



БЪЛГАРСКО МЕДИЦИНСКО
СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ
BULGARIAN MEDICAL
SOCIETY OF HEMATOLOGY

ХЕМАТОЛОГИЯ HEMATOLOGY

ТОМ LV – БРОЙ 1-2 – 2019г.

ХЕМАТОЛОГИЯ

HEMATOLOGY

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

TOM/VOL. LV

2019

№ 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, дмн
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, дмн

Проф. д-р Маргарита Генова, дмн

Проф. д-р Фани Мартинова, дмн

Проф. д-р Жанет Грудева – Попова, дмн

Доц. д-р Лиана Герчева, дмн

Проф. д-р Юлиан Райнов, дмн

Доц. д-р Валерия Калева, дмн

Доц. д-р Евгений Хаджиев, дмн

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. Eugeni Hadjiev, MD PhD

Dr. Lilia Sivcheva

СЪДЪРЖАНИЕ/CONTENT

ОБЗОРИ/REVIEWS

1. **ТАРГЕТНА ТЕРАПИЯ ПРИ ОСТРА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ – НАСТОЯЩЕ, БЪДЕЩЕ...**, Гръкланов В., Грудева-Попова Ж., Спасов Е., Попов В., Сотирова К.
TARGET THERAPY FOR ACUTE MYELOID LEUKEMIA – PRESENT, FUTURE, Graklanov V., Grudeva-Popova Zh., Spasov E., Popov V., Sotirova K.,3
2. **ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ : НОВИ ЛЕКАРСТВЕНИ ПРОДУКТИ ПРОМЕНЯТ ИЗЦЯЛО ДОСЕГАШНОТО ТЕРАПЕВТИЧНО ПОВЕДЕНИЕ (АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ОТ ПОСЛЕДНИТЕ 5 Г)**, Горанов С., Горанова – Маринова В.
CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – NEW DRUGS REPLACE THE CURRENT STANDARD REVIEW OF THE CLINICAL TRIALS IN THE LAST 5 YEARS., Goranov S., Goranova-Marinova V.,13
3. **ДИАГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА СТАВНАТА ЕХОГРАФИЯ И МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНА ТОМОГРАФИЯ ЗА ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА СТАВНАТА УВРЕДА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХЕМОФИЛИЯ**, Спасов Н.,
DIAGNOSTIC VALUE OF JOINT ULTRASOUND AND MAGNETIC RESONANCE IMAGING FOR ASSESSMENT OF ARTHROPATHY IN PATIENTS WITH HAEMOPHILIA, Spasov N.,22
4. **ДИАСТОЛНА ДИСФУНКЦИЯ И КАРДИОМИОПАТИЯ ПРИ СЪРПОВИДНОКЛЕТЪЧНА АНЕМИЯ**, Димова М., Калева В., Ненова К., Кашилов Я.
DIASTOLIC DYSFUNCTION AND CARDIOMYOPATHY IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA, Dimova M., Kaleva V., Nenova K., Kashlov Y.,28
5. **ЧЕСТОТА, ДИАГНОЗА И ЛЕЧЕНИЕ НА ПУЛМОНАЛНА ХИПЕРТОНИЯ ПРИ СЪРПОВИДНОКЛЕТЪЧНА АНЕМИЯ**, Димова М., Калева В., Стоянова Л., Кашилов Я., Костуркова М.
INCIDENCE, DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PULMONARY HYPERTENSION IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA, Dimova M., Kaleva V., Stoyanova L., Kashlov Y., Kosturkova M.,34
6. **РЕНАЛНА ДИСФУНКЦИЯ ПРИ БОЛНИ С β -ТАЛАСЕМИЯ МАЙОР.** Стоянова Л., Стайкова Св., Калева В., Димова М.
RENAL DYSFUNCTION IN PATIENT WITH β -THALASSEMIA MAJOR, Stoyanova V., Staykova Sv., Kaleva V., Dimova M.,41
7. **СЪВРЕМЕННОЛЕЧЕНИЕ НА МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ ПРИ БОЛНИ С РЕЛАПС И/ИЛИ РЕФАКТЕРНОСТ. МОЖЕМ ЛИ ДА ПЛАТИМ ЦЕНАТА?** Горанова-Маринова В., Горанов С.
MODERN TREATMENT OF MULTIPLE MYELOMA IN RELAPSED AND REFRACTORY PATIENTS. CAN WE PAY THE PRICE?, Goranova-Marinova V., Goranov S.,48

„ХЕМАТОЛОГИЯ“
бр. 1-2/2019, том LV

“HEMATOLOGY”
issue 1-2/2019, Vol. LV

ISSN 2367-7864
УДК 616.15

Списание то 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 Goranova-
Marinova, MD PhD,
Dr. Katia Sotirova

**STYLE CORRECTION,
GRAPHIC DESIGN:**

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

ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ/ORIGINAL ARTICLES

8. **КОСТНА МИНЕРАЛНА ПЛЪТНОСТ ПРИ ВЪЗРАСТНИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С ТРАНСФУЗИОННО – ЗАВИСИМА БЕТА ТАЛАСЕМИЯ В ЕРАТА НА ТРАНСФУЗИОННА И ХЕЛАТИРАЩА ТЕРАПИЯ – РОЛЯ НА ТАЛАСЕМИЯ-СВЪРЗАНИТЕ ОТКЛОНЕНИЯ,** Сапунарова К., Горанова-Маринова В., Денева Т., Цветкова С., Георгиев П., Грудева-Попова Ж.
BONE MINERAL DENSITY IN THE ERA OF TRANSFUSION AND CHELATING THERAPY – HOW SIGNIFICANTLY THE THALASSEMIA ALTERATIONS MATTER – FIRST BULGARIAN STUDY IN ADULT PATIENTS WITH TRANSFUSION DEPENDENT BETA-THALASSEMIA, Sapunarova K., Goranova-Marinova V., Georgiev P., Deneva T., Tsvetkova S., Grudeva-Popova Zh.,58
9. **ВИТАМИН D, ПОТЕНЦИАЛНО МОДИФИЦИРУЕМ РИСКОВ И ТЕРАПЕВТИЧЕН ФАКТОР ПРИ ХЛЛ?.** Гръкланов В., Денева-Койчева Т.
VITAMIN D, A POTENTIALLY MODIFIABLE RISK AND THERAPEUTIC FACTOR IN CLL? Graklanov V., Deneva-Koicheva T.,69
10. **ДАЛИ ДИФУЗИЯТ В-ЕДРОКЛЕТЪЧЕН ЛИМФОМ Е D-ЛИМФОМ?** Гръкланов В., Горанов Ст., Денева-Койчева Т.
IS DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA A D-LYMPHOMA? Graklanov V., Goranov S., Deneva-Koicheva T.,74
- В ПОМОЩ НА КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА/
SUPPORTING THE CLINICAL PRACTICE**
11. **АНТИАГРЕГАНТНА ТЕРАПИЯ. ПРИЛОЖЕНИЕ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА И ПОВЕДЕНИЕ ПРИ КЪРВЕНЕ,** Динева Д., Паскалева И.
ANTIPLATELET THERAPY. APPLICATION IN CLINICAL PRACTICE AND MANAGEMENT OF BLEEDING, Dineva D., Paskaleva I.,79
12. **ХЕПАРИН-ИНДУЦИРАНА ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ,** Дончева Е., Паскалева И., Динева Д.
HEPARIN-INDUCED THROMBOCYTOPENIA, Doncheva E., Paskaleva I., Dineva D.,89
13. **ИЗТОЧНИЦИ, ПОЛУЧАВАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА СТВОЛОВИ ХЕМОПОЕТИЧНИ КЛЕТКИ,** Тонев И., Минчев М.
SOURCES, HARVESTING AND STORAGE OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS, Tonev I., Mincheff M.,99
14. **ПСИХОАНАЛИЗА И ХЕМАТОЛОГИЯ,** Донкина В., Милчева К., Ганева П., Арнаудов Г., Спасов Бр.,
PSYCHOANALYSIS AND HAEMATOLOGY, Donkina V., Milcheva K., Ganeva P., Arnaudov G., Spassov Br.,106
15. **ЗАЩО ДОРИ ФЛОУЦИТОМЕТРИЯТА И МОЛЕКУЛЯРНИЯТ АНАЛИЗ МОГАТ ДА СА НЕДОСТАТЪЧНИ?** Давидкова Я., Балаценко Г., Генова М.
WHY EVEN FLOW CYTOMETRY AND MOLECULAR ANALYSIS MIGHT BE INSUFFICIENT? Davidkova Y., Balatzenko G., Guenova M.,110
16. **ТРОМБОЦИТИ – ФИЗИОЛОГИЯ И ФУНКЦИЯ. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТРОМБОЦИТНАТА ФУНКЦИЯ,** Динева Д.
PLATELETS - PHYSIOLOGY AND FUNCTION. PLATELET FUNCTION TESTS, Dineva D.,114

ТАРГЕТНА ТЕРАПИЯ ПРИ ОСТРА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ – НАСТОЯЩЕ, БЪДЕЩЕ...

Гръкланов В. ¹, Грудева-Попова Ж. ², Спасов Е. ¹, Попов В. ², Сотирова К. ¹

Медицински Университет – Медицински Факултет, Пловдив

1 – Първа катедра по вътрешни болести,

2 – Катедра по клинична онкология, Университетска Болница „Св. Георги“ – ЕАД, Пловдив

TARGET THERAPY FOR ACUTE MYELOID LEUKEMIA – PRESENT, FUTURE. ..

Graklanov V. ¹, Grudeva-Popova Zh. ², Spasov E. ¹, Popov V. ², Sotirova K. ¹

Medical University – Medical Faculty, Plovdiv

1 – First Department of Internal Diseases,

2 – Department of Clinical Oncology University Hospital „Sv. Georgi“ – EAD, Plovdiv

Резюме. Острата миелоидна левкемия (ОМЛ) е най-честата форма на остра левкемия, като честотата ѝ нараства с възрастта. Доскоро лечението на пациенти с ОМЛ бе ограничено до индукционна химиотерапия, съдържаща цитарабин и антрациклин или хипометилиращи агенти. При строго определени индикации се обсъжда и алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки. Идентифицирането на рекурентни цитогенетични/молекулярни аномалии, свързани с определени подтипове на ОМЛ, доведе до включване на генетичните маркери при определяне на терапевтичните решения. Одобрението на няколко нови лекарствени средства в последните години може да промени радикално терапевтичния подход при пациентите с ОМЛ.

Ключови думи: Остра миелоидна левкемия, цитогенетични/молекулярни аномалии, таргетна терапия

Abstract. Acute myeloid leukaemia (AML) is the most common form of acute leukaemia, and its incidence increases with age. Until recently, treatment for patients with AML was limited to induction chemotherapy with cytarabine and anthracycline or hypomethylating agents, and, in some instances, allogeneic hematopoietic stem cell transplant. The identification of recurrent cytogenetic/molecular anomalies associated with different patterns of AML clinical presentation has led to the incorporation of genetic markers in treatment decision-making. The approval of several new therapies for patients with this disease may change practice for patients with AML.

Key words: Acute myeloid leukaemia, cytogenetic/molecular anomalies, new therapies.

ВЪВЕДЕНИЕ

Острата миелоидна левкемия (ОМЛ) е хетерогенно малигнено заболяване на хемопоеичните стволови клетки, характеризиращо се с клонална експанзия на абнормно диференцирани миелоидни прогенитори. В резултат на неконтролируема пролиферация на незрели миелоидни клетки има натрупване на незрели прогенитори (бласти) в костния мозък с потискане на нормалната хемопоеза. Клиничните прояви се характеризират с тежки инфекции, анемия и кожно-лигавична хеморагична диатеза. При някои пациенти може да има екстрамедуларно засягане, включително ан-

гажиране на централната нервна система.¹ Своевременната диагностика и започване на терапия са важни, особено в случаите с развитие на тумор лизис синдром или синдром на дисеминирана интраваскуларна коагулация – синдроми, които могат да доведат до фудрояnten фатален изход.²

Епидемиология.

American Cancer Society съобщава, че през 2018г. в САЩ ще бъдат регистрирани 19,520 нови случая на ОМЛ (10.380 при мъже, 9140 при жени), което представлява 32% от всички случаи на левкемия при възрастни пациенти. ОМЛ се среща по-често при бялата раса, както и в развитите страни. Забо-

леваемостта на ОМЛ нараства с възрастта, като средната възраст на новодиагностицираните пациенти е около 70 години. По-често се среща при мъжете, особено при по-възрастните пациенти. Това вероятно е свързано и с факта, че миелодиспластичния синдром (МДС) се среща по-често при мъжете, а високорисковия МДС най-често трансформира в ОМЛ.³

Патогенеза.

Въпреки че левкемогенезата е все още не напълно изяснен процес, смята се, че ОМЛ произхожда след онкогенна трансформация на хемопоетични стволови клетки или прогенитори, които са придобили характерното за стволовите клетки качество за самообновяване.⁴ Така образуваната левкемична стволова клетка има капацитета за поддържане на малигнения клон. Левкемичните стволови клетки са редки и латентни, което ги прави особено устойчиви на цитотоксична химиотерапия и склонни да отключат рецидив.⁵ Прогениторите, произлизащи от левкемичните стволови клетки, претърпяват допълнителни генетични събития, водещи до кариотипна и молекулярна хетерогенност на левкемичната популация, с множество коекзестиращи, конкурентни клонове в момента на поставянето на диагнозата.⁶⁻⁸

Геномика.

ОМЛ се характеризира с няколко рекурентни мутации, които имат важна роля за биологията и фенотипа на болестта, отговора към лечението, както и риска от последващ рецидив (таблица 1).⁹

Таблица 1. Рекурентни мутации при новодиагностицирани възрастни пациенти с ОМЛ

Мутация	Честота	Прогностично значение
FLT3	20-25% (ITD) и 5-10% (D835 TKD)	По-ниска преживяемост за ITD, неизяснено прогностично значение на D385TKD
NPM1	Около 30%	По-висока преживяемост при липса на висок FLT3-ITD алелен „товар“
CEBPA	Около 10%	По-висока преживяемост (само при биалелност)
KIT	Около 10%	По-ниска преживяемост при CBF- ОМЛ
DNMT3A	Около 20%	Разнопосочни данни за прогностичното значение
IDH1/IDH2	5-15% (IDH1) и 10-20% (IDH2)	Разнопосочни данни за прогностичното значение
NRAS	Около 15%	Разнопосочни данни за прогностичното значение
TET2	5-20%	Разнопосочни данни за прогностичното значение
ASXL1	5-15%	По-ниска преживяемост
RUNX1	5-20%	По-ниска преживяемост
TP53	5-20%	По-ниска преживяемост
ITD- вътрешна тандемна дубликация TKD- тирозин-киназен домейн НК- нормален кариотип CBF- cored binding factor CHIP- клонална хематопоеза с неопределен потенциал		

1. NPM1 (Nucleophosmin 1 или nucleolar phosphoprotein B23 или numatrin)

Генът NPM1 кодира ядрено-цитоплазмен белтък, имащ роля в предотвратяването на агрегацията на ядрените протеин, регулирането на рибозомното

протеиново сглобяване, иницирането на дублиране на центрозоите и регулиране на p53, p19ARF и HDM2. NPM1 участва в контрола на примитивната хематопоеза, а мишки без NPM1 алели развиват синдром, подобен на миелодиспластичния синдром при хората. Транслокациите, включващи

NPM гена, причиняват цитоплазматична дислокация на NPM протеина. NPM1 мутациите се срещат в около една трета от възрастните пациенти с ОМЛ, като повечето от половината от тях са с нормален кариотип (ОМЛ-НК). Често се съпътства от мутации в епигенетични модификатори като ДНК метилтрансферазата 3A (DNMT3A), десет-единадесет транслокационния ген-2 (TET2) и мутации на изоцитратна дехидрогеназа 1/2 (IDH1/2).¹⁰ Доста проучвания потвърдиха, че NPM1 мутациите са независим прогностичен фактор за постигане висок процент на пълен отговор, вкл. че имат благоприятна прогноза при по-млади пациенти с ОМЛ – главно пациенти без FMS-свързани тирозинкиназно 3-вътрешни tandemни дубликационни (FLT3-ITD) мутации.¹¹⁻¹² Последните проучвания установяват, че пациентите с ОМЛ и NPM1 мутация и FLT3-ITD с ниско алелно съотношение могат също да има по-благоприятна прогноза независимо от хромозомния статус. Тази група пациенти не би трябвало рутинно да се насочват за аlogenна трансплантация на хемопоеични стволови клетки (ало-СКТ) при постигане на първа пълна ремисия.¹³⁻¹⁴ Пациентите с NPM1 мутация и съпътстваща FLT3-ITD мутация дори с високо алелно съотношение имат по-добра прогноза от тези, които имат само FLT3-ITD мутация.¹⁵ Съпътстващи DNMT3A и FLT3-ITD мутации при пациенти с ОМЛ и NPM1 мутация са с изключително лоша прогноза.¹⁶ При пациенти в напреднала възраст, наличието на NPM1 мутацията се свързва с постигане на по-висока честота на пълна ремисия въпреки че прогнозата при тях е по-лоша от тази на по-младите пациенти.¹⁷⁻¹⁸ Има и няколко проучвания които не показват по-благоприятни резултати при по-възрастни пациенти с ОМЛ и NPM1 мутация, което отново може да е свързано с различните терапевтични режими.¹⁹

2. СИГНАЛНИ И КИНАЗНИ МУТАЦИИ

В допълнение към NPM1 мутацията, мутации водещи до аберантно активиране и пролиферация на клетъчните сигнални пътища, включващи FLT3, KRAS, NRAS, RPTN11, NF1 и KIT, се срещат в приблизително две трети от случаите с ОМЛ.

• FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3)

FLT3 е трансмембранна лиганд активирана рецепторна тирозинкиназа, която нормално се експресира от хематопоетичните стволови или прогениторни клетки и играе важна роля в ранните стадии както на миелоидното, така и на лимфоидното пролифериране и диференциране. Извънклетъчният лиганд (FLT3 лиганд) свързва и активира FLT3, като по този начин стимулира клетъчната преживяемост, пролиферацията и диференциацията чрез различни сигнални пътища, включително PI3K, RAS и STAT5. Както FLT3-ITD, така и FLT3-TKD мутациите активират FLT3 киназна активност,

което води до пролиферация при ОМЛ. Мутациите на FLT3 обикновено включват вътрешни tandemни дубликации (FLT3-ITD), както и точкова мутация в тирозин киназния домен (FLT3-TKD). Проучванията показват, че FLT3-ITD се свързва с по-висок процент на релапс на болестта, както и с по-лоша обща преживяемост, особено при наличие на високо съотношение на мутантния алелен товар.²⁰⁻²¹ През последните години благодарение на приложението на FLT3 инхибитори прогнозата на тези пациенти е значително подобрена.

• KIT

KIT е протоонкоген, разположен в дългото рамо на хромозома 4 (q11-12) и кодира 145-kDa трансмембранен гликопротеин, който е член на фамилия тип III рецепторни тирозинкинази. Стволовоклетъчният фактор стимулира KIT димеризацията и трансфосфорилирането, като по този начин активира сигнални пътища, които са неразделна част от пролиферацията, диференциацията и преживяването на хемопоеичните стволови клетки. Рецепторната тирозин киназа KIT най-често е мутирала при core-binding factor ОМЛ (CBF-ОМЛ), която се дефинира с наличието на t(8;21) или inv(16)/t(16; 16). Доказано е, че честотата на inv(16)/t(16; 16) при CBF-ОМЛ е по-висока при бялата раса, отколкото при пациентите с китайски и японски произход.²² Основните мутационни нарушения при CBF-ОМЛ най-често засягат KIT екзона 8 и екзона 17. Пациенти с ОМЛ и t(8; 21), както и мутации в KIT екзона 17 имат по-висок риск от рецидив и по-ниска обща преживяемост.²³ Наскоро няколко изследователи доказаха, че при пациенти с ОМЛ, t(8; 21) и KIT мутация се наблюдава по-нисък процент на терапевтичен отговор при релапс на болестта. Прогностичното значение на KIT мутацията при пациенти с ОМЛ и inv(16)/t(16;16) остава неизяснена към момента.²⁴ Данните от актуално проучване показва, че пациенти с t(8; 21) ОМЛ и KIT-D816 мутация постигат по-нисък процент на ремисия, сравнено с пациенти, при които се регистрира „див тип“ KIT.²⁵ Пациентите с CBF-ОМЛ биха могли да имат полза от по-високи дозировки на Cytarabine, за разлика от пациентите с NPM1 мутация, които имат полза ескалацията на дозата на антрациклините.²⁶

3. МУТАЦИИ В ТРАНСКРИПЦИОННИ ФАКТОРИ

Мутациите в транскрипционните фактори се срещат при около 20-25% от пациенти с ОМЛ и включват миелоидни транскрипционни фактори, Runt-свързан транскрипционен фактор 1 (RUNX1) и CCAAT / enhancer свързващ протеин α (CEBPA).

• RUNX1 (Runt-related transcription factor 1)

RUNX1 генът, разположен на дългото рамо на хромозома 21 (q22), е от решаващо значение за

хемопоезата и възникването на хематопоеетични стволови клетки в ембрионалното развитие доказано при миши модели. RUNX1 действа като ключов регулатор на хематопоезата чрез регулиране на различни хематопоеетични гени, включително тези, кодиращи растежните фактори (GM-CSF, MPO, IL3), повърхностните рецептори (TCRA, TCRB, M-CSF рецептор, FLT3), сигнални молекули (CDKN1A, BLK, BCL2) и активатори на транскрипция (STAT3, MYB). RUNX1 мутациите се срещат при около 5% до 10% от пациентите с ОМЛ, главно при тези с вторична ОМЛ след предшестваш МДС. Доста проучвания доказваха, че RUNX1 мутациите са независим прогностичен фактор с лоша прогноза.²⁷⁻²⁸ Наличието на RUNX1 заедно с ASXL1, SF3B1, SRSF2, PHF6 има негативно влияние върху общата преживяемост, докато пациенти с RUNX1 мутирал/IDH2 мутирал имат по-добър изход.²⁷

• **CEBPA (CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha)**

CEBPA се експресира в гранулоцитите, моноцитите и еозинофилите, също така се намира и в хепатоцитите, адипоцитите и пневмоцитите от тип II. Различни проучвания доказват че CEBPA има основно значение в хематопоезата регулирайки диференциацията на гранулоцитите и моноцитите. Мутирал CEBPA ген се среща в 5-14% от пациентите с ОМЛ, предимно при пациенти с ОМЛ и нормален кариотип. Асоциира се с по-добра прогноза. Последните проучвания показват, че по-добра прогноза се наблюдава само при наличие на биалелни CEBPA мутации.²⁹⁻³⁰ Въпреки че процентът на отговор при пациенти с ОМЛ и биалелни CEBPA мутации достига до 90% и 5-годишната обща преживяемост варира между 50 и 70%, рецидивите все още остават основната причина за терапевтичен неуспех. Кумулативната честота за поява на рецидив при пациенти с биалелни CEBPA мутации, лекувани с интензивна химиотерапия след период от 5 години достига до 58%.³¹

4. МУТАЦИИ В ЕПИГЕНЕТИЧНИ МОДИФИКАТОРИ: РЕГУЛАЦИЯ НА ДНК МЕТИЛИРАНЕТО И МОДИФИКАЦИЯ НА ХРОМАТИНА

Откриването на епигенетичните регулатори през последните години разкри нови моменти от патогенезата на ОМЛ. Мутациите на гени като IDH1/2, DNMT3A, TET2, ASXL1 и EZH2, които имат влияние върху ДНК метилирането или хистоновите по-страницационни модификации, могат да послужат като прогностични маркери за стратификация на риска, както и за терапевтичен таргет.³²⁻³⁴

• **IDH1/2 (Isocitrate dehydrogenase 1/2)**

Изоцитрат дехидрогеназите (IDHs) са ензими, участващи в множество метаболитни и епигенетични клетъчни процеси. Изоцитрат дехидрогеназа 1 и 2 (IDH1 и IDH2) са ключови метаболитни ензи-

ми, които превръщат изоцитрата в α -кетоглутарат (α KG). Мутациите в гените, кодиращи IDH1 и IDH2 включват IDH1-R132, IDH2-R140 и IDH2-R172. Рядко се наблюдава едновременно наличие на IDH1 и IDH2 мутациите. IDH1-R132 или IDH2-R140 се срещат при пациенти с ОМЛ-НК и напреднала възраст, доста често едновременно с NPM1 мутация.³⁵ IDH2-R172 представлява отделна подгрупа и има различен профил на ДНК метилиране.³⁶ Експериментални изследвания доказват, че IDH1/2 възникват в клонове, които сами по себе не могат да индуцират левкемична трансформация.³⁶ Прогностичното значение на IDH1/2 мутациите при пациенти с ОМЛ е все още недостатъчно изяснено с доста противоречиви литературни данни до момента.

