интермедия и таласемия минор, която представлява само носителство за единична мутация в един алел.

**Цел.** Да се представи и оцени на нов метод за изследване с rtPCR при пациенти с анемия, съмнителни за носителства на мутация в хемоглобиновия ген, като се определи нейния тип и схемата на унаследяването.

**Материали и методи.** От кръвна проба, получена от засегнат пациент и семейството му в болницата за активно лечение „Д-р Атанас Дафовски” гр. Кърджали е изолирана геномна ДНК и по-нататък изследвана за мутации в хемоглобиновия ген чрез rtPCR.

**Резултати.** Методът, който използвахме в настоящото проучване намираме за много подходящ за нашата болница, където има нужда от бърз и точен анализ на таласемийните носителства. Резултатите, които представяме по метода присъства/отсъства, както и дизайна на теста предоставя възможности за бърз анализ.

**Заключение.** Представеният метод е бърз и подходящ за оценка на специфичите и най-често срещани мутации в региона на югоизточните Родопи.

**Ключови думи.** хемоглобинопатии,  $\beta$ -таласемии, анемия, Средиземноморска анемия мутации

### **Abstract.**

**Background:**  $\beta$ -Thalassemia is among the most common genetic disorders with heavy consequences around the world. There are still more than 10000 homozygous carriers. Successful genetic programs have been designed to gene pools and territorial specifics of each region of the world. Clinically the disease is a type of an anemia with 3 forms: thalassaemia major – homozygous; thalassaemia intermedia and thalassaemia minor, which presents only carriers for single mutation in one allele.

**Aim:** This clinical case presents evaluation of new method with rtPCR in anemic patients, suspect for carriers on hemoglobin gene, determination of the type of the mutations and inheritance patterns.

**Materials and Methods:** A whole blood collected from affected patient and family from the MBAL in Kardzali genomic DNA was isolated and further evaluated for mutations in the hemoglobin gene via rtPCR.

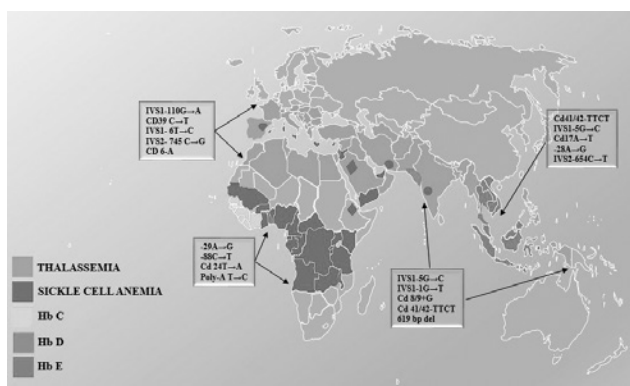
**Results:** The method is being found suitable in our hospital settings, where the need of quick assessment of carriers' mutation is needed. The findings were presented in a presence/absence manner as the design of the kit allows a quick method for such assessment.

**Conclusion:** The presented method is quick and suitable for evaluation of specific most common mutations in the region of South-East Rodopi.

**Key word.** haemoglobinopathies,  $\beta$ -thalassaemia, Mediterranean anemia, anemia, mutations,

## ВЪВЕДЕНИЕ

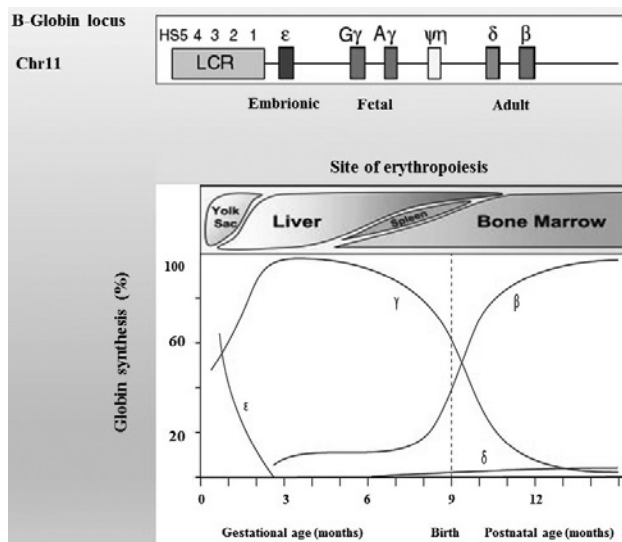
Таласемията е специфичен вид хемоглобинопатия, като най-голям интерес представляват  $\beta$ -таласемията поради по-голямата им честота в региона на югоизточните Родопи. Другите хемоглобинопатии са или много редки или не се срещат тук [1]. Към този момент са регистрирани около 10 000 хомозиготни носители в Европа и САЩ [2]. Счита се, че таласемията има връзка с маларията и популацията на комарите, оттам и по-високо разпространение на носителства в Средиземно море, Северна Африка, Близкия Изток и Арабския Полуостров, Индия, Индонезия. В различни райони на света честотата варира от 0,1% в Източна Европа до 16% в Кипър, като засегнатите фетуси на 1000 бременности варира между 0,0003 и 5,12 в Кипър [3].