• **DNMT3A (DNA Methyltransferase 3 Alpha), TET2 (Tet methylcytosine dioxygenase 2) и ASXL1 (ASXL Transcriptional Regulator 1)**

ДНК метилирането на CpG динуклеотидите играе важна роля в регулирането на генната експресия. ДНК метилирането (mC) се извършва с помоща на ДНК метилтрансферази -3A и -3B (DNMT3A и DNMT3B) и се поддържа от DNMT1. Семейството протеини от Ten-Eleven-Translocation (TET) (TET1, -2, -3) могат да окислят mC до хидроксиметилцитозин (hmC) 1, което да доведе до загуба на ДНК метилиране при деленето на клетките. По този начин действието на тези две семейства протеини може да доведе до противоположни резултати: хиперметилиране или деметилиране. Мутациите в епигенетичните регулатори включват и DNMT3A, TET2 и ASXL1, познати като DTA мутации. Тези мутации се срещат най-често при хора, които имат възрастово-свързана клонална хематопоеза. Все още не е постигнат консенсус по отношение на прогностичното значение на DNMT3A мутацията. Някои проучвания доказват, че е лош прогностичен фактор³⁷, докато други не успяват да потвърдят това твърдение.³⁸ Пациенти с ОМЛ и съчетано наличие на NPM1, FLT3-ITD и DNMT3a мутации имат изключително лоша прогноза.³⁹ ELN и NCCN рисковите класификационни системи определят ASXL1 мутациите като такива с неблагоприятен риск. Независимо от това, мутациите на ASXL1 не трябва да се считат за неблагоприятен прогностичен маркер ако се наблюдават при пациенти с ОМЛ с добра прогноза.⁴⁰ Резултати от проучване, включващо 482 пациента с ОМЛ на възраст под 65 години, показват, че DTA мутациите остават откриваеми дори по време на постигнат пълен отговор.⁴¹

5. РНК СПЛАЙСИНГ. ФАКТОР МУТАЦИИ

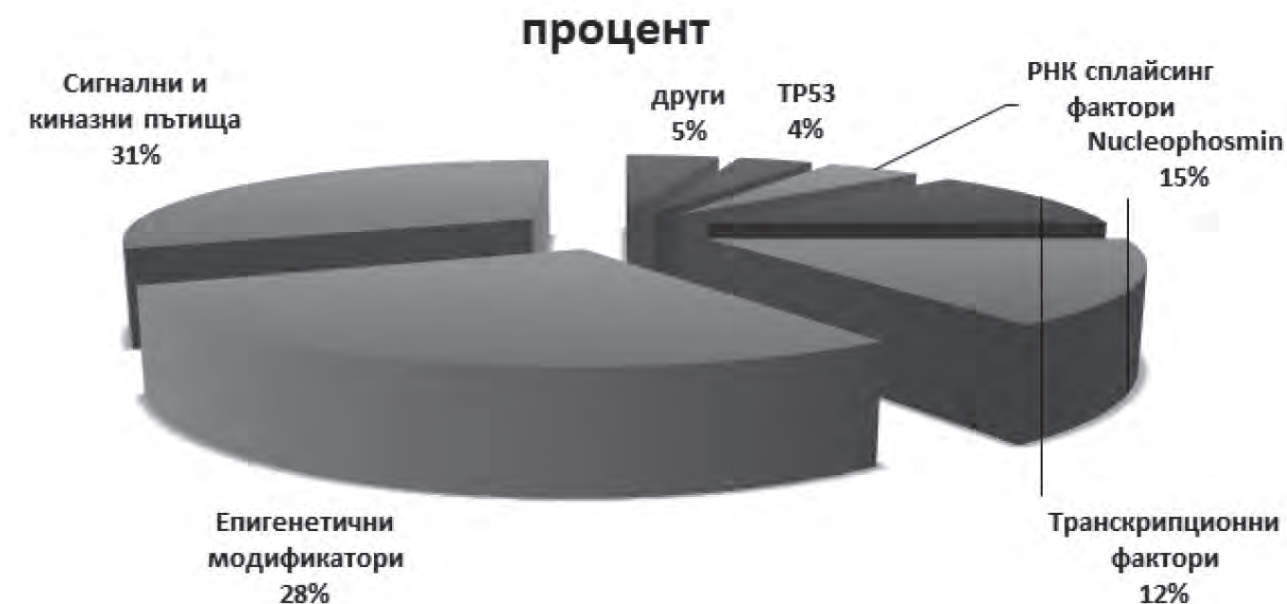
Мутациите в сплайсинг факторите на РНК се срещат при около 10% от пациентите с ОМЛ. Това са мутации, отговорни за регулация на гените за РНК сплайсинга (SF3B1, SRSF2, U2AF1 и ZRSR2). Те

могат да доведат до атипичен спайлсинг, да засегнат по този начин транскриптомите и протеозомите на клетката. Най-често тези мутации се асоцират с по-напреднала възраст, непролиферативна ОМЛ, ниска степен на отговор към стандартното лечение и по-лоша преживяемост.⁴²

6. МУТАЦИИ В ТУМОРНИ СУПРЕСОРНИ ГЕНИ TP53

TP53 е туморен супресорен ген и неговото инактивиране е важно събитие за неограничен растеж на туморните клетки. TP53 мутациите се откриват при около 8% от пациентите с ОМЛ и са асоциирани с комплексна цитогенетика, терапевтично-свързана ОМЛ, химиорезистентност, висок процент на рецидив и лоша преживяемост.^{38,43}

Фиг. 1. Разпределение на рекурентните мутации при ОМЛ по функционални групи



ДИАГНОЗА

За поставяне на диагнозата ОМЛ е необходимо идентификация на > 20% миелоидни бласти (напр. миелобласти, монобласти или мегакариобласти) с морфологична оценка на периферната кръв и/или костен мозък. Изключение от това правило се допуска при изолирана екстремедуларна болест (миелоиден сарком) или по-нисък процент бласти, но с доказване на рекурентни кариотипни / молекулярни мутации, патогномонични за ОМЛ.

СТРАТИФИКАЦИЯ НА РИСКА

Изходът от ОМЛ е изключително хетерогенен и зависи както от свързаните с пациента, така и от свързаните със заболяването фактори. Определянето на риска при пациентите с ОМЛ е изключително важно, тъй като определя постремисионното терапевтично поведение.

Таблица 2. Стратификация на риска при ОМЛ44

Риск	Благоприятен	Интермедиерен	Лош
Цитогенетичен анализ	t(8;21)(q22;q22.1) за RUNX1-RUNX1T1, и inv(16)(p14.1q22) or t(16;16) (p13.1;q22) за CBFB-MYH11	t(9;11)(p21.3;q23.3) за MLL3-KMT2A, и ЦГ. аномалии неклаифицирани като благоприятни или лоши and	t(6;9)(p23;q34.1) за DEK-NUP214; t(v;11q23.3) за KMT2A реанижиран; t(9;22)(p34.1;q11.2) за BCR-ABL1; inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2) за GATA2 и MECOM (EVI1); -5 or del(5q), -7, and-17/abn(17p); комплексен кариотип и монозомен кариотип

Молекулярно-генетични изследвания	Мутирал NPM1 без FLT3-ITD о или с FLT3-ITD нисък алелен товар и биалелно мутация на СЕВРА	Мутирал NPM1и FLT3-ITD висок алелен товар, и wild-type NPM1 без FLT3-ITD или с FLT3-ITD нисък алелен товар (без лоши генетични нарушения)	Wild-type NPM1 и FLT3-ITD висок алелен товар, мутирал RUNX1, мутирал ASXL1, и мутирал TP53.
-----------------------------------	---	---	---

ЛЕЧЕНИЕ

Въпреки напредъкът в познанието на молекулярната хетерогенност и патогенеза на ОМЛ терапевтичният прогрес е скромнен. Стандартната терапия включва индукционна химиотерапия, базирана на Cytarabine, постремисионна терапия и хемопоеична трансплантация на стволови клетки (СКТ). Петгодишната обща преживяемост (OS) около 40% при пациенти на възраст под 60 години. За пациентите над 60 годишна възраст (мнозинството от случаите с ОМЛ) 5-годишната OS е около 10 ~ 20%.⁴⁴ Съвременното задълбочено познание за молекулярно-генетичната характеристика на ОМЛ позволи разработването и клиничното проучване на нови таргетни лекарствени средства за лечение на ОМЛ.

1. VOLASERTIB

Volasertib (известен още като BI 6727), одобрен през 2014г. при пациенти с ОМЛ и със статут на лекарство „сирак“, е малък молекулярен инхибитор на поло-подобните кинази (PLKs), по-специално PLK-1. Инхибирането на свръхекспресията на PLK1 в клетъчни линии с ОМЛ може да доведе до дезорганизация в съзряването на центрозоми и цитокинеза по време на митоза с последващ ефект на клетъчна апоптоза.⁴⁵ Резултатите от Фаза II клинично изпитване, което сравнява комбинация от Volasertib + ниска доза Cytarabin срещу ниска доза Cytarabin, потвърждава по-голямата клинична ефикасност при пациенти, лекувани с комбинацията. Статистически значимо различие в постигането на пълен отговор (30 срещу 13.3%, $P=0.052$), средна свободна от събитие преживяемост (5.6 срещу 2.3 месеци, $P=0.021$) и средна OS (8 срещу 5,2 месеца, $P=0.047$).⁴⁶

2. FLT3 ИНХИБИТОРИ

• Sorafenib

Sorafenib е мощен мултикиназен инхибитор от първо поколение с активност срещу FLT3/ITD рецептора. Проведени са клинични изпитвания при пациенти с ОМЛ като единичен агент или в комбинация с химиотерапия. SORAML е плацебо контролирано рандомизирано изпитване с добавяне на Sorafenib към Daunorubicin и Cytarabin (7+3) при 267 новодиагностицирани пациенти на възраст

между 18 и 60 години. Добавянето на Sorafenib води до значително удължаване на 3-годишната свободна от събитие преживяемост (40 срещу 22%, $P=0.013$) и преживяемостта без релапс (56 срещу 38%, $P = 0.017$), но без подобрене в OS и пълния отговор.⁴⁷ Друго рандомизирано изпитване при 201 пациенти (възраст 61-80 год.) не е показало подобрене в посочените по-горе статистически показатели, дори показва по-висока ранна смъртност (17 срещу 7%, $P = 0.052$) спрямо плацебо групата.⁴⁸

• Midostaurin (PKC412)

Midostaurin е първо поколение мултитаргентен лекарствен продукт, който инхибира FLT3, c-kit, PDGFR, VEGFR и протеин киназата C.⁴⁹ Като орален лекарствен продукт той подобрява отговора към индукционната терапия и представлява добра възможност да послужи като „мост“ за FLT3 (+) ОМЛ пациенти към алогенна трансплантация.⁵⁰ В две фаза IIB клинични изпитвания с приложение на Midostaurin като единичен агент при пациенти с ОМЛ и мутирал FLT3 и пациенти с FLT3-„див тип“, се регистрира намаление на процента бласти $\geq 50\%$, но с рядко и транзиторно постигане на пълен отговор.⁵¹⁻⁵² В международно многоцентрово рандомизирано фаза III клинично изпитване (RATIFY), проведено при 717 пациенти, се регистрира значително подобрене на OS и свободната от събитие преживяемост за пациентите с ОМЛ и FLT3 мутация след добавяне на Midostaurin към стандартната индукционна терапия. Ползата от Midostaurin е била най-значима при пациенти, трансплантирани по време на първа ремисия.⁵³

• Quizartinib (AC220)

Quizartinib инхибира селективно FLT3/STK1, CSF1R/FMS, SCFR/KIT и PDGFR. Фаза I клинично изпитване при пациенти с релапсирала/рефрактерна ОМЛ е определила максималната поносима доза от 200 mg на ден с дозо-зависима токсичност на удължаване на QT интервала, степен 3.⁵⁴ Впоследствие няколко фаза II клинични изпитвания с по-ниски дозировки на медикамента показват комбиниран пълен отговор, (44 до 54%) и честота на общия отговор (61 до 72%) при FLT3-ITD (+) пациенти.⁵⁵⁻⁵⁷

• **Crenolanib (CP868596)**

С цел постигане на по-добър ефект, максимална поносимост и продължителност на отговора, се създават нови FLT3 инхибитори като Crenolanib – мощен, селективен и преодоляващ резистентност. Crenolanib е селективен инхибитор, активен срещу FLT3-ITD и FLT3-TKD D835 мутациите, докато повечето FLT3 инхибитори действат само срещу FLT3-ITD.⁵⁸

• **Gilteritinib (ASP2215)**

Потентен като Crenolanib, Gilteritinib е селективен следващо поколение FLT3 инхибитор с активност срещу двете (FLT3-ITD и FLT3-TKD) мутации. Предклинично проучване, сравняващо Gilteritinib с четири други FLT3 инхибитора, използвайки имуноблот доказва, че ефикасността *in vitro* е равна или по-голяма от тази на другите лекарствени средства (Midostaurin, Sorafenib, Quizartinib и Crenolanib). Трябва да се спомене, че има по-слаба миелосупресия (най-вероятно поради по-малка активност срещу c-kit) спрямо Quizartinib и Gilteritinib.⁵⁹

• **Lestaurtinib (CEP-701)**

Lestaurtinib (CEP-701) е орален първа генерация FLT3 инхибитор, който е и мощен JAK2 инхибитор.⁶⁰⁻⁶¹ Рандомизирана оценка от проучванията UK AML 15 и AML 17 не потвърждава статистически значима полза при комбиниране на Lestaurtinib със стандартна химиотерапия за новодиагностицирани ОМЛ пациенти под 60 години.

3. IDH ИНХИБИТОРИ

IDH (изоцитрат дехидрогеназа) е ензим, катализиращ окислителното декарбоксилиране на изоцитрат към алфа-кетоглутарат (α -KG), а ензимът TET2 заедно с α -KG водят до преобразуване на 5-метилцитозин (5mC) до 5-хидроксиметилцитозин (5hmC). Последният се явява промотор на ДНК деметилирането. Мутантните IDH (mIDH) ензими превръщат α -KG в (R) -2-HG, което води до конкурентно инхибиране на α -KG-зависимите ензими вкл. и на TET2. Инактивираща мутация на TET2 може да доведе до загуба на функцията ѝ. По този начин както IDH, така и TET2 мутациите водят до свръхнатрупване на 5mC и ДНК хиперметилиране с риск от развитие на ОМЛ.

Независимо, че прогностичната роля на IDH мутациите не е точно изяснена през последните години се разработват инхибитори срещу тези мутации. От тях към момента във фаза на експериментални проучвания са AG-221, AG-120, AG-881 и IDH305. AG-221 и AG-120 са показали ефективност и са включени в клинични проучвания. Първият IDH2 инхибитор AG-221 е разработен за инхибиране на мутантния IDH2, води до намаляване нивата

на 2HG и възстановяване активността на TET2.⁶² През 2015г. се обявени резултатите от Фаза I клинично проучване с ескалация на дозата на AG-221, показващи общ отговор при 41% и пълен отговор при 18% от пациенти с рефрактерна/ релапсирала ОМЛ.⁶³

4. HDAC ИНХИБИТОРИ

Хистонните модификации включват ацетилиране и метилиране, които са обратимо медирирани от хистоновите ацетилтрансферази, HDAC, HMT и хистоновите деметилази. Ацетилирането на хистоните увеличава достъпността на транскрипционни фактори към гените и следователно промотира генната експресия. Обратно, деацетилирането води до транскрипционно потискане и нарушена хемопоетична диференциация, която може да бъде инхибирана от HDAC инхибитори. Когато HDAC инхибиторите се използват за лечение на МДС и ОМЛ като монотерапия, резултатите са доста скромни. Резултатите от клиничните изпитвания, в които HDAC инхибиторите се комбинират с други лекарствени продукти са разочаровачни и все още остава предизвикателството да се намери оптималния комбиниран режим на HDACi с друг лекарствен продукт.⁶⁴⁻⁶⁸

5. DNMT ИНХИБИТОРИ

ДНК метилирането се катализира от DNMT. Рекурентни мутации в DNMT3A се откриват в 6 до 36% от пациентите с ОМЛ.⁶⁹ Хипометилиращите агенти, инхибиращи DNMT са възможност за лечение на възрастни пациенти, които не могат да толерират интензивна химиотерапия, тъй като имат пониска токсичност и еднаква ефикасност. Както е известно, Azacitidine (5-Aza) и Decitabine са двата хипометилиращи агенти, одобрени за лечение на тази група пациенти. В доклад от J. Ossenkoppele и сътрудници се съобщава за удължаване на свободната от болест преживеемост при пациенти с ОМЛ, преминали интензивна химиотерапия и останали на поддържащо лечение с Azacitidine.

6. ИМУНОТЕРАПИЯ ПРИ ОМЛ

Имуноterapia при малигнените заболявания има за цел да стимулира имунната система в борбата срещу неоплазията. Новите видове имуноterapiи за лечение на ОМЛ включват моноклонални антитела (MKA), CAR T-клетки и Checkpoint инхибитори.

• **Моноклонални антитела**

В момента най-окуражаващи таргети при ОМЛ са CD33 и CD123, като и двата са експресирани както от левкемичните клетки, както и от нормалните хемопоетични клетки. Поради извънтуморните

ефекти (главно аплазия и неутропения) е относително трудно е да се намери идеален таргет. Първото анти-CD33 МКА, одобрено от FDA през 2000 г., бе оттеглено от пазара през 2010 г. поради ранна токсичност и липсата на клинична полза. Независимо от това, последните проучвания показват подобрена преживяемост при пациенти с благоприятен/интермедиерен риск.⁷⁰⁻⁷¹ Освен това, комбинацията Azacitidine+анти-CD33 във фаза II проучвания показва окуражаващ процент на постигната ремисия и преживяемост при пациенти в напреднала възраст.⁷² Други лекарства като CSL362 и SL-401, насочени срещу CD123 към момента са във фаза на различни клинични проучвания.⁷³

• CAR T-клетки

Няколко проучвания са доказали, че при миши модели използването на анти-CD123, CAR T-клетки и анти-CD33 показва антилевкемична активност, но

придружена с тежка миелоаблация.⁷⁴⁻⁷⁵ Тъй като терапията с CAR T-клетки се свързва с изразена противотуморна ефикасност и пролонгирана миелоаблация, се предполага, че последваща трансплантация на хемопоеични стволови клетки е задължителна.

• Checkpoint инхибитори

Двата основни checkpoint рецептори PD1 и CTLA4 са използвани като таргети в предклинични модели с ОМЛ.⁷⁷ Една изследователска група е лекувала трима релапсирани пациенти с ОМЛ след алогенна-СКТ с PD-1 инхибитор Nivolumab. Сред тези трима пациенти единия е постигнал пълен отговор, другия стабилна болест, а третият е бил без отговор.⁷⁸ Има текущи фаза II клинични изпитвания с използване на nivolumab или в комбинация с CTLA4 при пациенти с ОМЛ след алогенна-СКТ (NCT02532231, NCT02846376, NCT02464657).

Табл. 3. Таргетна терапия при ОМЛ

Таргети	Лекарствени средства
PLKs	Volasertib
FLT3	Sorafenib Midostaurin (PKC412) Quizartinib (AC220) Crenolanib (CP868596) Gilteritinib (ASP2215) Lestaurtinib (CEP-701)
DNMT	Azacitidine (5-Aza) Decitabine Guadecitabine (SGI-110) Sapacitabine (CYC682)
IDH2	AG-221
IDH1	AG-120
HDAC	Vorinostat Entinostat
BET	OTX015
DOT1L	Pinometostat (EPZ-2676)
LSD1	GSK2879552
CD33	GO SGN-33A CD33 CART
CD123	CSL362 SL-401 CD123 CART
PD-1	Nivolumab
CTLA4	Ipilimumab

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечението на ОМЛ остава трудно и се явява терапевтично предизвикателство дори през 21-ви век независимо от големия напредък в познание-то за молекулярните механизми и стратификация на риска. Остават много нерешени въпроси, свързани с приложението на новите лекарствени средства, сериозната им токсичност и потенциална ефективност. Необходими са продължаващи усилия за постигане на желаните терапевтични резултати при пациентите с ОМЛ.

Адрес за кореспонденция

Д-р Васко Гръкланов

УМБАЛ "Св. Георги" гр. Пловдив, МУ – Пловдив

Клиника по клинична хематология

mail: dr.grklanov@yahoo.com

+359895716528

БИБЛИОГРАФИЯ

- Ganzel C, Manola J, Douer D, et al. Extramedullary disease in adult acute myeloid leukemia is common but lacks independent significance: analysis of patients in ECOG-ACRIN Cancer Research Group trials, 1980–2008. *J Clin Oncol* 2016; 34: 3544–53.
- Zuckerman T, Ganzel C, Tallman MS, Rowe JM. How I treat hematologic emergencies in adults with acute leukemia. *Blood* 2012; 120: 1993–2002.
- Cancer Facts & Figures 2018. American Cancer Society. Available at <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>. Accessed: November 29, 2018.
- Lane SW, Gilliland DG. Leukemia stem cells. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 71–76.
- Pollyea DA, Jordan CT. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2017; 129: 1627–35.
- Shlush LI, Mitchell A, Heisler L, et al. Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* 2017; 547: 104–08.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2013; 368: 2059–74.
- Welch JS, Ley TJ, Link DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012; 150: 264–78.
- Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366: 1079–89.
- Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* 2016; 127: 29–41.
- DiNardo DC, JE C. In: Tallman MS, McCrear KR, Sonali S, Crowther MA, editors. *Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications*. Hematology; Washington: American Society of Hematology. 2016. p. 348–55.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106: 3733–9.
- Pratcorona M, Brunet S, Nomdedeu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. *Blood* 2013; 121: 2734–8.
- Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood* 2009; 114: 3024–32.
- Versluis J, In 't Hout FE, Devillier R, van Putten WL, Manz MG, Vekemans MC, et al. Comparative value of post-remission treatment in cytogenetically normal AML subclassified by NPM1 and FLT3-ITD allelic ratio. *Leukemia* 2017; 31: 26–33.
- Loghavi S, Zuo Z, Ravandi F, Kantarjian HM, Bueso-Ramos C, Zhang L, et al. Clinical features of de novo acute myeloid leukemia with concurrent DNMT3A, FLT3 and NPM1 mutations. *J Hematol Oncol* 2014; 7: 74.
- Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 596–604.
- Ostronoff F, Othus M, Lazenby M, Estey E, Appelbaum FR, Evans A, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in the absence of FLT3-internal tandem duplication in older patients with acute myeloid leukemia: a SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council report. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1157–64.
- Lazenby M, Gilkes AF, Marrin C, Evans A, Hills RK, Burnett AK. The prognostic relevance of FLT3 and NPM1 mutations on older patients treated intensively or non-intensively: a study of 1312 patients in the UK NCRI AML16 trial. *Leukemia* 2014; 28: 1953–9.
- Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, Kobbe G, Casper J, Ringhoffer M, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* 2014; 124: 3441–9.
- Wang Y, Xu Y, Li S, Liu J, Xing Y, Xing H, et al. Targeting FLT3 in acute myeloid leukemia using ligand-based chimeric antigen receptor-engineered T cells. *J Hematol Oncol* 2018; 11: 60.
- Wei H, Wang Y, Zhou C, Lin D, Liu B, Liu K, et al. Distinct genetic alteration profiles of acute myeloid leukemia between Caucasian and eastern Asian population. *J Hematol Oncol* 2018; 11: 18.
- Qin YZ, Wang Y, Xu LP, Zhang XH, Chen H, Han W, et al. The dynamics of RUNX1-RUNX1T1 transcript levels after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predict relapse in patients with t (8;21) acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2017; 10: 44.
- Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrozek K, Chen H, Kittles RA, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv (16) and t (8;21): a Cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3904–11.
- Gong BF, Tan YH, Liao AJ, Li J, Mao YY, Lu N, et al. Impact of KIT D816 mutation on salvage therapy in relapsed acute myeloid leukemia with t (8; 21) translocation. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2018; 39: 460–4. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.06.004>.
- Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al. A randomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 study. *Blood* 2011; 117: 2366–72.
- Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia* 2016; 30: 2160–8.
- Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, Zimmermann AS, Rock J, Paschka P, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1364–72.
- Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CA, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood* 2011; 117: 2469–75.
- Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113: 3088–91.
- Schlenk RF, Taskesen E, van Norden Y, Krauter J, Ganser A, Bullinger L, et al. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood* 2013; 122: 1576–82.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462: 739–44.
- Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 2010; 18: 553–67.
- Hackl H, Astanina K, Wieser R. Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2017; 10: 51.
- Abbas S, Lughart S, Kavelaars FG, Schelen A, Koenders JE, Zeilemaker A, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood* 2010; 116: 2122–6.
- Marcucci G, Mahary K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2348–55.
- Yuan XQ, Peng L, Zeng WJ, Jiang BY, Li GC, Chen XP. DNMT3A R882 mutations predict a poor prognosis in AML: a meta-analysis from 4474 patients. *Medicine* 2016; 95: e3519.
- Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stolzle A, Spath D, Kuendgen A, et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML study group (AMLSG). *Blood* 2013; 121: 4769–77.
- Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2016; 374: 2209–21.
- Micol JB, Duployez N, Boissel N, Petit A, Geffroy S, Nibourel O, et al. Frequent ASXL2 mutations in acute myeloid leukemia patients with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 chromosomal translocations. *Blood* 2014; 124: 1445–9.
- Rothenberg-Thurley M, Amler S, Goerlich D, Kohnke T, Konstantin NP, Schneider S,