Фиг 1. Разпределение на таласемията и най-честите мутации на  $\beta$ -таласемия в различните държави [4].

В България процентът на таласемия е около 2.5-3%. Годишно се срещат около 12-15 деца, които се раждат с някаква форма на тежка таласемия [1,13,14]. В предишни проучвания намерихме повишен процент на таласемийни носители в региона на гр. Кърджали и в близост до пограничните райони [15]. Предполагаме, че се касае за процент, който се доближава до данните на Гърция и Турция, поради близостта на Средиземно море.

Много видове мутации с различни генетични комбинации водят до хетерогенната група на таласемията. Микроцитоза, хипохромия, пойкилоцитоза, еритробласти в периферната кръв и високи нива на HbA2 с нискостепенна анемия са характеристиките на  $\beta$ -таласемийните носители. [5]. За контраст, анемията при Таласемия Майор е толкова тежка, че се налагат непрекъснати кръвопреливания, която водят до желязно свърхобременяване.  $\beta$ -Таласемия интермедия се отнася за по-лек фенотип, при който пациентите показват хетерозиготност, която варира по тежест [6].  $\beta$ -Глобиновият ген е на късото рамо на хромозома 11 и е около 80 Kb дълъг и съдържа също последователност за  $\delta$  глобиновия ген, ембрионния  $\epsilon$  ген, феталния  $A\gamma$  и  $G\gamma$  ген [7,8]. Петте функционални глобинови гена са подредени в хромозомата по ред на тяхната експресия [8].



Фиг 2. Горната част представлява конструкцията на човешкия  $\beta$ -глобинов локус. Долната част на диаграмата показва преходът от фетален към възрастен тип хемоглобин с времетраене на процесите [4].

При  $\beta$ -таласемията има мутации, които засягат всяка една стъпка от формирането на глобиновите молекули; транскрипцията, обработката на иРНК, транслацията на зрялата иРНК и пост-транслационни модификации на  $\beta$ -полипептидната верига [8]. Около 200 различни алела на  $\beta$ -глобиновия ген са открити и описани при състояния на таласемии, представляващи точкови мутации или грешки в крайните последователности. Разпределението на тези алели варира в различните популации, но в рамките на една и съща популация съществуват няколко алела (фигура 1) [4]. Повечето алели са Средиземноморски рецесивни, но има и варианти, които дават клинична изява дори и в присъствието на едно единствено копие – доминантно унаследени  $\beta$ -таласемии [5]. Феталният хемоглобин е често срещан модификатор при тежки клинични случаи на  $\beta$ -таласемия. При нормални индивиди само 5-8% от еритроцитите, наречени F клетки съдържат HbF, 5-20% от цялото количество хемоглобин в тези видове клетки [7,8].

В терапевтичен аспект най-успешна е стволово-клетъчната трансплантация. Значително понижение на желязния свърхтовар се постига чрез широко прилаганата съвременна перорална хелатираща терапия. Съществуват данни, които показват, че индукцията на синтез на  $\gamma$ -глобинови вериги чрез генетична трансдукция или фармакологично са с потенциална полза за пациенти с  $\beta$ -таласемия [1,11]. Във фаза на проучване са новите Tf, хепсидинови агонисти и JAK2 инхибитори [6].

## ЦЕЛ.

Нашата цел е да апробирате техники на rtPCR за  $\beta$ -таласемия за 6 най-често срещани мутации при семейство хетерозиготни носители и докажем въз-

можностите на кита в клинични условия и вероятно епидемиологично проучване.