- et al. Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32:1598–608.
42. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125:1367–76.
 43. Devillier R, Mansat-De Mas V, Gelsi-Boyer V, Demur C, Murati A, Corre J, et al. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes. *Oncotarget*. 2015;6:8388–96.
 44. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129:424–47.
 45. Giles FJ. New drugs in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2002;4:369–74.
 46. Döhner H, Lübbert M, Fiedler W, Fouillard L, Haaland A, Brandwein JM, et al. Randomized, phase 2 trial of low-dose cytarabine with or without volasertib in AML patients not suitable for induction therapy. *Blood*. 2014;124:1426–33.
 47. Röllig C, Serve H, Hüttmann A, Noppeney R, Müller-Tidow C, Krug U, et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:1691–9.
 48. Serve H, Krug U, Wagner R, Sauerland MC, Heinecke A, Brunnberg U, et al. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 2013;31:3110–8.
 49. Stein EM, Tallman MS. Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood*. 2016;127:71–8.
 50. Gallogly MM, Lazarus HM. Midostaurin: an emerging treatment for acute myeloid leukemia patients. *J Blood Med*. 2016;7:73–83.
 51. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105:54–60.
 52. Fischer T, Stone RM, DeAngelo DJ, Galinsky I, Estey E, Lanza C, et al. Phase IIB trial of oral midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *J Clin Oncol*. 2010;28:4339–45.
 53. Stone RM, Mandrekas SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation. *N Engl J Med*. 2017;377:454–64.
 54. Levis M. Quizartinib for the treatment of FLT3/ITD acute myeloid leukemia. *Future Oncol*. 2014;10:1571–9.
 55. Cortes JE, Perl AE, Dombret H, Kayser S, Steffen B, Rousselot P, et al. Final results of a phase 2 open-label, monotherapy efficacy and safety study of quizartinib (AC220) in patients ≥60 years of age with FLT3 ITD positive or negative relapsed/refractory acute myeloid leukemia (ASH annual meeting abstracts). *Blood*. 2012;120:Abstract 48.
 56. Levis MJ, Perl AE, Dombret H, Döhner H, Steffen B, Rousselot P, et al. Final results of a phase 2 open-label, monotherapy efficacy and safety study of quizartinib (AC220) in patients with FLT3-ITD positive or negative relapsed/ refractory acute myeloid leukemia after second-line chemotherapy or hematopoietic stem cell transplantation (ASH annual meeting abstracts). *Blood*. 2012;120:Abstract 673.
 57. Cortes JE, Tallman MS, Schiller G, Trone D, Gammon G, Goldberg S, et al. Results of a phase 2 randomized, open-label, study of lower doses of quizartinib (AC220; ASP2689) in subjects with FLT3-ITD positive relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) (ASH annual meeting abstracts). *Blood*. 2013;122:Abstract 494.
 58. Smith CC, Lasater EA, Lin KC, Wang Q, McCreery MQ, Stewart WK, et al. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111:5319–24.
 59. Lee LY, Hernandez D, Rajkhowa T, Smith SC, Raman JR, Nguyen B, et al. Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood*. 2017;129:257–60.
 60. Hexner EO, Serdikoff C, Jan M, Swider CR, Robinson C, Yang S, et al. Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111:5663–71.
 61. Hexner EO, Mascarenhas J, Prchal J, Roboz GJ, Baer MR, Ritchie EK, et al. Phase I dose escalation study of lestaurtinib in patients with myelofibrosis. *Leukemia Lymphoma*. 2015;56:2543–51.
 62. Yen K, Travins J, Wang F, David MD, Artin E, Straley K, et al. AG-221, a first-in-class therapy targeting acute myeloid leukemia harboring oncogenic IDH2 mutations. *Cancer Discovery*. 2017;7:478–93.
 63. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Goerlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128:686–98.
 64. Garcia-Manero G, Tambaro FP, Bekele NB, Yang H, Ravandi F, Jabbour E, et al. Phase II trial of vorinostat with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. 2012;30:2204–10.
 65. Lübbert M, Kuendgen A. Combining DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition to treat acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome: achievements and challenges. *Cancer*. 2015;121:498–501.
 66. Kirschbaum M, Gojo I, Goldberg SL, Bredeson C, Kujawski LA, Yang A, et al. A phase 1 clinical trial of vorinostat in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2014;167:185–93.
 67. Issa JP, Garcia-Manero G, Huang X, Cortes J, Ravandi F, Jabbour E, et al. Results of phase 2 randomized study of low-dose decitabine with or without valproic acid in patients with myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia. *Cancer*. 2015;121:556–61.
 68. Prebet T, Sun Z, Figueroa ME, Ketterling R, Melnick A, Greenberg PL, et al. Prolonged administration of azacitidine with or without entinostat for myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes: results of the US leukemia intergroup trial E1905. *J Clin Oncol*. 2014;32:1242–8.
 69. Celik H, Mallaney C, Kothari A, Ostrander EL, Eultgen E, Martens A, et al. Enforced differentiation of Dnmt3a-null bone marrow leads to failure with c-Kit mutations driving leukemic transformation. *Blood*. 2015;125:619–28.
 70. Lichtenegger FS, Krupka C, Köhnke T, Subklewe M. Immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Semin Hematol*. 2015;52:207–14.
 71. Hills RK, Castaigne S, Appelbaum FR, Delaunay J, Petersdorf S, Othus M, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2014;15:986–96.
 72. Nand S, Othus M, Godwin JE, Willman CL, Norwood TH, Howard DS, et al. A phase 2 trial of azacitidine and gemtuzumab ozogamicin therapy in older patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122:3432–9.
 73. Lee EM, Yee D, Busfield SJ, McManus JF, Cummings N, Vairo G, et al. Efficacy of an Fc-modified anti-CD123 antibody (CSL362) combined with chemotherapy in xenograft models of acute myelogenous leukemia in immunodeficient mice. *Haematologica*. 2015;100:914–26.
 74. Kenderian S, Ruella M, Shestova O, Klichinsky M, Aikawa V, Morrisette J, et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29:1637–47.
 75. Pizzitola I, Anjos-Afonso F, Rouault-Pierre K, Lassailly F, Tettamanti S, Spinelli O, et al. Chimeric antigen receptors against CD33/CD123 antigens efficiently target primary acute myeloid leukemia cells in vivo. *Leukemia*. 2014;28:1596–605.
 76. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–64.
 77. Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood*. 2009;114:1545–52.
 78. Albrink J, Inselmann S, Sauer T, Schliemann C, Altwater B, Kailayangiri S, et al. PD-1 checkpoint blockade in patients with relapsed AML after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2017;52:317–20.

ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ: НОВИ ЛЕКАРСТВЕНИ ПРОДУКТИ ПРОМЕНЯТ ИЗЦЯЛО ДОСЕГАШНОТО ТЕРАПЕВТИЧНО ПОВЕДЕНИЕ

(АНАЛИЗ НА КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ОТ ПОСЛЕДНИТЕ 5 Г)

Горанов С.¹, Горанова – Маринова В.^{1,2}

1 – Секция Хематология, МФ, МУ Пловдив

2 – Клиника по хематология, УМБАЛ „Св Георги“ Пловдив

CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – NEW DRUGS REPLACE THE CURRENT STANDARD

REVIEW OF THE CLINICAL TRIALS IN THE LAST 5 YEARS

Goranov S.¹, Goranova-Marinova V.^{1,2}

1 – Hematology Section, Medical University – Plovdiv

2 – Clinic of Clinical Hematology, UMBAL “Sv. Georgi”-Plovdiv

Резюме. Със своята бавна еволюция хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е класически пример за т.нар индолентни неходжкинови лимфоми, към чиито първично хематогенни форми принадлежи. Разгадаването на няколко възлови патогенетични звена в биологията на заболяването доведе до създаването на нови лекарствени продукти с принципно различен механизъм на действие. Терапевтична мишена първоначално бе CD20, който свързва и активира В-клетъчния рецептор (BCR). BCR отключва каскада от сигнали за киназни системи, които конвергират до критичните етапи – активация на Bruton-тирозин киназата (BTK) и фосфоинозитол-3-киназите (PI3Ks). Това предизвика създаването на лекарствени продукти – инхибитори на BCR с първи представители Ibrutinib и Idelalisib. Обстоятелството, че малигнените клетки експресират антиапоптоичния протеин BCL-2 на свой ред доведе до създаването на високоселективни BCL-2 инхибитори (Venetoclax). Новите лекарствени продукти не само увеличиха терапевтичните възможности при ХЛЛ, но получените резултати от редица проучвания фаза III показват непозната досега ефективност/ефикасност, вкл. MRD(-) ремисии, както като втора и последваща, така и като първа линия лечение. При почти припокриващи се индикации, близки терапевтични резултати, както и някои непотвърдени ползи от опитите за комбинираното им приложение, вкл с МКА, терапевтичният алгоритъм при ХЛЛ е обект на динамични промени. Явно за най-подходящия избор ще играят роля не само генетичния профил, но и строго индивидуалните характеристики на пациента (възраст, коморбидност, предишно лечение, странични ефекти на новите продукти). Обзорът разглежда съвременната риск-стратификация, резултатите от лечението с новите лекарствени продукти МКА, BCR и BCL-2 инхибитори на базата на анализ от 22 клинични проучвания с над 7600 пациенти като първа и втора линия, както и сегашната терапевтична стратегия при пациентите с ХЛЛ.

Ключови думи: хронична лимфоцитна левкемия, лечение, имунохимиотерапия, BCR и BCL-2 инхибитори

Abstract. With its slow evolution, chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a classic example of indolent non-Hodgkin's lymphoma to which its primary hematogenic forms belong. Explaining several key pathogenetic aspects in the biology of the disease has led to the development of new medicinal products with a fundamentally different mechanism of action. CD20 was initially a therapeutic target that binds and activates the B cell receptor (BCR). BCR unlocks a cascade of downstream signals for kinase systems that converge to the critical processes – the activation of Bruton-tyrosine kinase (BTK) and phosphoinositol-3-kinases (PI3Ks). This has led to the development of BCR inhibitor drugs with the first agents being Ibrutinib and Idelalisib. The fact that malignant cells express the anti-apoptotic protein BCL-2 in turn led to the introduction of highly selective BCL-2 inhibitors (Venetoclax). The implementation of these new drugs not only expanded the therapeutic options of CLL, but the

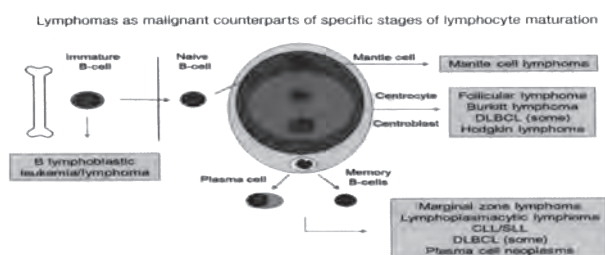
results of a number of Phase III studies have shown unseen so far effectiveness / efficacy, MRD (-) remissions, both as second and subsequent, as well as first line treatment. With almost overlapping indications, close therapeutic outcomes, and some unconfirmed benefits from their combined use the CLL therapeutic algorithm is a subject to dynamic changes. Apparently, the most appropriate choice will depend not only on the genetic profile but also on the strictly individual characteristics of the patient (age, comorbidities, previous treatment, side effects of new products, etc.) This review discusses the contemporary risk stratification, the results of treatment with new drugs – monoclonal antibodies, BCR and BCL-2 inhibitors, as first and => second line along with current therapeutic strategy in CLL, based on 22 clinical trials with more than 7600 patients.

Key word: chronic lymphocytic leukemia, immunochemotherapy, BCR and BCL-2 inhibitors

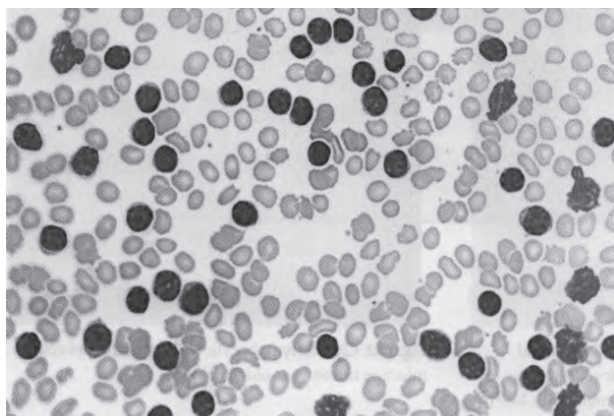
ОБЩИ ДАННИ

Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е малигнена хемопатия, дължаща се на неконтролируема клонална пролиферация и акумулация от относително незрели и имунно непълноценни лимфоцити в периферната кръв, лимфните възли, слезката и костния мозък. Те произхождат от маргиналната зона на лимфните възли, имат нисък пролиферативен индекс и по-дълга преживяемост, поради изключване на апоптозата (програмирана клетъчна смърт) (фиг. 1 и 2). С бавната си и протрахирана еволюция ХЛЛ е класически пример за т.нар индолентни неходжкинови лимфоми, към чиито първично хематогенни форми принадлежи. ХЛЛ е сред най-честите малигнени кръвни заболявания – 30% от всички левкемии и заболяваемост 3-5/100 000 население. Боледуват лица предимно в средна и напреднала възраст, при съотношение М: Ж /2: 1. ХЛЛ е най-честата хронична левкемия в Европа и Америка и рядко заболяване в близкия и далечния Изток.

Фиг. 1. Произход на В-клетъчните НХЛ (Ползвано с разрешение).



Фиг. 2. ХЛЛ – периферна намазка



КРИТЕРИИ ЗА ДИАГНОЗА

Точната и прецизна диагноза изискват абсолютна лимфоцитоза $> 5 \times 10^9/L$ в периферната кръв с морфология на зрели лимфоцити и характерен фенотип: CD5+, CD19+, CD20+, CD 10+, CD23+. Тази клонална (малигнена) популация, с която манифестира заболяването, може да се предшества от предзлокачествено състояние, наречено моноклонна В-клетъчна лимфоцитоза с $< 5 \times 10^9/L$ в отсъствието на лимфаденопатия, органомегалия, клинични симптоми и количествени промени в кръвната картина. Моноклоналната В-лимфоцитоза се среща в около 5% от здравите индивиди под 40 г, а доказването ѝ изисква проследяване.

СТАДИРАНЕ НА ЗАБОЛЯВАНЕТО И РИСКОВ ПРОФИЛ

Изборът на терапевтичната стратегия при пациентите с ХЛЛ е свързан със задължително стадиране и уточняване на рисковия профил. В използваните над 40 години стадийни системи на Binet и Rai са залегнали рутинни биохимични и физикални показатели, доказали своята независима прогностична стойност^{1,2}. Стадирани с тях, пациентите с ХЛЛ при ранна диагноза имат една от най-дългите медиани на преживяемост (MS) от 10-15 г. сред лимфопролиферативните заболявания, постигнати чрез конвенционални химиотерапевтични режими.

РИСК-СТРАТИФИКАЦИЯ

Чрез нея се осъществява изборът на най-подходящия лечебен режим за всеки отделен пациент, съвременното управление и мониториране на лечебния процес. Разгадаването на биологията на ХЛЛ налагат промяна в рутинните показатели от стадийните системи на Binet и Rai. През 1999 г. колективите на Damle, R. N. и Hamblin T. J. установяват, че пациентите с ХЛЛ и соматична мутация в гените за тежките вериги на имуноглобулините (IGHV) имат значимо по-дълга обща преживяемост (OS) – средно 20 год спрямо 8 год при липса на мутации^{3,4}. Генетичните отклонения са обобщени от Dohner и кол в прогностично нов модел: пациентите с del17p13 имат преживяемост само от

около 3 год, последвани от пациенти с del11q23 – 6.5 год, тризомия 12 – 9.2 год, отрицателна FISH – 9.5 год и del13q14 – 11 год. В съвременното непрекъснато се доказват нови и нови мутации, водещи до патологична сигнализация. В серия последователни съобщения на Sportoletti P, Wang L, Quesada V, Oscier D G и Rossi D установяват често повтарящите се аномалии при ХЛЛ, които ангажират гените за увреждане на ДНК и клетъчния цикъл (ATM, TP53, RB1, BIRC3), Notch сигнализацията (NOTCH1, NOTCH2, FBXW7), цитокините (NRAS, KRAS, BRAF) и възпалителни (MYD88, DDX3X, MAPK1) (SF3B1) сигнални пътища. Публикувани са данни, според които пациентите с ХЛЛ с NOTCH1 мутация (честа при тризомия 12), с мутация SF3B1 (честа при del13q14) и тези с мутация на TP53 имат нужда от по-ранен старт на терапията, показват по-къса преживяемост без прогресия (PFS) и медиана на преживяемост (OS)⁵⁻¹⁰. Подобни генетични маркери са включени в съвременния Международен прогностичен индекс при пациенти с ХЛЛ (CLL-IPI)¹¹⁻¹⁷. В него са оценени в прогностичен аспект 28 различни показатели от над 3400 пациенти с ХЛЛ. Като прогностично независими и управляващи достоверно различна преживяемост се оказват само 5 от тях: възраст > 65 години, IV стадий по Rai, серумен бета-2 микроглобулин > 3,5 mg/L, немутирани IGHV гени, и del17p чрез FISH или TP53 мутация (табл.1)

Табл 1. Интернационален прогностичен индекс при ХЛЛ¹⁶

Прогностични фактори	Del 17p или TP53 мутация	Немутирани гени IGHV	β2- microgl. > 3.5 mg/L	Стадии по Rai (I –IV)	Възраст над 65 г.
Точки	4	2	2	1	1
Кумулативен сбор		Категория риск		5 год преживяемост (%)	
0-1		нисък		78%	
2-3		среден		54%	
4-6		висок		32%	
7-10		много висок		0%	

Видно е, че 6 от 10 точки се формират от най-рисковите генетични отклонения при ХЛЛ. Към ИПИ има сериозни критики, но единодушно е мнението, че той предопределя по-точно необходимостта от започване на терапията при нелекувани пациенти особено с генетично неблагоприятен терен. В критериите за „старт на терапията“ от 2018г. отделните генетичните показатели не са инкорпорирани, а се подразбират с термина „с висок риск“. Задължително условие за начално лечение е уточняването на мутационния статус на IGHV при всеки пациент или поне на TP53 (табл.)

КРИТЕРИИ ЗА ЗАПОЧВАНЕ НА ЛЕЧЕНИЕ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХЛЛ (ИНТЕРНАЦИОНАЛНА РАБОТНА ГРУПА ЗА ХЛЛ, 2018Г)¹⁷

- **Прогресивна костномозъчна недостатъчност с Hb < 100 g/l и PLT < 100 x 10⁹ /l**
- **Значима или прогресираща спленомегалия над 6 см в подребрието**
- **Значима или прогресираща лимфоаденомегалия > 10 см надлъжен диаметър**
- **Прогресираща лимфоцитоза с над 50% за 2 месечен период или лимфоцитен doubling**

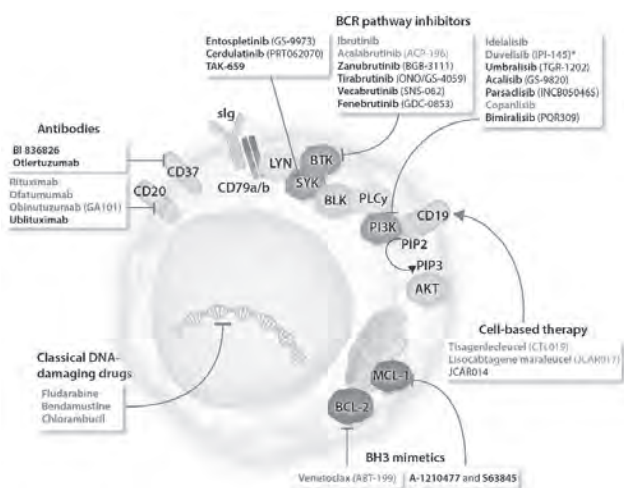
time < 6 месеца

- **Автоимунни цитопении, лошо повлияващи се от ГКС**
- **Екстранодално ангажиране (кожа, бъбреци, бял дроб, кости и др)**
- **В-симптоми (нощно изпотяване, фебрилитет, кожен сърбеж, загуба на тегло)**
- **Пациенти в напреднал стадий и с висок риск***
- **Едроклетъчна трансформация**

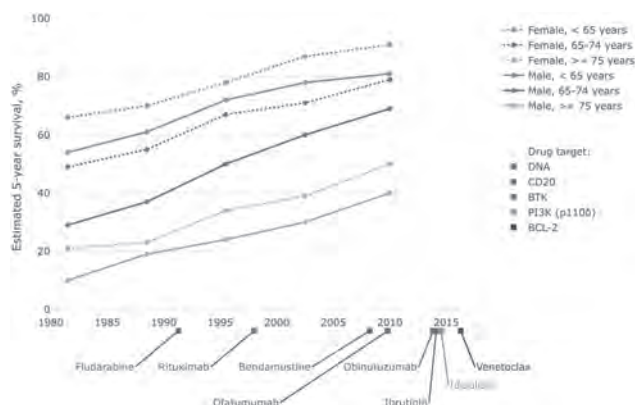
РАЗГАДАНАТА БИОЛОГИЯ НА ХЛЛ – СЪВРЕМЕНЕН ТЕРАПЕВТИЧЕН ТАРГЕТ

Терапевтичната палитра за лечение на ХЛЛ в съвременното е изключително разнообразна и резултат от въвеждането на принципно нови по механизъм на въздействие лекарствени продукти (фиг. 1). Получени са резултати за значителна ефективност и ефикасност на фона на коморбидността и органните дисфункции, особено при трудните за терапевтично манипулиране високорискови възрастни пациенти (фиг. 2).

Фиг. 1 Съвременни терапевтични възможности за лечение на ХЛЛ



Фиг. 2 Етапи в лечението на ХЛЛ и 5г. обща преживе- мост



АНТИ-CD20 МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА. ИМУНОХИМИОТЕРАПИЯ.

CD20 е негликозилиран фосфопротеин, експресиран на повърхността на В-лимфоцитите за повечето неопластични лимфопролиферативни заболявания. **CD20 се намира** в съседство (ко-локализира) с В-клетъчния рецептор (BCR) и спомага за неговото активиране и последващо включване на редица важни за биологията на клетката сигнални пътища¹⁸. **Анти-CD20 МКА** опсонизират таргетните кретки и чрез директна цитотоксичност, антиген зависима (АЗКТ) и комплемент медирана (КМЦ) цитотоксичност предизвикват техния лизис. Инкорпорирането на анти- **CD20** МКА към класическите химиотерапевтични режими рязко промени терапевтичната стратегия при ХЛЛ. След първото МКА **Rituximab** се появиха нови генерации **Ofatumumab** и **Obinutuzumab**. **Ofatumumab** свързва епитопи по-близо до мембраната и привлича повече C1q, дори когато концентрацията му е ниска в околната среда. **Obinutuzumab** е резултат на гликоинжинеринг на Fc фрагмента, който се свързва много по-здраво с FcγRIIIa, с което се повишава АЗКТ. В търсенето на оптимална полза всички МКА са тествани в комбинация, както с химиотерапевтичните режими, така и с новите лекарствени продукти (табл 2).¹⁹⁻²¹

Още проучването CLL8 (**FC+R vs FC**) показва непозната ефикасност и ефективност в рамото с МКА: общ терапевтичен отговор (ORR) – 90%, пълен отговор (CR) – 40% и PFS – 52 мес²². Резултатите от CLL 10 (FCR vs BR) при пациенти над и под 65 г. като първа линия лечение не показват зависимост от химиотерапевтичния режим FC или B: еднакъв терапевтичен отговор (ORR), обща (OS) и без прогресия преживяемост (PFS)²³. След дългосрочното

проучване на MDACC фаза 2, с проследяване от около 13 год, настъпва преоценка на режима FCR по отношение на страничните ефекти и усложнения: риск от вторични миелоидни неоплазми -5%, трансформацията в синдром на Рихтер – 8%, повишена честота на ранна смърт, миелосупресия и незадоволителен ефект при високорисковите пациенти, ограничават неговото приложение²¹. От друга страна регистрираната МРД(-) в около и над 50% от случаите не може да бъде пренебрегвана. В опитите за оптимално лечение без странични ефекти ретроспективно проучване от MDACC показва, че MRD (-) пациенти след 3 цикъла на режима FCR имат подобни дългосрочни резултати с получените 6 цикъла, което позволява по-кратко лечение с избягването на кумулативната токсичност²⁴. Режимът **FC+R** бе златния стандарт на миналото десетилетие, който понастоящем се препоръчва при млади пациенти без коморбидност и неблагоприятен рисков профил. От класическите химиотерапевтични режими остава алтернативата – Bendamustine + МКА, особено при пациенти над 65г.