## МЕТОД

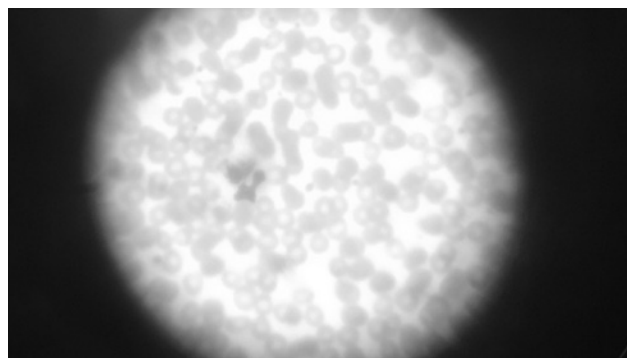
След подписано информирано съгласие при семейството са изследвани; гел електрофореза на еритроцитите за разделяне на хемоглобиновите фракции. Геномна ДНК е била изолирана от цяла кръв за определяне на мутациите. Работата е била извършена с новоразработеният метод на SNP Biotechnology Ltd. Ankara, Турция за определяне на възможни най-често срещани мутации в хемоглобиновия ген: IVS1-1, IVS1-110, IVS2-1, IVS2-745, IVS1-6 и Sickle cell. За изолация на геномна ДНК е използван QIAamp DNA blood mini kit от Qiagen. За rtPCR реакцията е използвана AB StepOne rtPCR система.

## КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

43 годишна жена на амбулаторен преглед при личен лекар с оплаквания за леки, системни главоболия, ниско кръвно налягане (110/60 mmHg) и неразположение по време на работа и особено по време на менструален цикъл. Тя описва също така състояния на чести треперения на ръцете и тремори, които отшумяват, понякога слабост и изтощеност на работното място. При посещението и се забелязват бледост и загуба на тургур на кожата на лицето. Тя също така описва подобни, но по-изразени оплаквания при нейната 18 годишна дъщеря и малко по-слабо изразени при другата, по-малка 17 годишна дъщеря. Съпругът е асимптоматичен. Пациентката описва тези епизоди, като обичайно повтарящи се, наскоро установени и засилващи се. При изследване на кръвна картина са се установили понижени нива на MCV, MCH и MCHC за нея, както и за останалите членове от семейството. Анализът по-нататък е показал RDW повишен между 45 до 48.6fL за всички членове от семейството. RBC са били около  $5.15 \times 10^{12}/L$ , HGB  $\sim 100-110$  g/L, MCV  $\sim 65.8-72.5$ fL, MCH 19.4-20.6 pg, MCHC 295-308 g/L. Ретикулоцити  $\sim 19-22\%$  без данни за желязодефицитна анемия; sFe 21.6- 22  $\mu\text{mol/L}$ , TIBC 53.6-56.1  $\mu\text{mol/L}$ . Електролитите (Na, K, Ca, фосфати и Mg) са били всички в норма. Общ билирубин без повишение – (14.0-15.1  $\mu\text{mol/L}$ ), но повечето от половината е бил индиректен (7.8-6.8  $\mu\text{mol/L}$ ), индикатор за хронична хемолiza. Офтальмологичният преглед и консултация, извършени на пациентката показвали нормална острота и фундоскопия, негативна за пръстена на Kayser-Fleischer. Не са били предоставени данни от ултрасонография на коремни органи.

## РЕЗУЛТАТИ

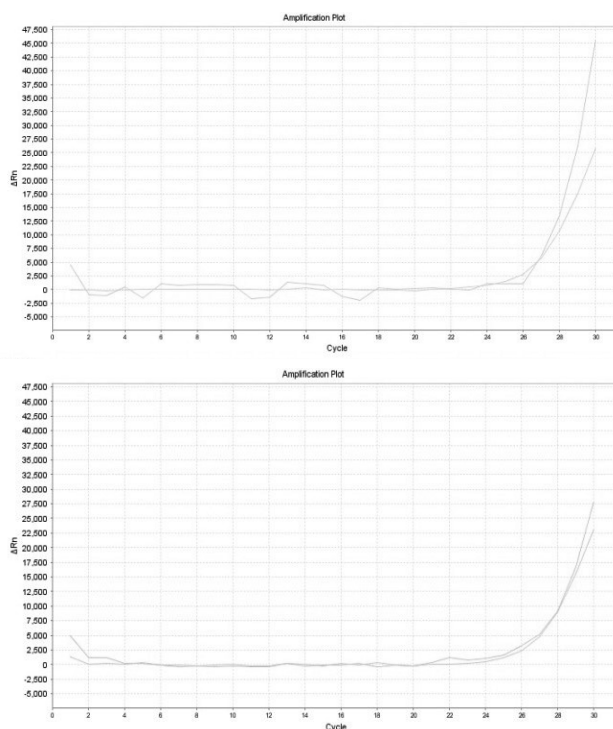
Първо, сравнихме общите резултати от пълната кръвна картина за всички четири члена на семейството и техните резултати подсказваха таласемийно носителство (фиг.3). Последваща електрофореза при четиримата показва повишаване на HbA2 фракции над 3.2% в диапазона 4.1 и 5.5, като нивата на HbF са били  $> 1\%$ . Изследвахме семейството за шестте най-често срещани мутации. Резултатите посочват точкови мутации за всички четири членове на семейството:

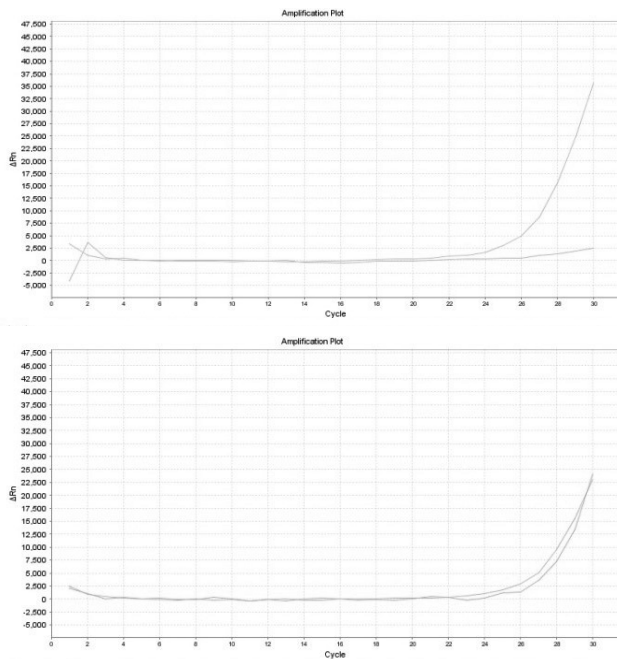


Фиг. 3. Кръвна натриевка на член от семейството с анизомacroцитоза с изолирани таргетни клетки, хипохромия на еритроцитите.

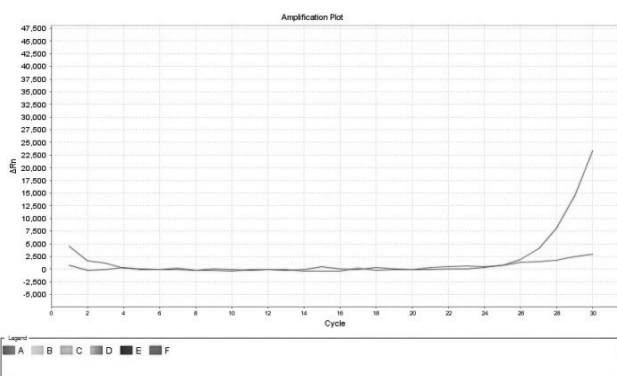
От общо шестте възможни мутации, за които изследвахме майката се оказа носител на две: IVS1-110 и IVS2-745, бащата само носител на IVS2-745; и двете дъщери са били носителки за двете мутации IVS1-110 и IVS2-745 и хетерозиготност.

По-долу е схемата от амплификационния плот на апарата, която показва линейни графики на реакциите (Фигури 4, 5 и 6).