Данните от инкорпорирането на новите МКА **Ofatumumab** и **Obinutuzumab** към класическата химиотерапия (Cib или FC) в проучванията COMPLEMENT 1 и 2 и CLL11 са противоречиви и не показват по-добри ORR, PFS и OS при релапсирани и със значителна коморбидност пациенти. **Ofatumumab** и **Obinutuzumab**, обаче дават почти двойно по-добра ефикасност при проблемни пациенти в сравнение с монокимиотерапията^{25,26,27}.

Табл2 Рандомизирани проучвания с анти – CD20 моноклонални антитела

Режим	N	ORR %	CR %	PFS мес	OS мес	Проучване
FCR vs FC	817	90 vs 80		56,8 vs 32,9	NR vs 86	CLL 8
FCR vs BR	367 <65г	95 vs 98		53,6 vs 48,5	NS	CLL 10
FCR vs BR	194 > 65г	97 vs 92		NR vs 48,5	NS	CLL 10
G+Clb vs R+Clb vs Clb	781 с коморбидност	77,3 vs 65,7 vs 31,4		26,7 vs 16,3 vs 11,1	NR	CLL 11
O+Clb vs Clb	447 нелекувани (unfit)	82 vs 69		22,4 vs 13,1	NR	COMPLEMENT 1
O+ FC vs FC	365 R/ R	84 vs 68		28,9 vs 13,1	NR	COMPLEMENT 2

• ORR%- общ терапевтичен отговор; CR %- пълна ремисия; MRD % -минимална резидуална болест; PFS – свободна от прогресия преживяемост ; OS -обща преживяемост; FCR – fludarabine, cyclophosphamide, rituximab; BR- bendamustine, rituximab; O – Ofatumomab; G -Obinuzumab, Clb – chorbutin; R/ R – релапс/ рефрактерни; NR – недостигната NA – няма данни.

Така например проучването CLL11 (Chlorambucil + Obinuzumab vs Chlorambucil + Rituximab vs Chlorambucil) при възрастни пациенти със съпътстващи заболявания (CIRS ≥ 7), рамото с Obinuzumab показва най-висок ORR (78% vs 65% vs 31,4; $p < 0,001$) и по-дълга PFS (26,7 мес vs 16,3 мес, vs 11,1 ; $p < 0,001$)²⁷. Резултатите от проучвания и клиничната практика налагат и трите анти- CD20 МКА като стандарт за начално лечение на млади пациенти с ХЛЛ, без съпътстваща коморбидност, стандартен цитогенетичен профил и мутирани IGHV гени. Остава все още неясно кое МКА е за предпочитане в комбинираните режими? Проучването ILLUMINATE (Clb + Obinuzumab vs и Ibrutinib + Obinutuzumab) при коморбидни възрастни пациенти показва във второто рамо – 35% MRD(-) и двойно по-дълга PFS (табл.2)²⁸. В проучването, обаче няма рамо монотерапия с ibrutinib и ползата от добавянето на Obinutuzumab към ibrutinib остава неясна. В проучването ALLIANCE A41202 с 3 рамена (I+R vs I vs BR) при пациенти над 65 г. се съобщава по-нисък ORR -81%, но

еднаква 2г. OS²⁹. В двете рамена с Ibrutinib ± R и BR добавянето на Rituximab не показва съществена полза. Добавянето, обаче на Ibrutinib към BR в проучването HELIOS повишава ефективността на режима BR30 (табл 2). Въпреки данните за по-голяма ефективност на новите генерации анти-CD 20 МКА, като че ли Rituximab е с леко предимство като компаратор в съвременните комбинирани режими.

ИНХИБИРАНЕ НА BCR СИГНАЛНА СИСТЕМА

BCR включва каскадна поредица от активацията на редица киназни системи с ключов междинен момент – активацията на Bruton-тирозин киназата (BTK) и фосфоинозитол-3-киназите (PI3Ks). Последните водят до активацията на протеин-киназа B (AKT), извънклетъчно регулирани кинази ERK 1&2, нуклеарните фактори -kB(NF kB) и на активирани Т-клетки (NFAT).

Табл. 2 Терапевтичен отговор и преживяемост след лечение с BCR-инхибитори в рандомизирани проучвания

Режим	N	ORR %	CR %	PFS мес	2/3 год. OS мес	Проучване
I	101 R/R	87		51	NR	PCYC 1102/1103
I	31 нелекувани	89		NR	NR	PCYC 1102/1103
I vs Clb	269	86 vs 35	4 vs 2	NRvs 18,9	98vs85	RESONATE 2
I+R vs FCR	529 <70г	NA	NA	NA	89 vs 73	ECOG-ACRIN E1912
I vs O	391 R/R	95vs 25		NR vs 8,1	NR	RESONATE 1
I+O vs O+Clb	229 unfit/възрастни	88 vs 73	19 vs 8	NR vs 19	86 vs 85	iLLUMINATE

I+R vs I vs BR	547 >65 г	94 vs 93 vs 81	7 vs 12 Vs 26	NR vs NR vs 43	94 vs 90 vs 95	ALLIANCE A41202
I+BR vs pl + BR	578 R/R	82,7 vs 69,7		NR vs 13,9	NR	HELLOS
Idelalisib + BR vs pl +BR	416 R/R	70 vs 45		28 vs 11,1	-	Zelenetz, A. D
Idelalisib + R vs pl +R	176 нелекувани	81 vs 13		NR vs 5,5	NR	Furman RR
Idelalisib+O vs pl +O	261	75,3 vs 18,4		16,4 vs 8	NR	Jones JA

I – ibrutinib; pl – плацебо

Ibrutinib – свързва ковалентно Cys481 от домена на BTK, с което се инхибират предимно MAP-киназите и PI3K, свързани с активиране на пътищата за преживяемост. Блокират се и сигналите за „оцеляване“ към малигнените клетки от микросредата (CD40L, BAFF, IL-6, IL-4 и TNF-α и се потиска IL-2-индуцируема киназа (ITK), която участва в активирането на Т-килърите. Крайният ефект е блокиране оцеляването и миграцията на малигнените клетки, респективно прогресията на ХЛЛ³¹⁻³³.

През 2014г. FDA и EMA одобряват първоначално Ibrutinib за рецидивирала / рефрактерна(R/R) ХЛЛ, а по-късно и за всички нелекувани преди това пациенти. Подобно решение се основава на резултатите от проучванията RESONATE, RESONATE-2, RESONATE-17 и HELIOS при R/R ХЛЛ³⁴⁻³⁸. Обобщените данни от тях, вкл след 5 г. проследяване, демонстрират сходен ORR в 87-89%, както за нелекувани, така и за R/R случаи, а 5г. OS е 92% за нелекуваните и 60% при R/R. Отговорът е траен, независим от броя предишни линии лечение и рисковия генетичен профил на пациентите. При сравнението с Ofatumumab Ibrutinib показва по-добри резултати за PFS (p <0,001), OS и риска от летален изход (p = 0.005). В проучването iLLUMINATE (ibrutinib + obinutuzumab vs chlorambucil + obinutuzumab) се регистрират също по –добри резултати в рамките с ibrutinib+ obinutuzumab: 30 месечна PFS (79% vs 31%), CR (19% vs 8%) и MRD негативитет (35% vs 25%)²⁸ От многото проучванията се установява, че Ibrutinib протектира функцията на костния мозък, на фона на костномозъчната недостатъчност след химиотерапия и повишава Т-клетъчната функция. Установено е, че пет или повече цикъла на терапия с Ibrutinib подобрява експанзията на CD19 CAR Т клетки (CTL019), в съчетание с намалена експресия на имуносупресивните клетки за молекулярно програмирана клетъчна смърт върху Т-и CD200 В-лимфоцитите. Подобен потенциращ ефикасността на CAR-Т клетките ефект е установен в 2 клинични проучвания с комбинирани инфузии на CAR-Т + Ibrutinib.³⁹⁻⁴² Обобщените данни от 5 г. наблюдения от лечението с Ibrutinib показват високи ORR, PFS и OS, но ниска CR – само около 10% на 1-вата и 29% на 5-та г. и не се отчита MRD(-).

Idelalisib потиска селективно δ-изоформата на каталитичната субединица (p110d) на PI3K и блокира стимулацията на малигнените клетки от растежните фактори на околната микросреда. В комбинация с анти-CD 20 МКА в 2 проучвания се съобщават много добри резултати (ORR 70% vs 45%) в рисковите групи, поради което е одобрен за пациенти с рецидив, del (17p) или TP53 мутация⁴³⁻⁴⁶.

АНТИАПОПТИЧНИ BCL-2 ИНХИБИТОРИ

Малигнените лимфоцити при ХЛЛ експресират в значителна степен антиапоптоичния протеин BCL-2 и едновременно с това са особено чувствителни към BCL-2 инхибиране. Блокирането на BCL-2 е изключително рационален терапевтичен подход. **Venetoclax** (ABT-199) е високо BCL-2-селективен инхибитор, който се свързва с антиапоптоичните протеини, блокира и инактивира тяхната активност, като действа независимо от TP53. **Venetoclax** е одобрен от EMA (2016 г). като монотерапия при пациенти с рецидивирала ХЛЛ, неблагоприятен мутационен статус и неподходящи за лечение с BCR инхибитори. За разлика от BCR инхибиторите **Venetoclax** индуцира дълбоки ремисии с висок процент MRD негативитет. През 2018 г. FDA и EMA одобряват Venetoclax за втора линия за всички пациенти с ХЛЛ независимо от техния генетичен статус на базата фаза III проучването MURANO (venetoclax + rituximab vs rituximab + bendamustine)⁴⁷. Резултатите показват PFS 84,9% vs 36.3% със забележителни нива на MRD негативитет от 62.4% vs 13.3%, който остава траен около година след прекратяването на лечението. Подобни са данните от фаза II проучване с две рамена V+O vs Clb+O – повече от два пъти по-честа CR: 50% vs 23%. Режимите, базирани на Venetoclax, имат огромен потенциал с високия процент дълготраен MRD-негативитет и възможността за намаляване риска от резистентност⁴⁸⁻⁵⁰. Venetoclax първи показва новата терапевтична опция – режим с фиксирана продължителност (venetoclax + rituximab), последвано от монотерапия 2г, за да се консолидира дълбокия терапевтичен отговор⁵¹. Понастоящем неизмеримата резидуална болест е

показател, който е натоварен с големи очаквания за бъдеща удължена преживяемост. Дали нивата на MRD (-) ще предскажат подобна, дългосрочна клинична еволюция в момента не е известно. В научните среди все повече се обсъжда значението на постигането на MRD (-) като крайна точка за преустановяване на лечението.

Табл. 3: Терапевтичен отговор и преживяемост след лечение с BCL-2 инхибитори в рандомизирани проучвания

Режим	N	ORR %	CR %	PFS мес	OS мес	Проучване
Venetoclax	158 R/R; del 17p	77		27,2	NR	M13-982
Venetoclax	91 R/R след ibrutinib	65		24,7	NR	M14-032
Venetoclax	36R/R след ibrutinib	67		NR	NR	M14-032
V+O vs Clb+O	432 R/R	85 vs 71	50 vs 23	NR	92 vs 93	Fisher
V+ R vs BR	389 R/R или високорискови	92 vs 72	62,4 vs 13,3	84,9 vs 36.3	92 vs 80	Murano

V- Venetoclax

ОБОБЩЕНИЕ

В лицето на новите МКА, Ibrutinib и Venetoclax терапевтичните възможности при ХЛЛ не само се обогатиха, но промениха основно лечебната тактика и стратегия. Като цяло получените резултати изравниха шансовете на рефрактерните и релапсирани случаи, на високорисковите с останалите пациенти с благоприятен профил. (табл 4)

Табл. 4: Основни характеристики на BCR и BCL-2 инхибитори

Показател	Ibrutinib	Venetoclax
Терапевтичен отговор	Костен мозък ++ Лимфоаденомегалия +++ Периферна кръв ++	Костен мозък +++ Лимфоаденомегалия ++ Периферна кръв +++
Лимфоцити	+++	-
CR при R/R и високорискови пациенти	10%	20-25%
Най-чести хронични усложнения	Предсърдно мъждене, неутропения, хеморагична диатеза	TLS, неутропения

Новите лекарствени продукти за I/II линия лечение на ХЛЛ, имат припокриващи се индикации с почти еднаква степен на достоверност, което налага особено внимание при изготвянето на консенсусно приети препоръки. Явно при вземането на решения трябва да се вземат предвид редица фактори: потенциалните странични ефекти на новите агенти, съпътстващи заболявания (кардиомиопатии, аритмии, бъбречна недостатъчност), съпътстващо лечение с СYP инхибитори, антикоагуланти), индивидуални предпочитания (фиксиран във времето режим или неопределено дълго лечение) и не

по-малко важните икономически съображения^{52,53}. Въпреки своята ефикасност и ефективност, получени от внушителен брой проучвания, вкл и най-новите данни от 5 г наблюдения, препоръчаната монотерапия с неопределен времеви диапазон с Ibrutinib е обект на преоценка. Регистрирани са вече и съществени недостатъци: необходимост от чести контроли в терапията, относително високи стойности на сърдечни аритмии, появата на резистентни мутации (обикновено се очакват след 9-12 мес лечение), бързи рецидиви след преустановяване на лечението, и не на последно място

– значима финансова тежест. Данните от анализирани по-горе проучвания оформят няколко опции с конкретни предимства: за първа линия терапия Ibrutinib е с повече ползи от Idelalizib; след неуспех от Ibrutinib по-добри са резултатите от Venetoclax; последователното прилагане на BCR и BCL-2 инхибитори не повишава честотата и рядко води до MRD(-); най-вероятно комбинирани режими с МКА ще потвърдят получаването на дълбоки и трайни CR, предотвратяването на клоналната еволюция и реалната възможност за спиране на лечението⁵³. От наличните данни явно изборът на МКА се оказва важен за повишаване на ефективността: Ibrutinib + Obinutuzumab показват MRD(-) в 48%, докато Ibrutinib + ofatumumab – само 14%. Протоколът CLL2-BAG (при използване на bendamustine, venetoclax и obinutuzumab) дава MRD(-) в около 90% при нелекувани и предварително лекувани пациенти. Същите отлични резултати са получени и в цитираното вече проучване Murano (venetoclax +R) с 64% MRD(-), довела до повишение и на PFS. В две проучвания е тествана примамливата комбинация (но не във финансов аспект) Ibrutinib + Venetoclax. Резултатите от проучването CLARITY при 40 пациенти с R/R ХЛЛ показват 100% ORR с 58% MRD(-)⁵⁴. В проучването CAPTIVATE MRD(-) е 68%, резултат нарастващ във времето⁵⁵. Тройната комбинация от стратегическите лекарствени продукти (Obinutuzumab + Ibrutinib + Venetoclax) повишава MRD(-) до 70%⁵⁶.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Новите лекарствени продукти за терапевтично манипулиране на пациенти с ХЛЛ са резултат от напредъка в теоретичните познания в биологията на заболяването. Новите класове лекарства (анти-CD20 антители, ВТК, PI3K и BCL-2-инхибитори) с получените от тях резултати превърнаха използваните от десетилетия химиотерапевтични режими в исторически⁵⁷. Международните и национални препоръки непрекъснато се обновяват, още повече, че се появяват и нови индикации. И все пак високата преживяемост от над 15-16 г при болни с ХЛЛ в начални стадии, лекувани само с химиотерапевтични режими все още не е достигната... Необходимо е време за истинска оценка на ефективността на новите лекарствени продукти и тяхното значение за подобряване прогнозата и преживяемостта на пациентите с ХЛЛ.

Адрес за кореспонденция

Доцент д-р Веселина Ст. Горанова-Маринова, дм
Клиника по клинична хематология
УМБАЛ „Св Георги“–ЕАД
Пловдив 4000 бул Васил Априлов 15А
e-mail: vesselina_goranova@yahoo.com

БИБЛИОГРАФИЯ

- Rai, K. R. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46,219–234 (1975).
- Binet, J. L. et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198–206
- Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. & Stevenson, F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848–1854
- Juliussen, G. et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323:720–724
- Dohner, H. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1910–1916
- Wang, L. et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 2497–2506
- Quesada, V. et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2012; 44:47–52
- Oscier, D. G. et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood* 2013; 121: 468–475
- Rossi, D. et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012; 119: 521–529
- Sportoletti, P. et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br. J. Haematol.* 2010; 151: 404–406
- Parikh, S. A. & Shanafelt, T. D. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* 2016; 43:233–240
- Pflug, N. et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 124: 49–62
- CLL-IP1 working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IP1): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 779–790
- Wierda, W. G. et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007; 109:4679–4685
- Rossi, D. et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121: 1403–1412
- Munoz-Novas, C. et al. The International Prognostic Index for patients with chronic lymphocytic leukemia has the higher value in predicting overall outcome compared with the Barcelona-Bruno Biomarkers Only Prognostic Model and the MD Anderson Cancer Center Prognostic Index. *Biomed. Res. Int.* 9506979, 2018
- Molica, S. et al. Assessing time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia (CLL): a comparative performance analysis of five prognostic models with inclusion of CLL-international prognostic index (CLL-IP1). *Leuk. Lymphoma* 2017; 58:1736–1739
- Boross, P., Leusen, J. H. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res.* 2012; 2:676–690. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, et al. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8:140–174
- Hallek, M. et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 1164–1174
- Fischer, K. et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood* 2016; 127: 208–215
- Thompson, P. A. et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; 127: 303–309
- Fischer, K., Bahlo, J., Fink, A. M., et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016; 127:208–215
- Eichhorst, B., Fink, A. M., Bahlo, J., et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17:928–942..
- Strati, P. et al. Eradication of bone marrow minimal residual disease may prompt early treatment discontinuation in CLL. *Blood*. 2014; 123:3727–3732.
- Hillmen, P., Robak, T., Janssens, A., et al. Chlorambucil plus ofatumumab versus chlorambucil alone in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia (COMPLEMENT 1): a randomised, multicentre, open-label phase 3 trial. *Lancet.* 2015; 385:1873–1883.
- Robak, T., Warzocha, K., Govind, B. K., et al. Ofatumumab plus fludarabine and cyclophosphamide in relapsed chronic lymphocytic leukemia: results from the COMPLEMENT 2 trial. *Leuk Lymphoma.* 2017; 58:1084–1093.
- Goede, V., Fischer, K., Busch, R., et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med.* 2014; 370:1101–1110.
- Moreno, C., Greil, R., Demirkan, F., et al. Ibrutinib plus obinutuzumab versus chlorambucil plus obinutuzumab in first-line treatment of chronic lymphocytic leukaemia (iLLUMINATE): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20:43–56.

29. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, et al Ibrutinib regimens versus chemoimmunotherapy in older patients with untreated CLL. *N Engl J Med.* 2018;379:2517–2528.
30. Chanan-Khan, A. et al. Ibrutinib combined with bendamustine and rituximab compared with placebo, bendamustine, and rituximab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma (HELIOS): a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 200–211
31. Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, et al NF-kappaB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood.* 2014;123:3286–3295
32. Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 2010; 13075–13080
33. Dubovsky JA, Beckwith KA, Natarajan G, et al. Ibrutinib is an irreversible molecular inhibitor of ITK driving a Th1-selective pressure in T lymphocytes. *Blood.* 2013;122:2539–2549
34. O'Brien S, Jones JA, Coutre SE, et al Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol.* 2016;17:1409–1418.
35. O'Brien S, Furman RR, Coutre S, et al Single-agent ibrutinib in treatment-naïve and relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: a 5-year experience. *Blood.* 2018;131:1910–1919.
36. Brown JR, Hillmen P, O'Brien S, et al Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. *Leukemia.* 2018;32:83–91.
37. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2015;373:2425–2437.
38. Farooqui, M. Z. et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2015; 16, 169–176
39. Long, M, Beckwith, K, Do, P, et al. Ibrutinib treatment improves T cell number and function in CLL patients. *J Clin Invest.* 2017; 127(8): 3052–3064.
40. Fraietta, JA, Beckwith, KA, Patel, PR, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood.* 2016; 127(9): 1117–1127.
41. Gauthier, J, Hirayama, AV, Hay, KA, et al. Comparison of efficacy and toxicity of CD19-specific chimeric antigen receptor T-cells alone or in combination with ibrutinib for relapsed and/or refractory CLL. *Blood.* 2018; 132: 299–299.
42. Gill, SI, Vides, V, Frey, NV, et al. Prospective clinical trial of anti-CD19 CAR T cells in combination with ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia shows a high response rate. *Blood.* 2018; 132: 298–298.
43. Zelenetz, A. D. et al. Idelalisib or placebo in combination with bendamustine and rituximab in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: interim results from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18: 297–311
44. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2014;370:997–1007.
45. O'Brien SM, Lamanna N, Kipps TJ, et al A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2015;126:2686–2694.
46. Jones JA, Robak T, Brown JR, et al Efficacy and safety of idelalisib in combination with ofatumumab for previously treated chronic lymphocytic leukaemia: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2017;4: e114–e126.
47. J.F. Seymour, T.J. Kipps, B. Eichhorst, P. et al Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia *N Engl J Med* 2018; 378:1107–20.
48. Stilgenbauer, S. et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 768–778
49. Anderson, M. A. et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood* 2017; 29:3362–3370
50. Jones, J. A. et al. Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2018; 19: 65–75
51. Amon P, Kater, MD; John F. Seymour et al. Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study *J Clin Oncol* 2018; 37:1-9. © by American Society of Clinical Oncology
52. Mato, A. R. et al. Outcomes of CLL patients treated with sequential kinase inhibitor therapy: a real world experience. *Blood* 2016; 128, 2199–2205
53. Hallek, M, Shanafelt, TD, Eichhorst, B. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2018; 391(10129): 1524–1537.
54. Hillmen <, Rawston A, Brok K et al Ibrutinib plus Venetolax in relapsed/refractory CLL& results of the bbloodwise TAP clarity study *Blood* 2018; 132: 182-182
55. Jan N, Keating MJ, Thompson PA et al. Combined Ibrutinib and Venetoclax in treatment naïve and relapsed/refractory CLL *Blood* 2018; 132: 696-696
56. Roger KA, Huang Y, Ruppert AS et al. Phase 2 study of combination obinutuzumab, ibrutinib and venetoclax in treat;ent naïve and relapsed/refractory CLL *Blood* 2018; 132: 693-693
57. Parikh SA Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J.* 2018 Oct 3;8(10):93.

ДИАГНОСТИЧНА СТОЙНОСТ НА СТАВНАТА ЕХОГРАФИЯ И МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНА ТОМОГРАФИЯ ЗА ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА СТАВНАТА УВРЕДА ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХЕМОФИЛИЯ

Спасов Н.

Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Свети Георги“ – Пловдив,
Катедра педиатрия и медицинска генетика, МУ – Пловдив

DIAGNOSTIC VALUE OF JOINT ULTRASOUND AND MAGNETIC RESONANCE IMAGING FOR ASSESSMENT OF ARTHROPATHY IN PATIENTS WITH HAEMOPHILIA

N. Spasov N.

Department of Pediatrics, UMHAT „Sveti Georgi“ – Plovdiv,
Chair of Pediatrics and medical genetics, Medical University – Plovdiv

Резюме. През последните десетилетия се постигна значителен прогрес в грижите за пациентите с хемофилия. Въпреки това все още се наблюдават последиците на ставната увреда. Ранното ѝ откриване е от изключителна важност за съобразяване на лечението и предотвратяване на хемофилната артропатия.

Цел на настоящия обзор е да се разгледат съществуващите образно-диагностични възможности за установяване на ранната структурна ставна увреда при хемофилия.

Дискутирани са предимствата и недостатъците на магнитно-резонансната томография и ставната ехография при проследяване на ставния статус на пациенти с хемофилия извън епизодите на остра хемартроза. Разглеждат се проведените проучвания за диагностичната им стойност по отношение на активността (синовиялна хипертрофия) и прогресията (остеохондрални промени) на хемофилната артропатия. Анализира се съпоставимостта на резултатите между магнитно-резонансната томография и ставната ехография.

В заключение, магнитно-резонансната томография и ставната ехография са с потенциал за откриване на ранни структурни промени на хемофилна артропатия дори в асимптомни стави.

Ключови думи: хемофилна артропатия, ставна ехография, магнитно-резонансна томография

Abstract. During the last decades a substantial progress has been achieved in the haemophilia care. Despite this the joint disease continues to occur. The early recognition of the blood-induced joint damage is of utmost importance for modifying treatment and preventing haemophilic arthropathy.