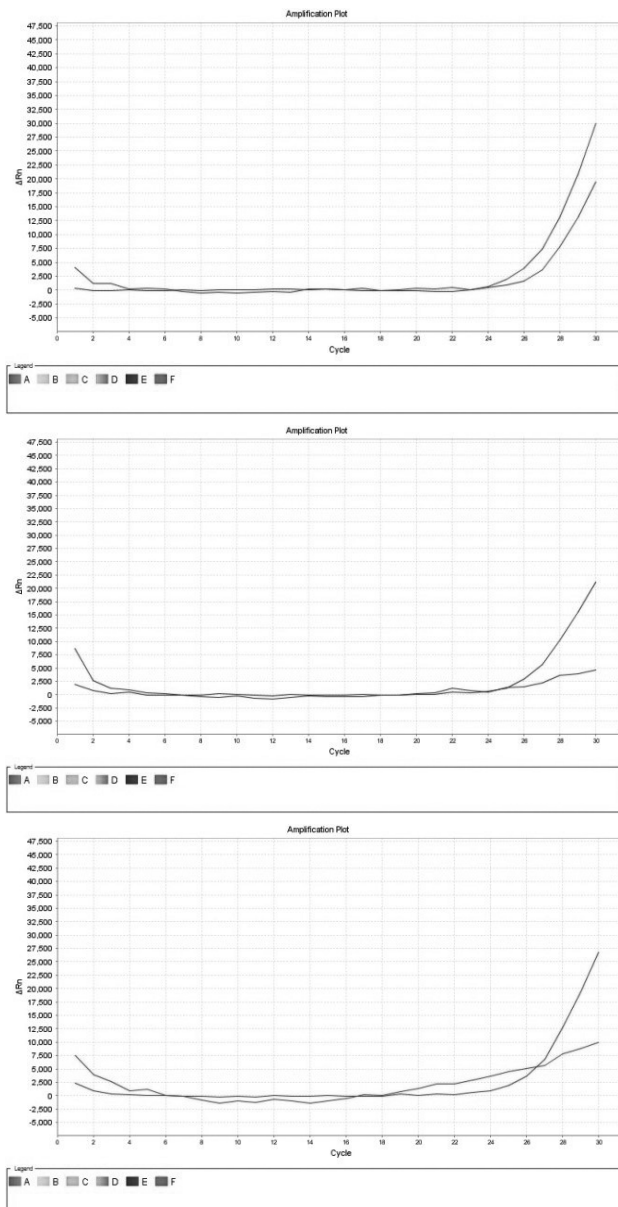
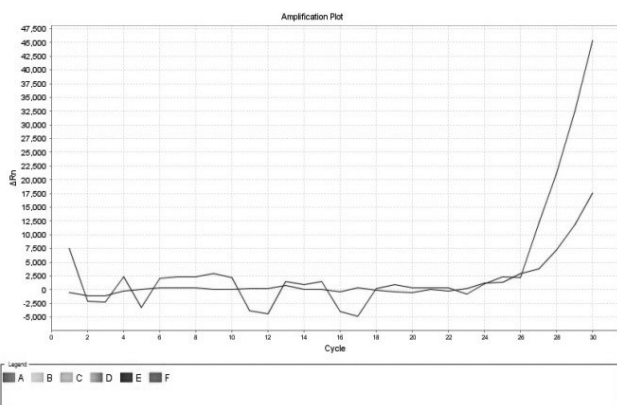




**Фиг. 4.** Резултати от *rtPCR* от представения клиничен случай, показващ носителства на мутациите за членовете от семейството при IVS1-110. Горният панел показва графиките на майката и по-голямата дъщеря. Долният панел е както следва: вляво е бащата, а вдясно е по-малката дъщеря. Сигналят стартира около 26-я цикъл и индикира носителства за дадената мутация, ако и двата „wild type“ и мутационен вид дават сигнал на амплификационния плот



**Фиг. 5.** Представяне на негативна контрола, показваща отсъствие на мутация и представяваща „wild type“ за INS1-1 при нашите пациенти. Амплификационният плот показва линеарна графика, при която се отчита сигнал около 25-я цикъл, това е „wild type“, а мутационният тип остава непроменен.



**Фиг. 6.** Резултати от *rtPCR* от клиничния случай, показващи носителства на мутации за всички четири члена от семейството при IVS2-745 (майката е горе вляво, бащата долу вляво, по-голямата дъщеря горе вдясно и по-малката – долу вдясно).

По-горните графики на амплификационния плот показват разпределението на мутациите в семейството. Както е видно, майката е носител за IVS1-110 и IVS2-745, докато бащата само за IVS2-745. И двете дъщери остават само носители и на двете мутации.

## ДИСКУСИЯ

Нашите резултати представят много интересна находка на таласемийно унаследяване в рамките на едно семейство. Ние изследвахме и други членове от разширеното семейство, като продължихме да намираме същите мутации, едната или другата в зависимост от страната. Интересен факт е, че в конкретния случай при наличие на двама родители

– носители и двете дъщери също са само носители. При наличие на такива мутации с бързо изследване на базата на геномни тестове и мониторинг на общото здравословно състояние им дава значително предимство в мениджмънта на този синдром по-нататък. Дали би било необходимо кръвопреливане, медикаментозна терапия или допълнителни генетични консултации при бъдещо семейно планиране, този тип изследване е добра основа и основание за насочена терапия. Генетичната консултация представява важна страна от цялостната завършеност на проучването на такива случаи, за да даде насоки при семейни заболявания или потенциал за развитие на такива. Допълнителни пренатални ДНК анализи при евентуална нова бременност е наложителна, така че важни решения да бъдат взети по отношение на съществуващи или потенциални рискове. Пренаталните тестове са дефинитивни и могат с точност да определят и на базата на това да бъде поставена диагноза чрез амниоцентеза или хорионна биопсия в съответната гестационна седмица, препоръчана от микропедиатри и генетолози за извършване на този вид манипулация. Нови неинвазивни методи на тестване на ембрионални ДНК фрагменти, циркулиращи в кръвта на майката създават още по-добра перспектива за добра диагностика и мениджмънт на наследствените заболявания.

## ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОУЧВАНЕТО

Ограниченията на този метод според нас се дължи на факта, че се изследват само 6 мутации и някои потенциални носители могат да бъдат елиминирани при поставянето на точната диагноза на този етап от изследване. При все това, нашата цел е да използваме тази система в реално време, поради спецификите на нашия регион в близост до границата ни с Гърция и Турция и да продължим да изследваме нашата популация от смесен етнос. Подобни по-задълбочени проучвания ще бъдат необходими за регистриране на мутациите и тяхното движение в региона, както и в България.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ние считаме, че всеки хетерозиготен носител на таласемия трябва да бъде диагностициран и съответната мутация одиференцирана, за да се избегне по-нататъшен инцидент на фатално онаследяване на деца с тежки вродени аномалии. Представеният метод е сравнително евтин, лесен за изпълнение и интерпретация при съмнение за носителства. Ние направихме оценка за състоянието на представеното семейство с една стъпка, бързо и категорично, което обуславя недвусмислена диагноза, обяснение за клиничното състояние и предпоставка за по-добрия здравен мениджмънт.

## БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Petkov, Georgi & Yordanov, Georgi & Chakarov, Ivan & Vassileva, Petya & D. Efremov, Georgi. (2013). *Molecular Basis of  $\beta$ -thalassaemia in Bulgaria. An Update. Proceeding of the Bulgarian Academy of Sciences.* 66. 10.7546/CR-2013-66-4-13101331-17.
2. Modell, Bernadette; Darlison, Matthew – *Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators – Bulletin of the World Health Organization* <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/6/06-036673/en/>
3. Bozkurt G1. *Results from the north cyprus thalassemia prevention program. Hemoglobin.* 2007; 31 (2):257-64.
4. Nadia Maria Sposi *Medicine » Hematology » Chapter 4 Interaction between Erythropoiesis and Iron Metabolism in Human  $\beta$ -thalassemia – Recent Advances and New Therapeutic Approaches* 2015
5. Palstra RJ, de Laat W, Grosveld F.  *$\beta$ -globin regulation and long-range interactions. Adv Genet.* 2008;61:107–142.
6. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR and Wood WG. *The hemoglobinopathies.* In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Vogelstein B, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (OMMBID); Chapter 101.* New York, NY: McGraw-Hill. 2002.
7. Cappellini MD, Musallam KM, Cesaretti C, Taher A. *Thalassemia intermedia. ESH Handbook on Disorders of Erythropoiesis, Erythrocytes and Iron Metabolism.* 2009;chapter 12:286–309.
8. Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G. *Locus control regions. Blood.* 2002;100:3077–3086.
9. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. *Thalassemia. Lancet.* 2012;379:373–383.
10. Schrier SL. *Pathophysiology of thalassemia. Curr Opin Hematol.* 2002;9(2):123–126.
11. Nienhuis AW, Nathan DG. *Pathophysiology and clinical manifestations of the  $\beta$ -thalassemias. Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Dec. 1;2(12):a011726.
12. Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN. *Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. Science.* 1975;188:361–363.
13. Petkov, Georgi & D. Efremov, G & Efremov, Dimitar & Aleksandar, Dimovski & Tchaicarova, P & Tchaicarov, R & Rogina, B & Agarwal, Sarita & Kutlar, Abdullah & Kutlar, Feride & L. Reese, A & A. Stoning, T & H. J. Huismann, T. (2009).  *$\beta$ -Thalassemia in Bulgaria. Hemoglobin.* 14. 25-33. 10.3109/03630269009002252.
14. L Kalaydjieva, A Eigel, and J Horst – *The molecular basis of beta thalassaemia in Bulgaria.*
15. Violeta Yordanova, Todor Tcherkezov – *Pilot study of  $\beta$ -thalassemia carriers in the region of Kardzali and surroundings – medical and social aspects Molecular-genetics laboratory MBAL “Dr. Atanas Dafovski” Kardzali, Bulgaria; EIGHTH INTERNATIONAL MEDICAL CONGRESS OF THE SOUTHEAST EUROPEAN MEDICAL FORUM (SEEMF) Dates: 07 – 10 September 2017 Venue: Athens, Greece*