The objective of this review is to peruse the existing data about the potential of the imaging modalities to detect the early structural joint damage in haemophilia patients.

The advantages and disadvantages of magnetic resonance imaging and joint ultrasound for the assessment of the joints in a non-bleeding state for patients with haemophilia are discussed. We analyzed the published results for the diagnostic value of the imaging modalities for detecting activity (synovial hypertrophy) or progression (osteochondral changes) of the haemophilic arthropathy. The existing data on the level of agreement between the magnetic resonance imaging and the joint ultrasound are reviewed.

In conclusion, the magnetic resonance imaging and the joint ultrasound offer a potential for an early detection of the structural changes of the haemophilic arthropathy even in asymptomatic joints.

Key word: haemophilic arthropathy, ultrasound of the joints, magnetic resonance imaging

През последните десетилетия се постигна значителен прогрес в грижите за пациентите с хемофилия (ПСХ). Непрекъснато нарастващата консумация на фактор концентрати и възприемането на препоръки за профилактика, лечение и проследяване доведе до подобрена преживяемост и качество на

живот. Въпреки това все още се наблюдават последиците на ставната увреда. Рискова група за възникването на хемофилна артропатия (ХА) са пациенти с тежка форма на хемофилия, които в исторически план не са получавали профилактика, и тези с развили се неутрализиращи антитела

срещу липсващия коагулационен фактор (инхибитори) (3).

Ранното откриване на ставната увреда е от изключителна важност за избора или модифицирането на лечението с цел превантиране или отлагане на настъпването на ХА. В тази насока подробният клиничен преглед е полезен, но не и достатъчен метод (2). През 2017г. са публикувани консенсусни препоръки за използване на инструментариуми при проследяване на ПСХ (9). Според тях физикалната оценка на ставния статус (СС) с валидиран инструментариум е задължителна в клиничната практика и при научни изследвания. Магнитно-резонансната томография (МРТ) и ставната ехография (СЕ) остават препоръчителни в изследователски аспект поради недостатъчно натрупана информация за терапевтичната им значимост. Рутинното проследяване на СС чрез образни изследвания с цел откриване на ранни промени и индивидуализиране на терапевтичния режим не се прилага в клиничната практика. МРТ се осъществява в повечето случаи за диагноза на остра проблемно кървене или преди планирана ортопедична интервенция.

Скалите за рентгенологична оценка на прогресията на ХА са един от най-старите клинометрични инструментариуми. Използват се две основни скали: прогресивната скала на Arnold-Hilgartner и препоръчаната от Световната Федерация по Хемофилия адитивна скала на Petterson. Техен общ недостатък е невъзможността за откриване на ранните мекотъканни промени. Това ги прави неприложими за предотвратяване на необратимата остеохондрална увреда. През последните години липсват съвременни модификации на тези скали и установяването на рентгенологични промени обикновено е показание за друг метод на образно изследване (12).

Първоначално МРТ и СЕ са проучвани като допълващи клиничната оценка при ПСХ с нормални рентгенографии поради потенциала им за откриване на ранните мекотъканни промени. От друга страна, всички рентгенологични остеохондрални промени с изключение на остеопенията също могат да бъдат установени с МРТ и СЕ (12). Тъй като всеки от двата метода има своите предимства и недостатъци при визуализация на ХА, изборът му зависи от клиничния въпрос.

Понастоящем МРТ е златният стандарт в диагностиката на ХА и допринася за откриване на мекотъканните и хрущялни промени. Съвременната препоръка при ПСХ е да се провежда МРТ на шестте индексни стави (лакти, колена и глезени) през 5-годишен интервал от 6-8-годишна възраст на пациента.

Специфичните за ХА промени, които подлежат на МРТ оценка, са наличие на вътреставен из-

лив, синовиална хипертрофия (СХ), отлагане на хемосидерин в синовията, изтъняване или загуба на ставен хрущял и промени в остеохондралната повърхност (ерозии, субхондрални кисти). За практически и научно-изследователски цели са разработени редица скали на МРТ оценка при ХА. Първа е предложена Denver скалата през 2000г. Според нея се измерва само дълбочината на ставния хрущял, поради което слабо се разграничават различните стадии на хрущялна увреда. Последващата Европейска скала е по-усложнена, но позволява отделна оценка на остеохондралните и мекотъканните промени. Валидността ѝ е най-вече за оценка на умерените към тежки ставни промени. Поради необходимостта от съпоставка на резултатите между различни центрове се налага стандартизиране на МРТ интерпретацията. International Prophylaxis Study Group (IPSG) предлага т. нар. Съгласувана МРТ скала. Тя е високо репродуктивна, отлична за преценка на наличието или липсата на ХА, но сравнително слабо разграничава леките от умерените и тежки промени. Понастоящем IPSG препоръчва адитивна МРТ скала (16). Неин недостатък е по-ранният „ефект на тавана“ при тежки прояви на ХА поради по-малкия брой остеохондрални параметри в сравнение със Съгласуваната МРТ скала.

В практически аспект, най-ранните установими чрез образни изследвания промени при ХА са вътреставният излив и СХ. Ставният излив е реверзибилна находка и в литературата съществува дебат дали следва да бъде включен в скалите за оценка на ХА. Немке и сътр. установяват известно количество вътреставна течност в коленните стави на повечето здрави деца с най-големи джобове ретропателарно и около кръстните връзки, достигащи среден диаметър 3 мм (11). СХ се визуализира с нисък или интермедиерен сигнал на T1 и T2 образите, позволяващи диференцирането ѝ от вътреставен излив. Теоретично приложението на венозен контраст би могло да разграничи активна от фибротична синовия, но не допринася за определяне наличието на СХ и слабо спомага за преценка на обема ѝ (15). Вътреставното натрупване на хемосидерин е показател за старо кървене и се установява при интервал между последната хемартроза и изследването не по-дълъг от 3 години (5). Наличието му се асоциира със загуба на сигнал от съседните структури, наричана „ефект на разцъфването“ и може да доведе до неточна преценка на костните ерозии, както и да замъгли ставната синовия. Установяването на хемосидерин в клинично незасегнати стави подкрепя тезата за ролята на субклиничните микрохеморагии в развитието на ХА. МРТ се съобщава като достоверен и репродуктивен метод за оценка на дебелината и обема на ставния хрущял. Според съвременните скали ставният хрущял се характеризира полуколичествено и все още липсват достатъчно данни, че количественото му определяне чрез форму-

ла носи по-добра информативност за клиничната практика (8). МРТ има по-добра диагностична стойност от СЕ за промените в остеохондралната повърхност поради тяхното дълбоко и централно разположение.

Въпреки изброените предимства на МРТ съществуват редица ограничения за приложението му: високата цена, времетраенето на изследването (около 30 минути/става), затрудненията и/или болката на пациента при позициониране на крайника, достъпността поради липса на чакащи, необходимостта от седация при най-малките пациенти, клаустрофобия при около 10% от пациентите, противопоказания при наличие на някои импланти (3). Поради това в ежедневната практика често не се провежда изходно МРТ изследване на асимптоматичните или леко засегнати стави, което възпрепятства откриването на ранните промени на ХА.

Приложението на СЕ за оценка на остра хемартроза при ПСХ е съобщено за първи път през 1987г. В следващите години методът е използван основно за установяване на наличието, локализацията и количеството на хеморагичния излив в ставата, оценка на еволюцията и потвърждаване на пълната му резорбция, разграничаване на хемартроза от артропатична болка. През 1992г. Rodriguez-Merchan и сътр. за първи път описват приложението на СЕ за диагноза и оценка на ранните прояви на ХА извън епизоди на остра хемартроза (19). Първоначално СЕ е използвана за коленни стави и е считана за недиагностична за глезени, лакти и рамена (13). Впоследствие се доказва приложимостта на СЕ за установяване и проследяване на главните маркери на ставна увреда и в други стави извън острите епизоди на кървене при ПСХ. Създаването на лесни за употреба, евтини, портативни ултразвукови апарати стимулира въвеждането на т.нар „point-of-care“ или насочена ехография: осъществявана и интерпретирана от клиницисти „при леглото на пациента“ в разнообразни клинични ситуации съобразно стандартизиран протокол на изследване без детайлна радиологична оценка. В областта на мускулно-скелетната патология стойността на насочената СЕ е особено явна при заболявания с полиартикуларно засягане, при които откриването на болестта в клинично асимптоматични стави е важно с оглед оценката или адаптацията на терапевтичната стратегия. Въвеждането на насочената СЕ в клиничното проследяване при хемофилия би подобрило достъпността за пациента в сравнение с осъществяването ѝ от ревматолог или рентгенолог и прави възможна едновременно оценка на 6 стави. Времето на изследването се съкращава поради премахване на излишните и неинформативни параметри от твърде усложнения ревматологичен протокол за СЕ (18).

Предимства на СЕ пред МРТ са по-краткото времетраене на изследването, достъпността на ехографските апарати, добра пространствена ре-

золюция, динамичната характеристика на образа и възможността за заемане на удобна позиция от пациента по време на изследването. Като недостатъци често се изтъкват зависимостта от експертността на оператора и предпочитанията на клиницисти и ортопеди към по-анатомични образи. Все пак ролята и приложението на този диагностичен метод е за установяване на ранни ставни промени и не е създаден за преценка на ортопедични индикации, поради което и основното му приложение е при педиатричната група ПСХ.

Препоръчва се използване на високочестотни линейни сонди 7-17 MHz, които визуализират повърхностните мускулоскелетни структури: синовия, сухожилия, мускулатура и интерфейса хрущял/остеохондрална повърхност по ставния ръб. По-пълна оценка е възможна на големите и по-халтави стави чрез различни прийоми, които повишават екстензията на проучваните артикулиращи повърхности (4).

СЕ позволява оценка както на активността на наличната ХА чрез степента на СХ, така и на белезите на прогресия чрез визуализиране на измерими дефекти на ставния хрущял и костните структури. В литературата се предлагат няколко протокола за СЕ с разработена оценъчна скала за ХА, представени на таблица 1 (7). Haemophilia Early Arthropathy Detection with Ultrasound (HEAD-US) протоколът е разработен от Martinolli и сътр. чрез консенсусен метод при структурирани срещи между 9 експерти в областта на грижите за хемофилия и мускулно-скелетната ехография (18). При оценката не се включват количествени измервания поради силната им вариабилност от позицията на трансдюсера и риска да бъдат подвеждащи. Средното време за изследване на 1 става е под 2 минути и е значително по-кратко от МРТ и други предлагани протоколи за СЕ. Този факт обуславя приложимостта му за множество стави, дори в рамките на клиничното изследване.

Всички публикувани протоколи за СЕ възприемат като един от критериите за проследяване СХ, визирайки централната ѝ патогенетична роля в развитието на ХА (1). Все пак обаче различните протоколи използват различни методи за дефиниране и категоризиране на СХ (7). Тя се оценява или като налична/липсваща или се категоризира в различни полуколичествени степени в повечето от съобщаваните скали. Предлагат се и протоколи с количествено измерване на дебелината на синовията: Melchiorre и сътр. – в mm, Musa-Perja и сътр. – в cm². Въпреки че включването на измерване изглежда по-точно, в действителност по-значимо се повлиява от вариабилността в оценката между операторите. Поради това рутинното му прилагане изисква още валидиращи проучвания с ad hoc дизайн. Противоречиви резултати се съобщават и относно възможността да се установи отлагане на хемосидерин в синовията чрез СЕ. Предлагат

се критерии за разграничаването му от синовия, като разположението му в хипоехогенни джобове, неправилен контур и незначителна промяна при натиск. Те са оборими поради факта, че хемосидеринът не се разполага като свободна структура в ставната кухина, а се отлага в синовията (20). В сравнително проучване между ехографските и МРТ промени на 36 стави с ХА Von Drygalski и сътр. установяват, че хемосидеринът няма специфични ехографски белези и варира от хипоехогенен до хиперехогенен. Допълнително наличието му строго корелира с установяване на СХ и включването му в протоколите за оценка на ХА не допринася съществено (18).

Понастоящем четири от шестте налични скали на СЕ за оценка на ХА включват и синовиалната хиперемия, дефинирана като усилен сигнал при прилагане на цветен или пулсов Doppler. Синовиалната хиперемия отразява патогенетичния процес на неоангиогенеза, която на свой ред повишава васкуляризацията. Поради това доплер сонографията би могла да бъде отлично средство за оценка на вътреставната активност на заболяването и мониториране на терапевтичния отговор. В действителност скорошни проучвания при ПСХ демонстрират, че синовиалната тъкан изглежда общо хиповаскуларна при доплер СЕ, а в редките случаи на позитивност са налице единични „флагчета“ (6). Поради това този параметър е изключен от HEAD-US протокола, създаден след получаване на посочените данни.

Установяването на хрущялни и костни промени е задължително при оценка и мониториране на СС при ПСХ, тъй като те се явяват повратната точка за терапевтичен неуспех. Промените в хрущяла се изразяват в прогресивно изтъняване до пълна загуба, загуба на аехогенност и поява на хиперехогенност, загуба на гладки очертания и неравномерен профил, както и калцификати в хрущяла. Lamer и сътр. валидират ехографското измерване на дебелината на ставния хрущял с ниска вариационност, както и установяват добра корелация между ехографското и МРТ измерване при пациенти с ювенилен ревматоиден артрит (14).

По отношение на промените в субхондралната кост повечето протоколи за СЕ приемат като критерий единствено неправилната остеохондрална повърхност и наличието на остеофити. Визуализацията на субхондрални кисти е затруднена от отражението на ултразвуковия сигнал от костните структури, а цялостната оценка на остеохондрална повърхност е ограничена поради припокриване от надлежащите кости (7). Поради това HEAD-US протоколът фокусира върху специфични таргетни повърхности за всяка става, спекулирайки че една зона може да е показателна за дифузното остеохондрално увреждане при ПСХ (4). Тези повърхности са предния аспект на дисталната хумерусна епифиза в лакетна става, феморалната трохлея

в коляното, предния аспект на таларната шийка и купола на талуса на глезена. Допълнително изобразяването на остеохондралните повърхности може да се затрудни при наличие на остеофити с определена локализация или ограничена флексия на коляното или екстензия на лакет.

Липсата на препоръки и атласи за нормалните данни при МРТ и СЕ на съзряващите стави влошава диагностичната точност и на двата образни метода и би могло да затрудни разграничаването на минималните артропатични промени от физиологичните растежни модели (12). Keshava и сътр. провеждат първото сравнително изследване между две болници на МРТ и СЕ находките на глезени и колена при здрави деца, фокусиращо се върху количествена оценка на меките тъкани и дебелина на хрущяла в различни равнини. Резултатите показват, че възрастта оказва значително отражение върху дебелината на хрущяла през растежния период на долните крайници, но липсва такъв ефект по отношение на мекотъканните ставни измервания. Hemke и сътр. проучват коленни стави при 57 здрави деца чрез МРТ с контрастно усиляване и извеждат норми за максимална дебелина на синовиална мембрана (<1.8 mm) в ранната постконтрастна фаза, като синовията е по-задебелена около кръстните връзки и в ретропателарния и супрапателарния рецесус (11). Като други физиологични находки те изтъкват честото установяване на увеличено количество вътреставна течност, участващи на костномозъчен едем и хематопоеитичен костен мозък. Костномозъчен едем се установява много рядко при здрави деца и обикновено е локализиран в apex patellae. Участващи с хематопоеитичен костен мозък могат да се визуализират нормално в дисталната диафиза и метафиза на фемур по време на растежа. Те изглеждат като пламъковидни зони, произхождащи от костта със строго вертикални граници и със сигнални характеристики аналогични на костномозъчен едем. Ма и сътр. изтъкват следните физиологични особености в областта на глезена: персистирание на трансфизеални съдови канали в средната част на калканеуса след 18-месечна възраст; ундулираща повърхност на дисталната тибиялна физа с фокално антеромедиално краниално отклонение, наричано „гърбица на Poland“ до 15-18-годишна възраст при момчета, ундулираща латерална страна на дистална фибуларна физа със спикъли по границите, фокална перифизеална зона на костномозъчен едем при затваряне на физите при подрастващи (често свързана клинично с т. нар. растежни болки) (17).

Единични са проучванията върху сравнимостта между изследователите за СЕ при ПСХ, които валидират практическото приложение на протокола. Fischer и сътр. съобщават добра съпоставимост на резултатите от HEAD-US протокола между петима хематолози (10). Най-слаба повтаряемост

на резултатите се установява при оценка на глезенна става. Най-висока съпоставимост на данните е налице при точкуване на костните промени, следвана от хрущялната оценка и на последно място – преценката на синовията. Все пак авторите препоръчват валидиране на СЕ в сравнение с клиничното изследване, рентгенологичните и МРТ методи на изследване, както и пълния ехографски диагностичен протокол. Acharaya и сътр. сравняват СЕ с МРТ за установяване на СХ в проучване върху 33 хемофилични стави с кумулативен брой хемартрози > 2 (3). Авторите прилагат количествено измерване за СХ и приемат дебелина от 2 мм за граничен размер. Те демонстрират сравнима сензитивност на двата метода за установяване на СХ. Von Drygalski и сътр. обаче оспорват възможността на СЕ за точно разграничаване на мекотъканните промени (СХ с или без хемосидерин, разрастване на мастните възглавнички, кръвни коагулуми) (20). Противоречивите резултати на този етап налагат допълнителни сравнителни проучвания на СЕ при ПСХ преди рутинното ѝ въвеждане в проследяването на СС при ПСХ.

МРТ и СЕ са с потенциал за откриване на субкли-

нично заболяване в асимптомни или претърпели минимален брой хемартрози стави. Di Minno и сътр. установяват неподозирани промени при около 20% от изследваните клинично асимптомни стави (6). Те биха могли да резултират от множество субклинични ставни микрохеморагии, възникнали поради нисък комплайнс към предписаната терапия или необходимост от оптимизирането ѝ чрез повишаване на дозата и/или честотата на инфузии. От друга страна, подгрупа от около 10% от пациентите с тежка форма на хемофилия извяват лек хеморагичен фенотип и вероятно не се нуждаят от толкова интензивна профилактика (7). СЕ би могла да допринесе за решенията и при двата клинични сценария чрез обективно документиране на терапевтичния отговор.

В заключение, въвеждането на ехографско проследяване на ставите при ПСХ чрез стандартизиран протокол би довело до по-информирана терапевтична стратегия и съпоставимост на резултатите между отделните центрове. Комбинацията от методи за оценка на СС допринася за по-точно определяне на ставната структура и функция при индивидуалния пациент.

Таблица 1. СЕ за оценка на ХА според наличните проучвания (по Di Minno и сътр.) (7)

Автор	Излив (синовиална течност или хемартроза)	СХ	Синовиална хиперемия	Хемосидерин	Хрущялни промени	Костни промени	Сухожилия, лигаменти, бурси, нерви	Оценявани стави
Klukowska и сътр. 2001	+	+	+	-	+	+	-	Коляно
Zukotynski и сътр. 2007	+	+	-	+	+	+	-	Глезени, колена
Melchiorre и сътр. 2011	+	+	+	+	+	+	-	Лакти, колена и глезени
Muca-Perja и сътр. 2012	-	+	+	-	+	+	-	Колена и глезени
Martinoli и сътр. 2013	+ ^a	+	-	-	+	+	-	Лакти, колена и глезени
Kidder и сътр. 2015	-	+	+	-	+	+	+	Лакти, колена, глезени, рамена, тазобедрена става

а – включва се в протокола, но не в скалата за оценка поради транзитория характер.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Банчев А, Стоянова Д, Павлова А, Константинов Д. Ставно засягане при хемофилия – съвременни схващания и методи за оценка на ставния статус. *Педиатрия* 2018; LVIII (2): 16-20
2. Банчев А. Съвременни тенденции в терапията на хемофилия. Индивидуализиране на лечението според фармакокинетичните показатели и маркери от ехографско изследване на индексни стави. *Педиатрия* 2018; LVIII (3): 36-38
3. Acharya S. Exploration of the pathogenesis of haemophilic joint arthropathy: understanding implications for optimal clinical management. *Br J Haematol* 2012; 156(1): 13-23.
4. Bianchi S, Martinolli C, Bianchi-Zamorani M, et al. Ultrasound of the joints. *Eur Radiol* 2002; 12(1): 56-61.
5. Den Uijl I, De Schepper A, Camerlinck M, Grobbee D, Fischer K. Magnetic resonance imaging in teenagers and young adults with limited haemophilic arthropathy: baseline results from a prospective study. *Haemophilia* 2011; 17: 926-30.
6. Di Minno M, Iervolino S, Soscia E, et al. Magnetic resonance imaging and ultrasound evaluation of "healthy" joints in young subjects with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2013; 19 (3): e167-73.
7. Di Minno M, Ambrosino P, Quintavalle G, et al. Assessment of hemophilic arthropathy by ultrasound: where do we stand? *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(5): 541-9.
8. Doria A. Quantitative versus semiquantitative MR imaging of cartilage in blood-induced arthritic ankles: preliminary findings. *Pediatr Radiol* 2014; 44 (5): 576-86.
9. Fischer K, Poonnoose P, Dunn A, et al. on behalf of the participants of the International Symposium on Outcome measures in haemophilic arthropathy. Choosing outcome assessment tools in haemophilia care and research: a multidisciplinary perspective. *Haemophilia* 2017; 23: 11-24.
10. Fischer K, Oldenburg J, Astermark J, et al. Ultrasound evaluation of haemophilic joints by haemophilia physicians: a reliability study. *J Thromb Haemost* 2015; 13: 601
11. Hemke R, van den Berg J, Nusman C, et al. Contrast-enhanced MRI findings of the knee in healthy children: establishing normal values. *Eur Radiol* 2018; 28: 1167-74.
12. Keshava S, Gibikote S, Doria A. Imaging evaluation of hemophilia: musculoskeletal approach. *Semin Thromb Hemost* 2015; 41(8): 880-93.
13. Klukowska A, Czyrny Z, Laguna P, et al. Correlation between clinical, radiological and ultrasonographic image of knee joints in children with haemophilia. *Haemophilia* 2001; 7: 286 – 92.
14. Lamer S, Sebag G. MRI and ultrasound in children with juvenile chronic arthritis. *Eur J Radiol* 2000; 33: 85-93.
15. Lundin B, Berntorp E, Pettersson H, et al. Gadolinium contrast agent is of limited value for magnetic resonance imaging assessment of synovial hypertrophy in haemophiliacs. *Acta Radiol* 2007; 48(5): 520-30.
16. Lundin B, Manco-Johnson M, Ignas D, et al. An MRI scale for assessment of haemophilic arthropathy from the International Prophylaxis Study Group. *Haemophilia* 2012; 18(6): 962 – 70.
17. Ma G., Ecklund K. MR Imaging of the Pediatric Foot and Ankle: What Does Normal Look Like? *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America* 2017; 25(1): 27-43
18. Martinolli C, Alberighi O, Minno G, Graziano E, Molinari A, et al. Development and definition of a simplified scanning procedure and scoring method for Haemophilia Early Arthropathy Detection with Ultrasound (HEAD-US). *Thromb Haemost* 2013; 109: 1170-9.
19. Rodriguez-Merchan E, Orbe A, Gago J. Ultrasound in the diagnosis of the early stages of hemophilic arthropathy of the knee. *Acta Orthopaedica Belgica* 1992; 58 (2): 122-5.
20. Von Drygalski A, Moore R, Nguyen S, et al. Advanced haemophilic arthropathy: sensitivity of soft tissue discrimination with musculoskeletal ultrasound. *J Ultrasound Med* 2018; 37: 1945-56.

Пълната библиографска справка от 201 литературни източника е на разположение у автора.

ДИАСТОЛНА ДИСФУНКЦИЯ И КАРДИОМИОПАТИЯ ПРИ СЪРПОВИДНОКЛЕТЪЧНА АНЕМИЯ

Димова М.¹, Калева В.², Ненова К.¹, Кашлов Я.¹

1 – Клиника по Вътрешни болести, УМБАЛ „Св. Марина“-Варна

2 – Клиника по детска хематология и онкология, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

DIASTOLIC DYSFUNCTION AND CARDIOMYOPATHY IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA

Dimova M¹, Kaleva V.², Nenova K.¹, Kashlov Y.¹

1 – Clinic of Internal Medicine, University Hospital «St. Marina», Varna,

2 – Clinic of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital «St. Marina»f Varna

Резюме. Наследствените нарушения в синтеза на хемоглобина, наричани хемоглобинопатии, са най-честите моногенни заболявания, водещи до хемолитични анемии. Сърдечно-съдовите усложнения са главна причина за болестност и детерминанти на прогнозата при пациенти със сърповидноклетъчна анемия (СКА). Това са пациенти, които се нуждаят от медицинска грижа, започваща с раждането и продължаваща през целия им живот, изискваща голям медицински и социален ресурс. Нарушение в диастолната левокамерна функция се среща много по-често от систолна дисфункция при пациенти със СКА и е оценено като независим рисков фактор за смърт при тези пациенти. Кардиомиопатията при СКА е рестриктивна кардиомиопатия, характеризираща се с диастолна дисфункция и левопредсърдна дилатация в съчетание с хипердинамично състояние и дилатация на лявата камера със запазена систолна функция.