## Correspondence address:

Corresponding author: Violeta Yordanova  
MBAL “Dr. Atanas Dafovski” Kardzali, Bulgaria  
Email: yordanovavioleta@yahoo.com  
Tel: +35936168438





## ПРЕПОРЪКИ КЪМ АВТОРИТЕ

Редакционната колегия отправя молба към всички, които биха предложили материали за публикуване в научните издания на дружеството, да спазват следните изисквания:

1. Ръкописите се представят в два идентични екземпляра, написани на стандартни машинописни страници (30 реда, 60-66 знака на ред) или се изпращат в електронен формат.
2. Имената на авторите (разположени под заглавието) са в порядъка: собствено (съкратено с една буква и точка) и фамилия, следвани от местоработата.
3. Материалите не трябва да превишават следните размери:
  - **За Оригинални статии**, включително илюстрации и библиография (до 10 източника) без резюметата – 5-6 страници.
  - **За Обзори** – 10-15 страници.
  - **За раздел “Казуистика”** (лечебни, диагностични методи и др.) – 3 стр.
  - **За Реферати на статии** – 3 стр.
4. Всяка статия трябва да съдържа следните раздели: **резюме, ключови думи, увод, материал и методи, резултати, обсъждане, заключение, библиография.**
5. Библиографията се представя на отделна страница и съдържа до 10 източника за оригиналните статии и до 20 за обзорите. Източниците се подреждат според реда на използването им в текста, (не по азбучен ред).

Цитиране на статии: Фамилно име и инициал на всички автори, ако те са до трима. При повече от трима автори се посочват първите трима, последвано от “et al”, наименованието на списанието в съкратен вид според Index Medicus, година на публикуване, том, месец, брой, страници.

**Цитиране на книги и монографии: Автори, заглавие, място на издаване, издателство, година на издаване, страници**

6. Резюмето (до 15 реда) се представя на български и на английски език в три екземпляра,

съдържащи имената на авторите и заглавието, както и ключови думи на български и английски език.

7. Фигури, диаграми, формули, черно-бели снимки (9x12 см) се представят на отделни листове със съответните заглавия, минимален обяснителен текст и легенда на български език. Те трябва да са максимално контрастни с едри букви и цифри, годни за непосредствено полиграфско възпроизвеждане. В лявото бяло поле на текста се посочва желаното място за поместване на всяка илюстрация.
8. Таблиците могат да се предоставят в текста или на отделни листове. Във втория случай се следват изискванията за фигури, диаграми, формули и форграфи.

### ВАЖНО ! НОВО !

9. **В случай, че материалите се изпращат по електронен път, всички картинки, таблици или схеми се предоставят като отделни файлове във формат .jpeg, .bmp или .tiff, в адекватна като качество резолюция, като имената на файловете на всяка картинка се изписват по адекватен начин, отговарящ на типа картинка и пореден номер – figura 1, tabliza 1 или друго. Картинките трябва да са разположени в текстовия файл на статията, за да се знае точното им местоположение. Моля да се има предвид, че всички картинки, таблици или схеми се отпечатват черно-бели.**
10. В края на статията или на отделен лист се посочват трите имена на водещия автор и адресът за кореспонденция.
11. Всички материали да се изпращат на адреса на редакцията на сп. “Клинична и трансфузионна хематология” – гр. Пловдив, бул. Васил Априлов № 15А, Клиника по Клинична хематология към УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, за проф. д-р Стефан Горанов, дмн.

Всички текстови и графични материали се изпращат задължително на електронен адрес: [stefangoranov@yahoo.com](mailto:stefangoranov@yahoo.com)



[www.bulgarian-hematology.com](http://www.bulgarian-hematology.com)