Abstract. Hereditary disorders in hemoglobin synthesis – hemoglobinopathies, are the most common monogenic diseases causing haemolytic anemias. Cardiovascular complications are the major cause of morbidity and determinants the prognosis patients with sickle-cell anemia. These patients need permanent health care from very beginning of their life, and they consume great medical and social resources. The diastolic dysfunction of the left ventricle is much more common than systolic dysfunction in patients with sickle-cell anemia and is considered to be an independent factor for mortality in these patients. Cardiomyopathy of sickle cell anemia is a restrictive cardiomyopathy characterized by diastolic dysfunction and left atrial dilation in combination with hyperdynamic state and left ventricular dilatation

Наследствените нарушения в синтеза на хемоглобина, наричани хемоглобинопатии, са най-честите моногенни заболявания, водещи до хемолитични анемии. По данни на Световната здравна организация (WHO 1989,1994) носителите на генетичните нарушения по света са над 270 милиона и над 300 000 деца се раждат ежегодно с някоя форма на таласемия или със структурно увреждане на хемоглобина (1).

Сърповидноклетъчната анемия (СКА) засяга предимно хора с африкански произход, но се среща също в Близкия Изток, източното средиземноморие, Индия, Карибския басейн, централна и южна Америка (2), до 10% от афро-американското население в САЩ (3). В Англия, СКА засяга 1 на 2000 раждания и се изчислява на 125000-15000 пациента.

Изключително високата честота на хемоглобинопатии в сравнение с други моногенни болести отразява естествената селекция на тези пациенти, заради относителната им резистентност към маларийния плазмодий. Значение имат също близкородствени бракове, нарастваща възраст на раждащите жени в развиващите се страни, генни мутации (3, 4).

Основният дефект при таласемичните синдроми е свързан с намалена или пълна липса на синтез на една или повече глобинови вериги. При СКА дефекта е качествен и се дължи на точкова мутация в гена, кодиращ синтеза на β -глобиновата верига в хромозома 11. Става замяна на намиращата се на шеста позиция в β -полипептидната верига глутаминова киселина с аминокиселината валин. Това довежда до синтез на патологичен хемог-

лобин S (HbS) (2). Той е по-трудно разтворим, има бавна електрофоретична подвижност и намалено свързване с кислород.

У хетерозиготните носители хемоглобинът се състои в 30 – 40 % от HbS, количеството на HbA2 е нормално, а HbA1 е намален. Тези хора обикновено нямат симптоми и не знаят, че са носители на патологичен хемоглобин. У хомозиготите HbS е около 80 %, а останалите 20 % се състоят от HbF и малко количество HbA2. Хемоглобин A1 липсва.

В условията на хипоксия HbS изкрystalизира в дълги иглести кристали, които придават сърповидна форма на еритроцитите. Те стават ригидни, затруднено е придвижването им в микроциркулацията, разрушават се лесно в кръвоносните съдове и слезката, при което се развива хемолитична анемия.

Сърдечно-съдовите заболявания са главна причина за болестност и детерминанти на прогнозата при пациенти със СКА (5, 6, 7). Същевременно, това са пациенти, които се нуждаят от медицинска грижа, започваща с раждането и продължаваща през целия им живот, изискващ голям медицински и социален ресурс. В последните десетилетия напредъка и подобряването на прогнозата и медицинската грижа са толкова значими, че вече се смята, че при правилното им приложение се очаква пациентите да имат продължителност на живота, близка до тази на останалото население и да създават и отглеждат свои собствени семейства (8, 9, 10, 11). Заради сходствата в патофизиологичните пътища на засягане на сърдечно-съдовата система при хемоглобинопатиите, Farmakis et al. изграждат един унифициран подход към развитието на тези увреждания с цел по-доброто им разпознаване, преследяване, изучаване и лечение (12), представени на фиг.1.

Фиг.1. Основни форми на сърдечно засягане при хемоглобинопатиите и съответните патогенетични механизми, по Farmakis (12)



Нарушение в диастолната левокамерна функция се среща много по-често от систолна дисфункция при пациенти със СКА (13, 14, 15, 16) и е оценено като независим рисков фактор за смърт при тези пациенти (15). Това е и една от най-честите причини за пулмонална хипертония (ПХ) при тях (17). Честотата и тежестта на диастолната дисфункция варира в различните проучвания от 11 до 77% в зависимост от използваните критерии. Независимо от това, най-често използваните показатели за диастолна дисфункция – съотношението E/A, тъканни миокардни скорости на митралния анулус и на латералната стена и обема на лявото предсърдие, са патологично променени и директно корелират със смъртността при пациенти със СКА (18, 15, 19, 20). Чрез пропорционален регресионен

анализ е установена сигнификантна корелация между следните показатели и ранна смъртност: за E/A ($p<0,001$), за пиковата ранна диастолна скорост E ($p=0,002$), за децелерационното време ($p=0,002$) и за тъканния Доплер Em/Am ($p=0,026$). Диастолната дисфункция се развива рано и може да бъде установена още в детска възраст (21, 22, 23). Причините за това ранно настъпващо изменение не са напълно установени, но е сигрно, че не са резултат от чести кръвопреливания и претоварване с желязо (24, 25), както е при пациентите с таласемия майор (4).

По-ново проучване на Niss и съавт. от 2017 г. изследва диастолната функция при пациенти със СКА ($n=25$, средна възраст 23 ± 13 години) и връзката ѝ с миокардната фиброза, оценена

чрез определяне на екстра целуларния обем при провеждане на ядрено-магнитен резонанс (26). Изследователите установяват, че екстрацелуларния обем е значимо увеличен при всички пациенти в сравнение с контролите ($p < 0,0001$), което е показател за дифузна миокардна фиброза. 71% от пациентите имат по един нарушен показател за диастолна функция, но само 29% отговарят на дефиницията за диастолна дисфункция. Тези, които са с диастолна дисфункция имат по-голям екстрацелуларен обем (0.49 ± 0.07 към 0.37 ± 0.04 , $p = 0,01$), по-висока стойност на NT-proBNP (191 ± 261 към 33 ± 33 пг/мл, $p = 0,04$) и по-нисък хемоглобин (8.4 ± 0.3 към 10.9 ± 1.4 г/дл, $p = 0,004$) в сравнение с пациентите с нормална диастолна функция. Пациентите с най-голям екстрацелуларен обем (≥ 0.40) са с по-голяма склонност към диастолна дисфункция ($p = 0,003$) и увеличен левопредсърден обем (57 ± 11 към 46 ± 12 мл/м², $p = 0,04$) в сравнение с тези, при които екстрацелуларния обем е $< 0,4$. Екстрацелуларният обем също така корелира със стойността на хемоглобина ($r = -0,46$, $p = 0,03$) и със стойността на NT-proBNP ($r = 0,62$, $p = 0,001$). Авторите заключват, че дифузната миокардна фиброза, определена чрез изчисление на екстрацелуларния обем, е честа и до скоро подценявана характеристика при пациентите със СКА, която се асоциира с диастолната дисфункция, тежестта на анемията и по-високите нива на NT-proBNP. Това може би е подлежащият механизъм, водещ до диастолна дисфункция.

Още по-далеч в търсене на молекулярните патофизиологични механизми на развитие на специфичната форма на кардиомиопатия при СКА отиват авторите, които в своите проучвания използват миши модели като ги подлагат на обстойни кардиологични изследвания, включващи електрокардиограма, ЯМР, хистопатологичен и молекулярен анализ за оценка на миокардната дисфункция (27). Те установяват прогресивно увеличаване на лявото предсърдие, диастолна дисфункция от рестриктивен тип и запазена фракция на изтласкване. Развитието на рестриктивна кардиомиопатия се асоциира със загуба на кардиомиоцити, последвано от увеличение на фиброзата, установено чрез увеличение на екстрацелуларния обем. Промени, наблюдавани на ултраструктурно ниво в митохондриите са характерни за тежка хронична исхемия и дължината на саркомерите е намалена. Активирани са гените, отговорни за ангиогенезата, екстрацелуларния матрикс, циркадният ритъм, оксидативния стрес и хипоксията, докато тези, отговарящи за транспорта през йонните канали и проводната функция на сърцето са с намалена експресия. Наблюдавани са прогресивно удължаване на коригирания QT-интервал, аритмии и исхемични промени преди да настъпи внезапна сърдечна смърт. Тези резултати при миши модели, биха могли да обяснят сърдечните нарушения и внезапната сърдечна смърт, наблюдавани при

пациенти със СКА (27).

Niss и съавт, 2016 година (16) обсъждат и предлагат наличието на специфична, рестриктивна форма на кардиомиопатия при СКА, насложена върху хипердинамичното състояние. Техните твърдения се базират на данни от метаанализ върху проучвания, изследващи сърдечните нарушения при пациенти със СКА, както и собствени данни от ехокардиографско изследване на 134 млади пациенти с това вродено заболяване (28). Основните характеристики на свързаната със СКА кардиомиопатия, са диастолна дисфункция, левопредсърдна и левокамерна дилатация и нормална систолна функция. Това, което я отличава от първичната рестриктивна кардиомиопатия (РКМП) е дилатацията на лявата камера, която не се наблюдава при идиопатичната РКМП. В действителност, в дефиницията за РКМП (29) е изключена левокамерната дилатация, но това е, за да се отграничи от дилатативната кардиомиопатия (ДКМП). И докато нормалният или намален размер на камерата е характерен белег за РКМП, отличаващ го от ДКМП със систолна дисфункция, при СКА има левокамерната дилатация и нормална или дори повишена фракция на изтласкване (28). Така при пациентите със СКА има едновременно увеличен размер на лявата камера, характерен за хипердинамично състояние и белези за левокамерна рестрикция. Този специфичен тип кардиомиопатия би могла да обясни клиничните характеристики на сърдечно увреждане при пациентите със СКА, включително и внезапната сърдечна смърт.

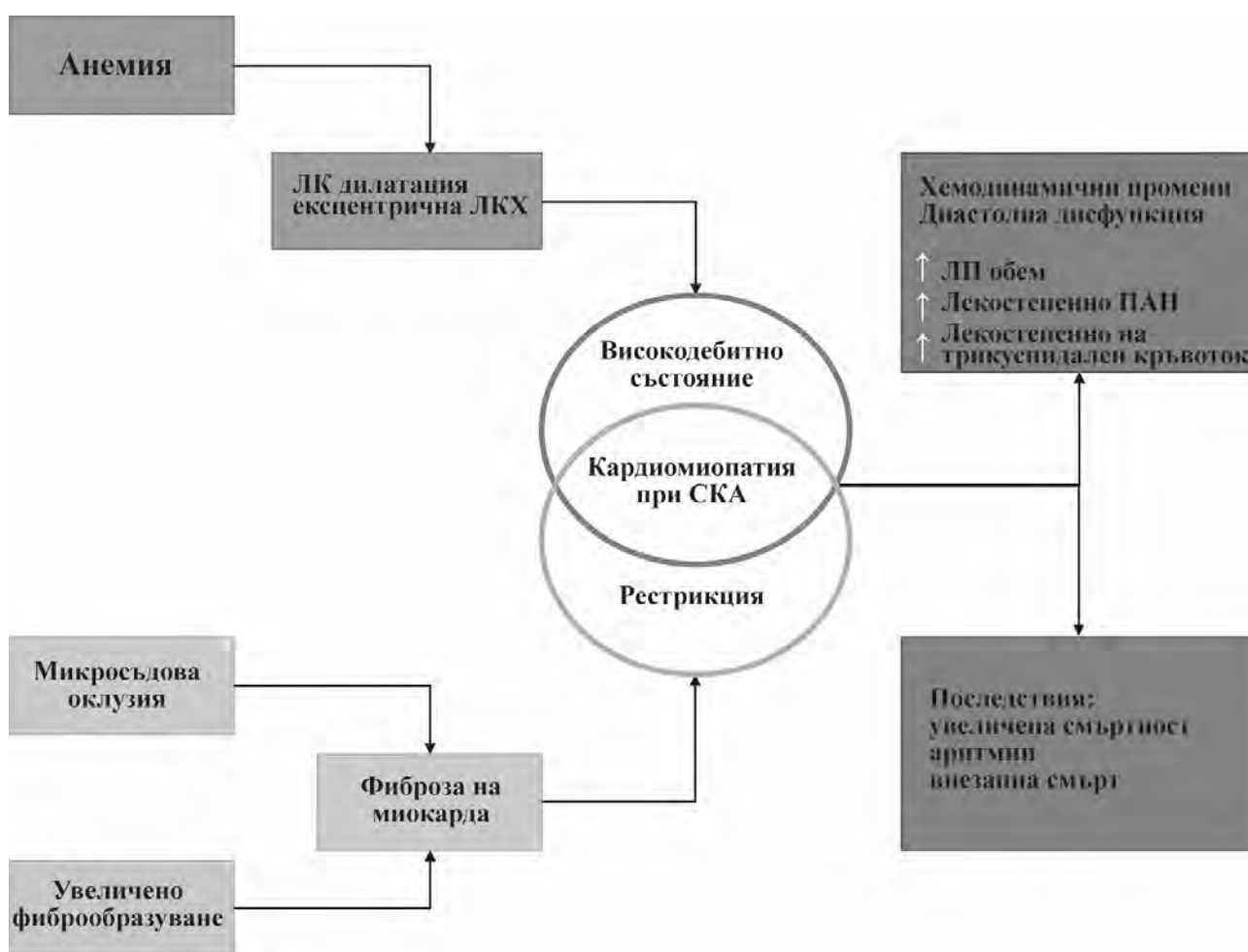
В ехокардиографското проучване на Niss и съавт. (16) диастолната дисфункция и дилатацията на лявото предсърдие са често срещани. Диастолна дисфункция от релаксационен тип, с намалено съотношение E/A се установява в над 80% от пациентите над 18-годишна възраст, а тежка степен на диастолна дисфункция с абнормно съотношение E/e' на латералната стена и септума – в 8% и 14% съответно. Левопредсърдна дилатация има в 62% от пациентите и това се оказва най-силно дилатираната сърдечна кухина. Отчетени са също увеличения на лявата камера и левокамерна хипертрофия, но дилатацията на лявото предсърдие е непропорционално на левокамерната дилатация, което идва да покаже, че механизмите, водещи до дилатиране на двете сърдечни кухини са различни. Сistolната функция е съхранена, резултат, установяван и при други проучвания (30).

Същият тип ехокардиографска характеристика се потвърждава и от резултатите от метаанализ с над 5000 пациента със СКА от 68 различни проучвания (16). По-често срещаните увеличени размери на лявата камера при метаанализа се обяснява с това, че в него има по-възрастни пациенти с по-изразена анемия, докато в проучването на Niss са включени пациенти на възраст 3-22 години. Потвърждава се и резултата за лявото предсърдие

– първата сърдечна кухина, която се дилатира, преди всички останали (31, 32). В хода на заболяването, левокамерната хипертрофия и дилатация стават по-изразени, заради хроничното обемно натоварване (33) и в този стадий на развитие кардиомиопатията при СКА се характеризира с дилатация на четирите сърдечни кухини, диастолна дисфункция и нормална систолна функция (34). Но рестриктивният тип хемодинамика, която е важна и ранно настъпваща характеристика при СКА, може да бъде маскирана след развитието на дилатация на четирите кухини с напредване на възрастта. Увеличените налягания на пълнене на лявата камера и увеличеното налягане в лявото предсърдие неминуемо водят до леко-степенна ПХ и увеличение на скоростта на регургитационния кръвоток през трикуспидалната клапа. И тъй като скоростта на регургитационния кръвоток е значимо асоциирана с белезите на рестрикция при пациентите със СКА – диастолна дисфункция, левопредсърдна дилатация, се смята, че тя е по-скоро маркер за наличие на РКМП при СКА, отколкото белег на първична ПХ (16).

На фиг. 2. е представена схема на патофизиологичните механизми, водещи до развитие на РКМП при пациенти със сърповидноклетъчна анемия.

Фиг. 2. Патофизиологичните механизми, водещи до развитие на РКМП при пациенти със сърповидноклетъчна анемия, по Niss (28)



АУТОПСИОННИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА МИОКАРДА И ДАННИ ОТ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНО ИЗСЛЕДВАНЕ.

Натрупването на желязо в миокардните клетки, оценено чрез ядреномагнитен резонанс (ЯМР) е рядко срещано при пациентите със СКА и не се приема като причина за миокардна дисфункция, дори когато има системно натоварване с желязо (34). Но

магнитно-резонансното изследване дава ценна информация относно фиброзното отлагане в миокарда, използвайки техниката на късното гадолинево отлагане (35). Фиброзни отлагания в миокарда на пациентите със СКА има до ¼ от изследваната популация (36, 37, 38).

Не са много и проучванията, които дават хистопатологични данни, получени чрез аутопсия, но това, което е изяснено е, че сърдечните кухини са уве-

личени, увеличена е масата на сърдечния мускул, увеличени са фиброзните отлагания (34, 39), както и морфологични промени по белодробното съдово русло (40). Повишеното фиброзно отлагане е по няколко типа: трансмурално, но без данни за атеросклеротично заболяване, разпръснати „patchy“ фиброзни локуси, дифузна миокардна фиброза и фиброзни фокуси, обхващащи проводната система, които са патоморфологичния субстрат на настъпващите аритмии (34).

В обобщение може да се каже, че кардиомиопатията при СКА е РКМП, характеризираща се с диастолна дисфункция и левопредсърдна дилатация в съчетание с хипердинамично състояние и дилатация на лявата камера със запазена систолна функция. Последва се от покачване на налягането в системата на белодробните вени, пулмокапиллярното налягане, лекостепенно увеличение на скоростта на регургитационния кръвоток през трикуспидалната клапа и пулмонална хипертония. Към тези хемодинамични нарушения, които се срещат при повечето пациенти със СКА, може да се насложи и пулмоартериална хипертония (потвърдена с дясна сърдечна катетеризация) с ниско пулмокапиллярно налягане и повишена белодробна съдова резистентност, вероятно заради налична ендотелна дисфункция (17). При по-голямата част от пациентите, сърдечните увреждания могат да се обяснят с тази специфична форма на РКМП. Още повече, че се откриват прилики между причините и честотата за смъртност при пациентите със СКА и другите видове РКМП – аритмии и внезапна сърдечна смърт (16).

Адрес за кореспонденция

Д-р Мария Димова

УМБАЛ „Св. Марина“,

Клиника по Вътрешни болести.

9010, Варна, бул. „Христо Смирненски“,

e-mail: mdimovabg@yahoo.fr

Address for correspondence:

Maria Dimova, MD

University Hospital “St. Marina”

Internal Medicine Clinic

9010, Varna, 1, “Hristo smirnenki”bul.,

e-mail: mdimovabg@yahoo.fr

БИБЛИОГРАФИЯ:

- Bernini L. Geographic distribution of alpha- thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, ed. Disorders of Haemoglobin. First edition. Cambridge, 2001:878–94
- Standards for Clinical Care of Adults with Sickle Cell Disease in the UK, 2nd edition, 2018
- Capellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V, Guidelines for the treatment of transfusion dependent thalassemia (TDT), 3rd edition 2014
- Kremastinos DT, Farmakis D, Aessopos A, Hahalis G, Hamodraka E, Tsiapras D, Keren A. Beta-thalassemia cardiomyopathy: history, present considerations, and future perspectives. *Circ Heart Fail* 2010
- Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* 2004;350:886–895
- Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med* 2008;359:2254–2265.
- Fitzhugh, CD, Lauder, N, Jonassaint, JC, et al. Cardiopulmonary complications leading to premature deaths in adult patients with sickle cell disease. *American Journal of Hematology*. 2010;85:36–40. DOI: 10.1002/ajh.21569
- Modell B, Khan M, Darlison M, Westwood MA, Ingram D, Pennell DJ. Improved survival of thalassemia major in the UK and relation to T2* cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* 2008;10:42
- Davis BA, O'Sullivan C, Jarritt PH, Porter JB. Value of sequential monitoring of left ventricular ejection fraction in the management of thalassemia major. *Blood* 2004;104:263–269.
- Quinn, CT, Rogers, ZR, McCavit, TL, et al. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood*. 2010;115:3447–3452. DOI: 10.1182/blood-2009-07-233700.
- Lanzkron, S, Carroll, CP, Haywood, C, Jr. Mortality rates and age at death from sickle cell disease: U.S., 1979–2005. *Public Health Reports*. 2013;128:110–116
- Farmakis D, Triposkiadis F, Lekakis J, Parissis J. Heart failure in haemoglobinopathies: pathophysiology, clinical phenotypes, and management. *Eur J Heart Fail* 2017; 19: 479–489
- Gladwin MT. Cardiovascular complications and risk of death in sickle-cell disease. *Lancet* 2016;387:2565–2574.
- Lorch D, Spevack D, Little J. An elevated estimated pulmonary arterial systolic pressure, whenever measured, is associated with excess mortality in adults with sickle cell disease. *Acta Haematol* 2011;125:225–229
- Sachdev V, Machado RF, Shizukuda Y, et al. Diastolic dysfunction is an independent risk factor for death in patients with sickle cell disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:472–479.
- Niss, O, Quinn, CT, Lane, A, et al. Cardiomyopathy with restrictive physiology in sickle cell disease. *JACC Cardiovascular Imaging*. 2016;9:243–252. DOI: 10.1016/j.jcmg.2015.05.013.
- Gordeuk, VR, Castro, OL, Machado, RF. Pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2016;127:820–828. DOI: 10.1182/blood-2015-08-618561
- Sachdev V, Kato GJ, Gibbs JS, et al. Echocardiographic markers of elevated pulmonary pressure and left ventricular diastolic dysfunction are associated with exercise intolerance in adults and adolescents with homozygous sickle cell anemia in the United States and United Kingdom. *Circulation* 2011;124:1452–1460.
- Cabrita, IZ, Mohammed, A, Layton, M, et al. The association between tricuspid regurgitation velocity and 5-year survival in a North West London population of patients with sickle cell disease in the United Kingdom. *British Journal of Haematology*. 2013;162:400–408. DOI: 10.1111/bjh.12391.
- Hankins, JS, McCarville, MB, Hillenbrand, CM, et al. Ventricular diastolic dysfunction in sickle cell anemia is common but not associated with myocardial iron deposition. *Pediatric Blood & Cancer*. 2010;55:495–500. DOI: 10.1002/pbc.22587.
- Hankins, JS, McCarville, MB, Hillenbrand, CM, et al. Ventricular diastolic dysfunction in sickle cell anemia is common but not associated with myocardial iron deposition. *Pediatric Blood & Cancer*. 2010;55:495–500. DOI: 10.1002/pbc.22587
- Blanc, J, Stos, B, de Montalembert, M, et al. Right ventricular systolic strain is altered in children with sickle cell disease. *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography*. 2012;25:511–517. DOI: 10.1016/j.echo.2012.01.011.
- Zilberman, MV, Du, W, Das, S, et al. Evaluation of left ventricular diastolic function in pediatric sickle cell disease patients. *American Journal of Hematology*. 2007;82:433–438. DOI: 10.1002/ajh.20866.
- Meloni, A, Puliyl, M, Pepe, A, et al. Cardiac iron overload in sickle-cell disease. *American Journal of Hematology*. 2014;89:678–683. DOI: 10.1002/ajh.23721.
- Wood, JC. Cardiac iron across different transfusion-dependent diseases. *Blood Reviews*. 2008;22(Suppl 2):S14–S21. DOI: 10.1016/S0268-960X(08)70004-3.
- Niss O, Fleck R, Makue F, et al. Association between diffuse myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in sickle cell anemia. *Blood* 2017;130(2):205–213
- Baker N, James J, Roy S, et al. Sickle cell anemia mice develop a unique cardiomyopathy with restrictive physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:E5182–E5191

28. Niss O, Quinn C, *The Cardiomyopathy of Sickle Cell Disease*, chapter 6, IntechOpen
29. Falk R, Hershberger R, eds. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 10th ed. Chapter 65, Philadelphia, PA, USA: Saunders; 2015
30. Poludasu, S, Ramkissoon, K, Saliccioli, L, et al. Left ventricular systolic function in sickle cell anemia: A meta-analysis. *Journal of Cardiac Failure*. 2013;19:333–341.
31. Blanc, J, Stos, B, de Montalembert, M, et al. Right ventricular systolic strain is altered in children with sickle cell disease. *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography*. 2012;25:511–517
32. Caldas, MC, Meira, ZA, Barbosa, MM. Evaluation of 107 patients with sickle cell anemia through tissue doppler and myocardial performance index. *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography*. 2008;21:1163–1167
33. Poludasu, S, Ramkissoon, K, Saliccioli, L, et al. Left ventricular systolic function in sickle cell anemia: A meta-analysis. *Journal of Cardiac Failure*. 2013;19:333–341
34. Desai, AA, Patel, AR, Ahmad, H, et al. Mechanistic insights and characterization of sickle cell disease-associated cardiomyopathy. *Circulation Cardiovascular Imaging*. 2014;7:430–437
35. Doltra, A, Amundsen, BH, Gebker, R, et al. Emerging concepts for myocardial late gadolinium enhancement mri. *Current Cardiology Reviews*. 2013;9:185–190
36. Bratis, K, Kattamis, A, Athanasiou, K, et al. Abnormal myocardial perfusion-fibrosis pattern in sickle cell disease assessed by cardiac magnetic resonance imaging. *International Journal of Cardiology*. 2013;166:e75–76
37. Junqueira, FP, Fernandes, JL, Cunha, GM, et al. Right and left ventricular function and myocardial scarring in adult patients with sickle cell disease: A comprehensive magnetic resonance assessment of hepatic and myocardial iron overload. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*. 2013;15:83
38. Nguyen, KL, Tian, X, Alam, S, et al. Elevated transpulmonary gradient and cardiac magnetic resonance-derived right ventricular remodeling predict poor outcomes in sickle cell disease. *Haematologica*. 2016;101:e40–43.
39. Darbari, DS, Kple-Faget, P, Kwagyan, J, et al. Circumstances of death in adult sickle cell disease patients. *American Journal of Hematology*. 2006;81:858–863
40. Haque, AK, Gokhale, S, Rampy, BA, et al. Pulmonary hypertension in sickle cell hemoglobinopathy: A clinicopathologic study of 20 cases. *Human Pathology*. 2002;33:1037–1043.

ЧЕСТОТА, ДИАГНОЗА И ЛЕЧЕНИЕ НА ПУЛМОНАЛНА ХИПЕРТОНИЯ ПРИ СЪРПОВИДНОКЛЕТЪЧНА АНЕМИЯ

Димова М.¹, Калева В.², Стоянова Л.¹, Кашлов Я.¹, Костуркова М.¹

1 – Клиника по Вътрешни болести, УМБАЛ „Св. Марина“-Варна

2 – Клиника по детска хематология и онкология, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

INCIDENCE, DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PULMONARY HYPERTENSION IN PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA

Dimova M.¹, Kaleva V.², Nenova K.¹, Kashlov Y.¹

1 – Clinic of Internal Medicine, University Hospital «St. Marina», Varna,

2 – Clinic of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital «St. Marina»f Varna

Резюме. Сърповидно-клетъчната анемия (СКА) е рядко срещано вродено състояние, при което сърдечно-съдовите усложнения са чести и определящи качеството и продължителността на живот на пациентите. Честотата на пулмонална хипертония (ПХ) при пациенти със СКА, оценена ехокардиографски със скорост на кръвотока през трикуспидалната клапа $\geq 2,5$ м/с е около 20-30% (4, 5) и се асоциира с повишен риск от смъртност (6, 7). Механизмите на развитие и формите на ПХ при пациентите със СКА са сложни и многообразни, и спадат към 5-та група в подробната клинична класификация на ПХ в Препоръките на Европейското кардиологично дружество/Европейското респираторно дружество (ESC/ERS) от 2015 за диагностика и лечение на ПХ.

Abstract. Sickle-cell anemia is a rare congenital condition with common cardiovascular complications which determine the quality of life and life expectancy of the patients. The incidence of pulmonary hypertension in patients with sickle cell anemia evaluated by the velocity of the regurgitant jet of the tricuspid valve above 2.5 m / s is approximately 20-30% and is associated with an increased risk of mortality. Mechanisms of Pulmonary Hypertension (PH) in patients with sickle cell anemia are complex and multifactorial and this form of PH is placed in group 5 in the detailed clinical classification of pulmonary hypertension in the European Society of Cardiology / European Respiratory Society Recommendations (ESC / ERS) 2015 for diagnosis and treatment of pulmonary hypertension.

Най-честите усложнения и причина за смърт при пациенти със сърповидно-клетъчна анемия (СКА) са кардиопулмоналните и включват сърдечна недостатъчност (СН) и ритъмни нарушения (1).

В своето петгодишно проследяване (2000-2005) на 240 пациенти в специализиран център за пациенти със СКА към Университета Дюк, Fitzhugh и съавт. (1) докладват, че за този период умират 43 пациента по равно от двата пола. Поради сърдечни причини умират 25,6%, от белодробни – 14%, 32,6% от други причини, свързани със заболяването, 14% по неизвестни причини и 14% общо от други причини. Сърдечен арест, белодробна тромбемболия, мултиорганна недостатъчност и инсулт са сред най-честите причини за смърт. Сред починалите пациенти най-честите преморбидни състояния са кардио-пулмонални: остър гръден синдром/пневмония 58,1%, пулмонална хипертония 41,9%, системна хипертония 25,6%, застойна сър-

дена недостатъчност 25,6%, миокарден инфаркт 20,9% и аритмии 14%. За внезапна и неясна смърт до 40% са докладвани данни и от аутопсионно изследване (2).

Пулмоналната хипертония (ПХ) при пациенти със СКА спада към 5-та група в подробната клинична класификация на ПХ в Препоръките на Европейското кардиологично дружество/Европейското респираторно дружество (ESC/ERS) от 2015 за диагностика и лечение на ПХ – „пулмонална хипертония с неясни и/или многофакторни механизми“ и по-точно 5.1. “Хематологични болести: хронична хемолитична анемия, миелопролиферативни болести, спленектомия“ (3). Механизмите на развитие на ПХ в тази група заболявания, включително и при СКА не са добре установени и може да включват като причини пулмонална вазоконстрикция, пролиферативна васкулопатия, външна компресия, вътрешна оклузия, високодебитна СН,

съдова облитерация и левостранна СН (3). Вероятно значение има и факта, че при една част от пациентите е извършена спленектомия или е налице нарушена функция на слезката, което увеличава риска от тромбемболизъм и развитие на хронична тромбемболична пулмонална хипертония (ХТЕПХ).

Честотата на ПХ при пациенти със СКА, оценена ехокардиографски със скорост на кръвотока през трикуспидалната клапа $\geq 2,5$ м/с е около 20-30% (4,5) и се асоциира с повишен риск от смъртност (6, 7). Въз основа на тези натрупани познания през последните години ясно се обособяват няколко сърдечно-съдови показателя и съответни биомаркери, които са силно свързани с намален физически капацитет и повишен риск от смъртност при пациенти със СКА (8, 9). Това са: 1. ПХ – прекапиларна и посткапиларна, потвърдена чрез дясна сърдечна катетеризация; 2. Увеличено систолно налягане в артерия пулмоналис, оценена чрез Доплер ехокардиография по скоростта на трикуспидалния регургитационен джет; 3. Ехокардиографски белези за левокамерна диастолна дисфункция, изследвана чрез конвенционална и тъканна Доплер ехокардиография; 4. Увеличени стойности на NT-proBNP; 5. Увреждащия ефект на хроничната хемоглобинурия с развитие на протеинурия, макроалбуминурия и хронично бъбречно заболяване. Тези показатели са валидирани при големи кохорти от пациенти със СКА и подпомагат идентифицирането на пациенти с повишен риск от болестност и смъртност и позволяват предприемането на терапевтични стъпки, за да се подобри преживяемостта на тези пациенти (8).

Механизмите на развитие и формите на ПХ при пациентите със СКА са сложни и многообразни, поради което през 2014 година е издаден консенсусен документ на Американската торакална асоциация за диагноза, рискова стратификация и лечение на ПХ при пациенти със СКА (10). Една от формите е пулмонална артериална хипертония, причинена от прогресивно увеличение на белодробната съдова резистентност, пролиферация на гладкомускулни клетки и интимални клетки, формиране на ин ситу тромбози, които водят до облитерация на пулмоналните артериоли и до увеличение на пулмоналната съдова резистентност (11). Това се последва от прогресивна десностранна СН и намален физически капацитет. Така за пулмонална артериална хипертония се приема увеличение на средното пулмоартериално налягане ≥ 25 mm Hg, при крайно теледиастолно налягане на лявата камера ≤ 15 mm Hg и белодробна съдова резистентност ≥ 3 Wood единици, което показва увеличение на прекапиларното пулмонално налягане (12). Другата форма на ПХ при пациенти със СКА е свързана с увеличени налягания на пълнене на лявата камера при систолна и диастолна СН (8). Първата форма спада към група 1 от хемодинамичната класификация на СЗО за ПХ, а втората форма – към група 2 от същата класификация. И двете форми са независими рискови показатели за прогноза в тази популация.

533 пациента със СКА са проследени за 4,4 години, проведени са 86 десни сърдечни катетеризации при съмнение за ПХ в най-голямото проучване, проведено от националния здравен институт National Institutes of Health (NIH) (6, 13, 14) в САЩ. От тези 86 пациента, при 56 диагнозата е потвърдена чрез дясна сърдечна катетеризация, което е 10,5% от всички пациенти. От тях, 56,4% са с прекапиларна пулмоартериална хипертония, пулмокапиларно налягане < 15 mmHg (1 група, съобразно хемодинамичните параметри), останалите имат пулмонална венозна хипертония с пулмокапиларно налягане > 15 mm Hg (група 2 по хемодинамични параметри). Сравнението между двете групи показва съществено намаление на минутния обем и по-малко разстояние, изминато при 6-минутния тест с ходене при пациентите, при които ПХ е потвърдена чрез десностранна сърдечна катетеризация (ДСК) (8). Между групата с доказана ПХ и останалите пациенти, при които не е провеждана дясна сърдечна катетеризация, са налице сигнификантни разлики и в някои лабораторни показатели: по-високи стойности на креатинин, лактат-дехидрогеназа, директен билирубин и феритин и по-ниски на хемоглобин, което подчертава факта, че ПХ при пациенти със СКА се асоциира с другите рискови фактори като тежест на хемолитичната анемия, хронична бъбречна недостатъчност и претоварване с желязо.

Сходна честота от 6 до 10% и почти по равно разделяне на причините за ПХ – прекапиларна и посткапиларна се потвърждава и от още две проучвания в тази популация пациенти чрез приложение на дясна сърдечна катетеризация (15, 16).

ПХ, СЛЕДСТВИЕ ОТ СН СЪС ЗАПАЗЕНА ФИ И КОМБИНИРАНА ПРЕ- И ПОСТКАПИЛАРНА ПХ

При пациентите със СКА се срещат и двата вида СН – със запазена и с редуцирана фракция на изтласкване (ФИ), като първия вид е по-чест. Според по-нови данни, пациентите със СН със запазена ФИ развиват по-тежка вазоконстрикция и интимална и гладкомускулна пролиферация, което е последвано от развитие на прекапиларна и постакапиларна ПХ (17, 18). Тежестта на прекапиларната ПХ се определя от стойността на транспулмоналния градиент на налягането, което е разликата между средното пулмоартериално налягане и крайното теледиастолно налягане в лявата камера, което пък е оценявано най-често чрез пулмокапиларното налягане или от стойността на пулмоналната съдова резистентност. Тази форма на комбинирана прекапиларна и постакапиларна ПХ спада в група 2 на хемодинамичната класификация на СЗО и е с по-лоша прогноза от наличие единствено на постакапиларна ПХ, доказано както за пациенти със СКА, така и в общата популация (14, 18).

Хроничната тромбемболична ПХ (група 4 на хемо-

динамичната класификация на СЗО) се причинява от репетитивни белодробни емболии с вторично ремоделиране на съдовата стена. Честотата на венозния тромбемболизъм при пациенти със СКА е 5,2/1000 пациентогодини (19), а честотата на белодробния тромбемболизъм е по-висока от тази на останалото население в общата популация (20). Диагностичните методи за потвърждаване на тази етиология на ПХ са компютърната томография (КТ) или вентилационно-перфузионна сцинтиграфия. В проучване с 24 пациента с ПХ, потвърдена с ДСК на Anthi и съавт. (21), при 6 пациенти, вентилационно-перфузионната сцинтиграфия е с висока вероятност за тромбемболия, а при трима чрез КТ се потвърждава хроничната тромбемболична ПХ. Оценяването на ПХ при пациенти със СКА чрез вентилационно-перфузионна сцинтиграфия и/или КТ се препоръчва с цел избор на подходяща терапия (22).

И така, основавайки се на факта, че при пациенти със СКА механизмите на развитие на ПХ са многофакторни от групи 1, 2 и 4, последната класификация поставя СКА в група 5 на Клиничната класификация за диагностика и лечение на ПХ.

На фиг. 25 са представени клиничните форми на ПХ при пациенти със СКА и тяхното припокриване.

Фиг. 1. Клинични форми на ПХ при СКА (8). mPAP (mean Pulmonary arterial Pressure) – средно пулмоартериално налягане, PVR (Pulmonary vascular resistance) – белодробно-съдова резистентност, PCWP (Pulmonary capillary wedge pressure) – пулмо-капиларно налягане, V/Q – съотношение вентилация перфузия от белодробна вентилационно-перфузионна сцинтиграфия



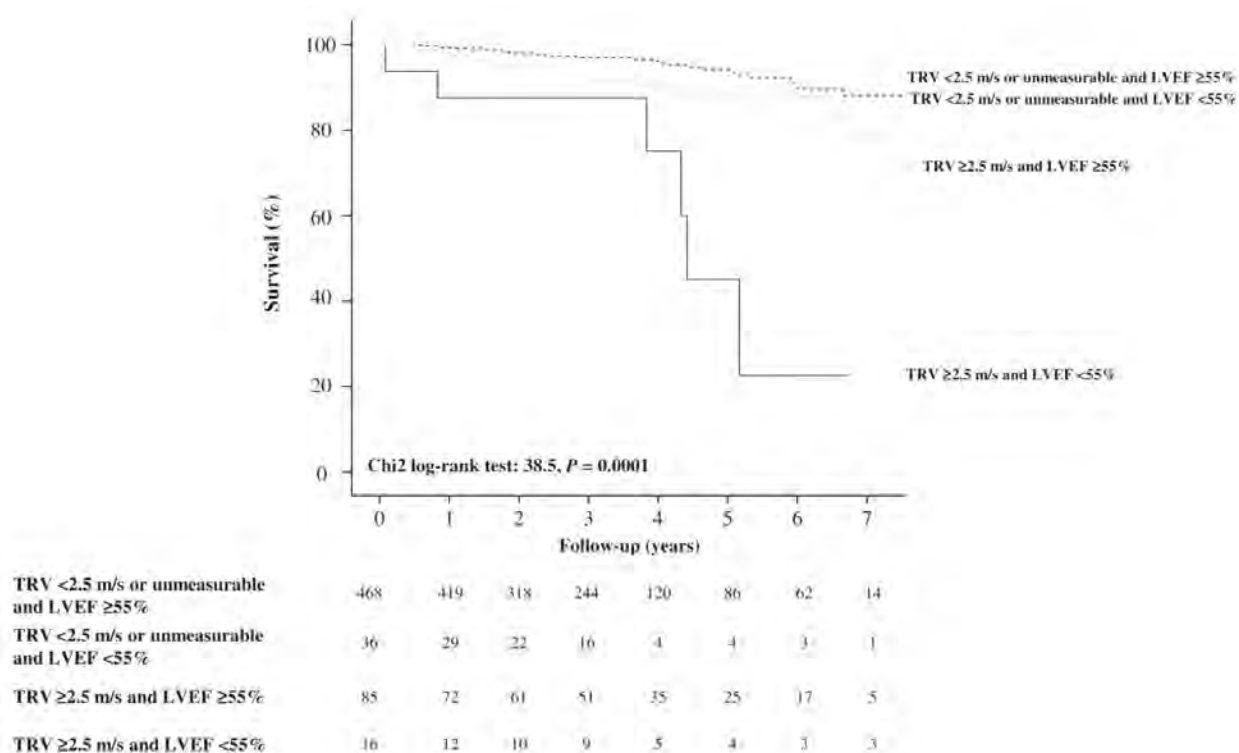
Скорост на регургитационния кръвоток през трикуспидалната клапа.

Измерването на пулмоартериалното налягане чрез скоростта на регургитационния кръвоток през трикуспидалната клапа е скринингов метод и дори леко увеличение на скоростта – 2,5-2,7 м/сек е с доказано повишен риск при пациенти със СКА (23, 24, 25, 26) и е включено в препоръките на Американската торакална асоциация за диагноза, рискова стратификация и лечение на ПХ при пациенти със СКА (10). В голям метаанализ от 45 проучвания, проведени в 15 страни с общо 6109 пациенти се установява, че в 70% от проучванията, повишено пулмоартериално налягане е дефинирано при скорост на трикуспидалния кръвоток над 2,5 м/сек (27). В наскоро публикувано проучване в European Heart Journal с 1781 пациента със СКА, проследявани средно за 48 месеца, скоростта на трикуспидалния регургитационен кръвоток $\geq 2,5$ м/сек се асоциира с увеличаване на смъртността, като риска е най-висок при скорост $\geq 2,5$ м/сек и ФИ на лявата камера $<55\%$, фиг. 2 (28).

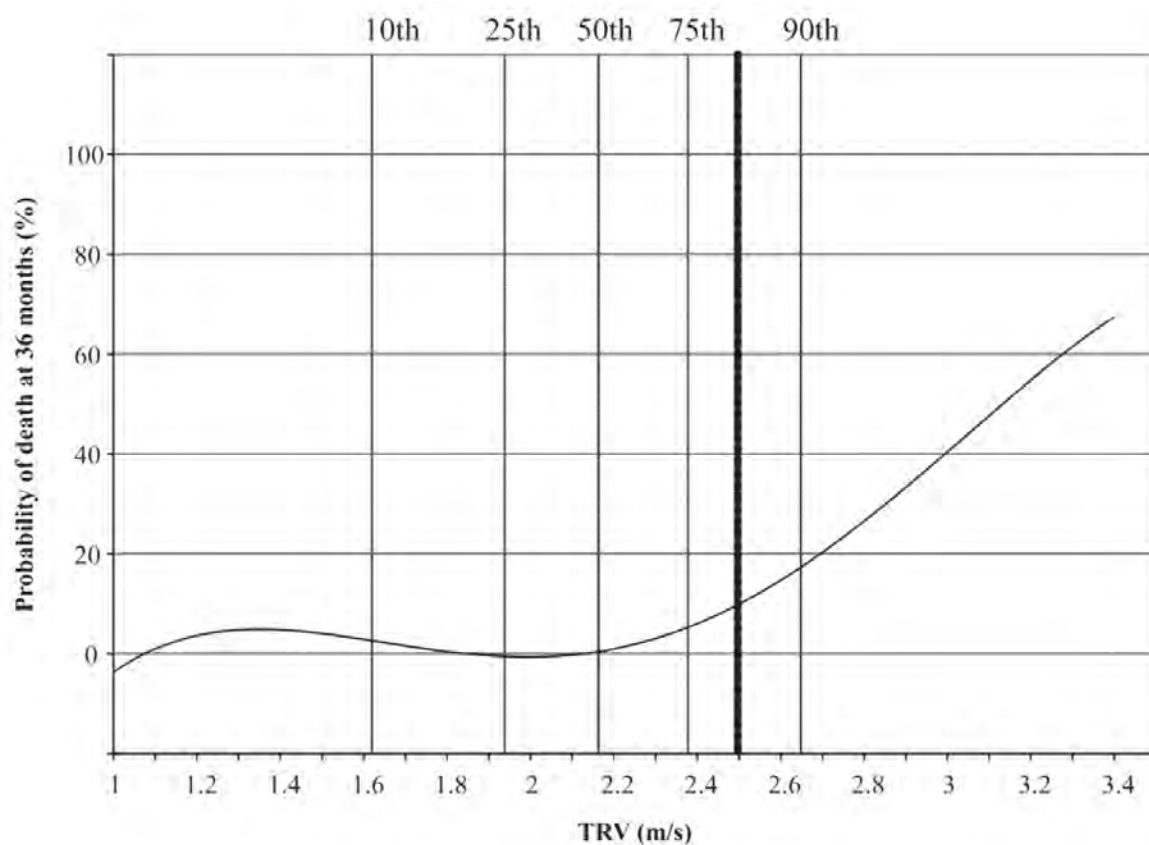
Рискът от смърт се покачва линейно при скорости над 3 м/сек, а вероятността за смъртен изход става 50% при скорост 3,2 м/сек, както е илюстрирано на графиката на фиг. 3.

Скоростта на регургитационния кръвоток през трикуспидалната клапа между 2,5 и 3 м/сек обхваща само 25-39% от пациентите със средна стойност на пулмоналното налягане над 25 mmHg, докато при стойност ≥ 3 м/сек този процент се вдига до 66-77% (13, 14, 15). При съчетаване стойността на скоростта на кръвотока със стойността на NT-proBNP > 164 пг/мл или изминатото разстояние < 333 м. при 6-минутния тест с ходене, се покачва предиктивната стойност на изследването. Поради тази причина препоръките са за комбинираното използване на показателите, когато скоростта на трикуспидалния регургитационен джет 2,5-3,0 м/сек (10, 15). На фиг 2 е показана кривата на Каплан- Майер за преживяемостта според cutoff стойността на трикуспидалния кръвоток, комбинирана с ФИ на лявата камера (28).

Фиг. 2. Крива на Каплан-Майер за преживяемостта според cut-off стойността на трикуспидалния кръвоток и ФИ на лявата камера (28).



Фиг. 3. Три годишна вероятност от смърт при пациенти със СКА, според измерената скорост на трикуспидалния регургитационен джет (28).



СКРИНИНГОВ, ДИАГНОСТИЧЕН И ТЕРАПЕВТИЧЕН ПОДХОД ПАЦИЕНТИ С ПХ

Двата основни документа даващи скринингови, диагностични и терапевтични насоки са Препоръките на Американската торакална асоциация за скрининг, диагноза и лечение на ПХ при пациенти със СКА (10, 29) и Утвърдения стандарт за лечение на възрастни пациенти със СКА в Обединеното Кралство от 2018 г. (30). Препоръчва се пациенти с гранична стойност на скоростта на регургитационния кръвоток през трикуспидалната клапа – 2,5-3,0 м/сек, да бъдат допълнително изследвани чрез 6-минутния тест с ходене и стойността на NT-proBNP. При пациенти, при които NT-proBNP > 164 пг/мл и изминатото разстояние при 6-минутния тест с ходене е < 333 м., или скоростта на трикуспидалния регургитационен джет е $\geq 3,0$ м/сек, се препоръчва провеждането на дясна сърдечна катетеризация за да се отдиференцират хемодинамичните параметри (10). При всички пациенти с висока скорост на трикуспидална регургитация, повишени стойности на NT-proBNP, се препоръчва интензифициране на специфичната терапия за СКА – хидроксиурея, добавяне кислород, хемотрансфузии и хелираща терапия. Засилване терапията с хидроксиурея е с цел максимално да се увеличи нивото на феталния хемоглобин, с което да се превентират съдово-оклузивните прояви на болестта, които, особено при наличие на ПХ увеличават риска от смърт (31). Хемотрансфузиите забавят хемолитичните кризи, намаляват също съдовите оклузии, подобряват сърдечно-съдовата и белодробна функция (32, 33). Макар че лечението с хидроксиурея и хемотрансфузии никога да не е било тествано в клинично проучване при ПХ, се препоръчва при тези високо рискови пациенти.

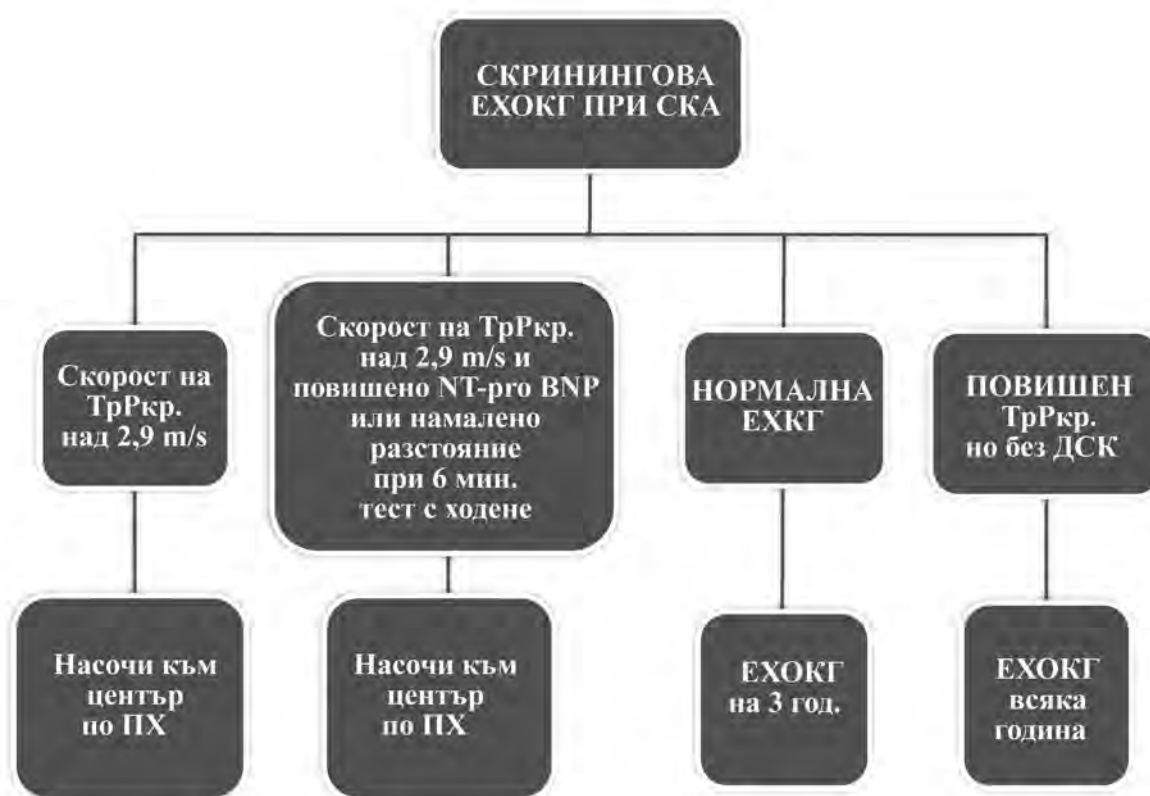
До сега няма завършени рандомизирани контролирани клинични проучвания върху употребата на одобрени лекарства при идиопатична пулмоартериална хипертония при пациенти със СКА. Това е и причината в препоръките на Европейската кардиологична асоциация за лечение на белодробна хипертония (3) за група 5 в клиничната класификация да е залегнало становището, че лечението се съобразява с поставената основна диагноза и че е вторично за ПХ. Макар че има не един опит с прилагането на ендотелин-рецепторни антагонисти – бозентан и амбризентан (34), на фосфодиестеразни инхибитори-силденафил (35) и простациклинови антагонисти (36). Бозентан се оказва добре толериран в едно плацебо-контролирано проучване, което, поради невъзможност да набере необходимия брой пациенти, е прекратено по-рано и съответно не предоставя необходимите данни за ефективност (37). Употребата на силденафил в проучването Walk PhaSST (38) е също прекратено предварително, заради по-високия процент странични ефекти в активно лекуваната група спрямо плацебо – 45% към 22%, $p=0,022$. Най-честата странична проява е била хоспитализация заради болки. Не се установява и

полза по отношение на изминатото разстояние при 6-минутния тест с ходене ($p=0,70$), скоростта на трикуспидалната регургитация ($p=0,50$) или стойността на NT-proBNP ($p=0,41$).

За ползата от приложението на простациклиновите аналози докладват Weir и съавт. 2017 (36) за клинично проследяване при 11 пациенти със СКА с доказана чрез дясна сърдечна катетеризация ПХ и получаващи максимални дози поддържаща терапия, включително и други белодробни вазодилататори. Всички пациенти са с белодробно съдово съпротивление $\geq 115 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$, средно пулмоартериално налягане $\geq 28 \text{ mmHg}$, транспулмонален градиент $\geq 12 \text{ mmHg}$, т.е. високорискови. На пациентите е прилагано лечение с простациклинови аналози чрез всички възможни начини на приложение за най-малко 4 седмици, проследявани средно за 13 месеца след началото на лечение. Намаляването на деснокамерното налягане е пропорционално на прилаганата доза, което потвърждава фармакологичния ефект на простациклиновите аналози и подкрепя важността на титрирането на дозата, установено в предходни проучвания с други форми на ПХ (39). При 10 пациенти, систолното пулмонално налягане намалява сигнификантно в сравнение с изходната стойност (69 ± 24 към $45 \pm 14 \text{ mmHg}$, $p=0,008$). Средно снижението е 35% за 20,4 седмици. При 9 пациенти, 6-минутния тест с ходене показва увеличаване на изминатото разстояние с 20% (39 м) за средно 28,3 седмици на приложение на терапията (331 ± 93 м към 370 ± 35 м, $p=0,14$). Увеличението на разстоянието не е статистически сигнификантно, но все пак показва тенденция към увеличение, като се има предвид и малкия брой пациенти. 39 м е в границата на минимално значима клинична разлика, изискуема за проспективно контролирано изпитване при пациенти с ПХ, което е 33-40 м. Лечение с простациклинови аналози при пациенти със СКА до този момент не е правено и поради опасения за белодробен оток, следствие високодебитното състояние, развитие на сепсис, с входна врата парентералния път на приложение, развитие на тромбоза, усложнения, които не са наблюдавани в това малко клинично проследяване. Смъртността сред пациентите с ПХ е висока, а сред пациентите със СКА и ПХ е вече достатъчно висока, и за това е трудно да се оцени, извън рандомизирано клинично проучване дали прилаганото лечение би имало ефект върху смъртността. Авторите извеждат заключението, че е необходимо да се натрупат още опит и знания за приложението на простациклиновите антагонисти при пациенти със СКА и ПХ, но не намират и основание то да се избягва.

Когато ПХ е посткапиларна по хемодинамичен механизъм на развитие, лечението цели овладяване на обемното обременяване и хипертонията. Доказаната тромбемболична пулмонална хипертония може да се лекува и с риоцигуат (40).

Фиг.4. Утвърдения стандарт за лечение на възрастни пациенти със СКА в Обединеното Кралство от 2018; ТрРкр – трикуспидален регургитационен кръвоток; ПХ – пулмонална хипертония; ДСК – дясна сърдечна катетеризация; ЕХОКГ – ехокардиография; ДСК – дясна сърдечна катетеризация; NT-proBNP-мозъчен натрий уретичен пептид, СКА – сърповидноклетъчна анемия (30)



ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Сърповидноклетъчната анемия е рядко срещано вродено състояние, при което обаче сърдечносъдовите усложнения са чести и определящи качеството и продължителността на живот при пациентите. За нивото на съвременната медицинска грижа за тези болни се съди по ранното им обхващане, лечение и предприемане на всички скринингови възможности за навременна диагноза на усложненията и недопускане на тяхната прогресия.

Адрес за кореспонденция

Д-р Мария Димова

УМБАЛ „Св. Марина“,

Клиника по Вътрешни болести.

9010, Варна, бул. „Христо Смирненски“,

e-mail: mdimovabg@yahoo.fr

Address for correspondence:

Maria Dimova, MD

University Hospital “St. Marina”

Internal Medicine Clinic

9010, Varna, 1, “Hristo smirnenki”bul.,

e-mail: mdimovabg@yahoo.fr

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Fitzhugh, CD, Lauder, N, Jonassaint, JC, et al. Cardiopulmonary complications leading to premature deaths in adult patients with sickle cell disease. *American Journal of Hematology*. 2010;85:36–40. DOI: 10.1002/ajh.21569
2. Mancini, EA, Culbertson, DE, Yang, YM, et al. Causes of death in sickle cell disease: An autopsy study. *British Journal of Haematology*. 2003;123:359–365
3. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 2016; 37: 67–11
4. Cabrita, IZ, Mohammed, A, Layton, M, et al. The association between tricuspid regurgitation velocity and 5-year survival in a North West London population of patients with sickle cell disease in the United Kingdom. *British Journal of Haematology*. 2013;162:400–408. DOI: 10.1111/bjh.12391.
5. Caughey, MC, Hinderliter, AL, Jones, SK, et al. Hemodynamic characteristics and predictors of pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease. *The American Journal of Cardiology*. 2012;109:1353–1357. DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.11.067.
6. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* 2004;350:886–895
7. Gladwin MT, Barst, RJ, Castro, OL, et al. Pulmonary hypertension and no in sickle cell. *Blood*. 2010;116:852–854. DOI: 10.1182/blood-2010-04-282095.
8. Gladwin MT. Cardiovascular complications in patients with sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;2017(1):423–430.
9. Gladwin MT. Cardiovascular complications and risk of death in sickle-cell disease. *Lancet* 2016;387:2565–2574.
10. Klings ES, Machado RF, Barst RJ, et al. ; American Thoracic Society Ad Hoc Committee on Pulmonary Hypertension of Sickle Cell Disease. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: diagnosis, risk stratification, and management of pulmonary hypertension of sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:727–740.
11. Lai YC, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ Res* 2014;115:115–130

12. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D42-D50
13. Mehari A, Alam S, Tian X, et al. Hemodynamic predictors of mortality in adults with sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:840-847
14. Mehari A, Gladwin MT, Tian X, Machado RF, Kato GJ. Mortality in adults with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *JAMA* 2012;307:1254-1256.
15. Parent F, Bachir D, Inamo J, et al. A hemodynamic study of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *N Engl J Med* 2011;365:44-53
16. Fonseca GH, Souza R, Salemi VM, Jardim CV, Gualandro SF. Pulmonary hypertension diagnosed by right heart catheterisation in sickle cell disease. *Eur Respir J* 2012;39(1):112-11
17. Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, et al. SIRT3-AMP-activated protein kinase activation by nitrite and metformin improves hyperglycemia and normalizes pulmonary hypertension associated with heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 2016;133:717-731
18. Dixon DD, Trivedi A, Shah SJ. Combined post- and pre-capillary pulmonary hypertension in heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Fail Rev* 2016;21:285-297
19. Naik RP, Streiff MB, Haywood C Jr, Segal JB, Lanzkron S. Venous thromboembolism incidence in the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Thromb Haemost* 2014;12:2010-2016
20. Novelli EM, Huynh C, Gladwin MT, Moore CG, Ragni MV. Pulmonary embolism in sickle cell disease: a case-control study. *J Thromb Haemost* 2012;10:760-766
21. Anthi A, Machado RF, Jison ML, et al. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1272-127
22. Ghofrani HA, D'Armini AM, Grimminger F, et al.; CHEST-1 Study Group. Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2013;369(4):319-329
23. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med* 2008;359:2254-2265.
24. De Castro LM, Jonassaint JC, Graham FL, Ashley-Koch A, Telen MJ. Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: clinical and laboratory endpoints and disease outcomes. *Am J Hematol* 2008;83(1):19-25.
25. Sachdev V, Kato GJ, Gibbs JS, et al. Echocardiographic markers of elevated pulmonary pressure and left ventricular diastolic dysfunction are associated with exercise intolerance in adults and adolescents with homozygous sickle cell anemia in the United States and United Kingdom. *Circulation* 2011;124:1452-1460.
26. Lorch D, Spevack D, Little J. An elevated estimated pulmonary arterial systolic pressure, whenever measured, is associated with excess mortality in adults with sickle cell disease. *Acta Haematol* 2011;125:225-229
27. Caughey MC, Poole C, Ataga KI, Hinderliter AL. Estimated pulmonary artery systolic pressure and sickle cell disease: a meta-analysis and systematic review. *Br J Haematol*. 2015;170(3):416-424
28. Damy T, Bodez D, Habibi A, et al. Haematological determinants of cardiac involvement in adults with sickle cell disease. *Eur Heart J* 2016;37(14):1158-1167
29. Klings ES, Machado RF, Morris CR, et al.; ATS Clinical Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension in Sickle Cell Disease Committee. Reply: practice guideline for pulmonary hypertension in sickle cell: direct evidence needed before universal adoption. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190(2):238-240
30. Standards for Clinical Care of Adults with Sickle Cell Disease in the UK, 2nd edition, 2018
31. Mekontso Dessap A, Leon R, Habibi A, et al. Pulmonary hypertension and cor pulmonale during severe acute chest syndrome in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:646-653
32. Deterlich JA, Kato RM, Rabai M, Meiselman HJ, Coates TD, Wood JC. Chronic transfusion therapy improves but does not normalize systemic and pulmonary vasculopathy in sickle cell disease. *Blood* 2015;126:703-710
33. Tsitsikas DA, Seligman H, Sirigireddy B, Odeh L, Nzouakou R, Amos RJ. Regular automated red cell exchange transfusion in the management of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2014;167:707-710
34. Minniti CP, Machado RF, Coles WA, Sachdev V, Gladwin MT, Kato GJ. Endothelin receptor antagonists for pulmonary hypertension in adult patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2009;147:737-743
35. Machado RF, Martyr S, Kato GJ, et al. Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Br J Haematol* 2005;130:445-453
36. Weir NA, Saiyed R, Alam S, et al. Prostacyclin-analog therapy in sickle cell pulmonary hypertension. *Haematologica* 2017;102:e163-e165
37. Barst, R. J., Mubarak, K. K., Machado, R. F., Ataga, K. I., Benza, R. L., Castro, O., .. the Asset study group.. Exercise capacity and haemodynamics in patients with sickle cell disease with pulmonary hypertension treated with bosentan: Results of the asset studies. (2010) *British Journal of Haematology*, 149(3), 426-435
38. Machado RF, Barst RJ, Yovetich NA, et al.; walk-PHaSST Investigators and Patients. Hospitalization for pain in patients with sickle cell disease treated with sildenafil for elevated TRV and low exercise capacity. *Blood* 2011;118(4):855-864
39. Homma S. Dose-dependent reduction in pulmonary vascular resistance with epo-prostenol in pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2010;74(10):2062-2063
40. Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. *Blood Cells Mol Dis* 2006;37(1):12-20.

РЕНАЛНА ДИСФУНКЦИЯ ПРИ БОЛНИ С β -ТАЛАСЕМИЯ МАЙОР

Стоянова Л.¹, Стайкова Св.², Калева В.³, Димова М.¹

УМБАЛ "Св. Марина" – Варна,

1 – Клиника по Вътрешни болести,

2 – Клиника по Нефрология,

3 – Клиника по детска клинична хематология и онкология

Медицински университет – Варна

RENAL DYSFUNCTION IN PATIENT WITH β -THALASSEMIA MAJOR

Stoyanova L.¹, Staykova Sv.², Kaleva V.³, Dimova M.¹

University Hospital "St. Marina" – Varna,

1 – Clinic of Internal Medicine,

2 – Clinic of Nephrology,

3 – Clinic of Pediatric oncohematology

Medical University of Varna

Резюме. Таласемия майор е наследствено генетично заболяване, което протича с вътресъдова и интрамедуларна хемолиза, скелетни дефекти и анемия, налагаща редовни хемотрансфузии от ранна детска възраст. В резултат от ексцесивното натрупване на желязо в организма и развиващата се вторична хемосидероза се развиват органни увреди, част от които са и бъбречните нарушения. Статията разглежда механизмите на бъбречните увреждания при болните с β -таласемия майор и необходимостта от въвеждането в клиничната практика на нови и неинвазивни биохимични маркери за ренална дисфункция.

Ключови думи: β -таласемия майор (β -ТМ), цистатин С, неутрофилен гелатиназа-асоциирин липокалин (NGAL), β -2-микроглобулин (β -2-МГ), N-ацетил-D-глюкозаминидаза (NAG)

Abstract. *Thalassemia major is a hereditary genetic disease that presents with intramedullary and intravascular haemolysis, skeletal defects and anemia, requiring need of regular performed haemotransfusions since early childhood. Excessive iron deposition in the tissues is the cause of organ dysfunctions including renal impairment. The article reviews the mechanisms, clinical presentation and the use of novel biochemical markers of renal dysfunction in patients with β -thalassemia major.*

Key words: β -thalassemia major (β -ТМ), cystatin C, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), β -2-microglobulin (β -2-МГ), N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG)

ВЪВЕДЕНИЕ:

Болните с хемотрансфузионно-зависими анемии, към които се отнася β -таласемия майор (β -ТМ), са обект на многобройни изследвания поради обстоятелството, че при тях още в детска възраст се наблюдават усложнения, свързани с ексцесивното натрупване на свободно желязо в организма. В резултат на това се развива тежка вторична хемосидероза, полиорганна недостатъчност и хроничен оксидативен стрес. Дейността на медицинските специалисти, работещи в тази област, е насочена

към ранно откриване и динамично проследяване на усложненията при β -ТМ с цел превенция на различните органни увреждания.

ТАЛАСЕМИЯ МАЙОР – ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ И КЛИНИЧНА ПРЕЗЕНТАЦИЯ

Бета-таласемия майор принадлежи към групата заболявания, наречени „редки болести“, като според общоприетата дефиниция за рядко заболяване честотата е не повече от 5 пациента на 10000

население. В световен мащаб носители на гена на β -таласемия са 1,5%, като най-висока е честотата в страните на Средиземноморския басейн – Италия, Гърция, Испания, както и сред населението от африкански произход, Средния Изток и Южна Азия. (1) Носителите на този ген за България са 2,4 – 2,5 %, което се изчислява на около 170 000 души. (2) У нас се наблюдава предимно в Южна България.

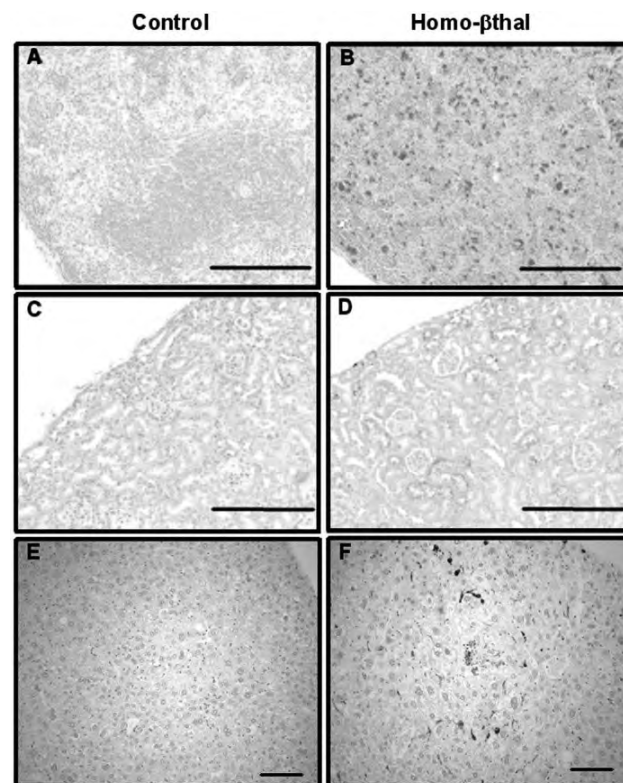
Заболяването се проявява между 6-ти и 24-ти месец след раждането с анемичен синдром и хепатоспленомегалия. В по-късна възраст железният свръхтовар води до различни органични и функционални увреждания, засягащи предимно сърцето (кардиомиопатии, аритмии, сърдечна недостатъчност) (3), черния дроб (фиброза и цироза), ендокринните жлези (захарен диабет, хипогонадизъм, хипопаратиреоидизъм, хипотиреоидизъм, хипопитуитаризъм) (4), бъбречната функция, физическото и полово развитие и др.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧНИ МЕХАНИЗМИ НА БЪБРЕЧНИТЕ УВРЕЖДЕНИЯ ПРИ БОЛНИ С β -ТМ

В миналото, нарушенията в бъбречната функция не са били приемани като сериозно увреждане при β -ТМ поради обстоятелството, че преживяемостта на пациентите е била лимитирана от тежките сърдечни усложнения, които са били причина за леталитет в ранна възраст. През последните 10-15 г. с използването на ефективни хелаторни медикаменти и удължаване продължителността на живота на при тези пациенти, зачестяват и бъбречните увреждания. Няколко фактора са отговорни за нарушенията в бъбречната функция: скъсеният живот на еритроцитите, желязното натрупване в тъканите и лечението с желязни хелатори. (5, 6) Усиленият еритроцитен кръговрат и нуждата от чести хемотрансфузии води до отлагане на хемосидерин в гломерулите, проксималните тубули и интерстициума с последваща бъбречна увреда. (7) Stoyanova E. et al (8) създават експериментален модел на β -ТМ при мишки, който много сходно пресъздава заболяването при хора с типичните хематологични, хистологични и патофизиологични характеристики. Плазмените нива на желязото са сигнификантно по-високи при таласемичните модели мишки в сравнение с контроли. Интересни и важни са резултатите от хистологичните материали на различни органи като сърце, слезка, бели дробове, черен дроб и бъбреци, приготвени със съответното оцветяване – пруско синьо за желязно отлагане и сириус ред за интерстициална фиброза. В миокарда се установява 1,7 пъти по-голямо отлагане на интерстициалния колаген в сравнение с контроли. В слезката, белите дробове и черния дроб се наблюдава по-голямо желязно отлагане в сравнение с контролите. В бъбреците също се установява повишено желязно натрупване в проксималните тубулни клетки, предимно в

кортикалните зони, без наличие на интерстициална фиброза. (8) Фиг.1.

Фиг. 1. Хистопатологичен анализ на желязно натрупване при 15-месечни мишки с β -ТМ



А) Слезка на контролна група мишки – бяла и червена пулпа с единични желязни депозити;

В) Слезка на мишки с β -ТМ със значително количество желязни депозити в паренхима;

С) Бъбреци на контролна група мишки без желязни депозити;

Д) Бъбреци на мишки с β -ТМ с желязни депозити в проксималните тубулни клетки на кортикалните зони;

Е) Черен дроб на контролна група мишки без желязни депозити;

Ф) Черен дроб на мишки с β -ТМ в Купхеровите клетки и в клетките на паренхима.

Stoyanova E. et al (8) отчитат значително завишени нива на желязни депозити в слезката (17,68%) и бъбреците (4,47%) при таласемичните модели мишки спрямо контролите, съответно (3,6 и 0,54%). Повишеното желязно натрупване в проксималните тубулни клетки вероятно се дължи на усилената бъбречна реабсорбция на свободно желязо в резултат на хроничната хемолиза.

Натрупаното свободно вътреклетъчно желязо е токсично за тъканите по няколко механизма: уврежда клетъчните мембрани чрез липидна пероксидация, води до деструкция на клетъчни органели (митохондрии), нарушава вътреклетъчните дихателни вериги и стимулира развитието на фиброза и апоптоза. (9, 10) Фиг. 2.

Фиг. 2. Патопфизиологични механизми и последствия на желязното свръхнатрупване



Железният свръхтовар, резултат на честите хемотрансфузии, повишената абсорбция на желязо и несвързаното с биологичните молекули трансферин, феритин и хелатори желязо, генерира кислородни радикали. Кислородните радикали водят до липидна пероксидация, деструкция на вътреклетъчни органели и ДНК, апоптоза на клетката и повишен риск от възникване на неоплазми и инфекции (11).

Натрупаното желязо в бъбреците, заедно с хроничната анемия и хипоксия водят до оксидативен стрес с последващи тубулна и гломерулна дисфункция. Намалява се прериферното съдово съпротивление, повишава се бъбречния плазмоток, настъпва хиперфилтрация с трансудация на макромолекули и поява на нискостепенна протеинурия. (12, 13) Фиг. 3.

Фиг. 3. Механизми на тубулната и гломерулна дисфункция при таласемии.



Хроничната анемия и хипоксия, депозитите от хемосидерин в бъбреците водят до оксидативен стрес с последваща гломерулна и тубулна дисфункция. Хроничната анемия намалява системното съдово съпротивление, повишава бъбречния плазмоток, води до хиперфилтрация, протеинурия и гломерулна дисфункция (14)

Конкрементите в бъбреците не са необичайна находка при болните с β -ТМ. Дължат се на повишената екскреция на пикочна киселина в урината в резултат на усиления еритроцитен разпад. Друга причина може да бъде хиперкалциурията, която се наблюдава при лечение на съпътстващия хипопаратиреоидизъм с витамин Д и калциеви препарати. Конкрементите могат да доведат до обструкция на уринарния тракт и често повтарящи се уроинфекции, което рефлектира неблагоприятно върху реналната функция.

Механизмите на бъбречното увреждане в резултат на използване на хелаторна терапия не са напълно изяснени. Счита се, че приложението им може да доведе до нарушения в бъбречната функция от транзиторно леко повишаване на серумния креатинин до остро бъбречно увреждане. Tanjiej et al съобщават през 2001 г., че Deferasirox повишава серумния креатинин в резултат на редукция на бъбречния плазмоток и гломерулната филтрация при някои таласемични пациенти. Те изследват ефектите на Deferasirox върху експресията на циклооксигеназа-2 (COX-2), ензим в синтеза на простагландините, и посочват, че се увеличава както експресията на COX-2, така и цялостната простагландинова синтеза. (15) Хелаторите влияят върху каскадата на арахидоновата киселина и продукцията на простагландини с последващ дисбаланс между вазодилататори и вазоконстриктори. Настъпва активация на тубулогломерулната обратна връзка и вазоконстрикция на аферентните пре-гломерулни артериоли с последваща редукция на гломерулната филтрация. (16)

Възможна е поява на диария, повръщане и преренална остра бъбречна недостатъчност (ОБН) при болни, провеждащи хелаторно лечение. (17) В някои проучвания са доказани инфекции с *Yersinia enterocolitica* при лечение с Deferoxamine като причина за остра бъбречна увреда (ОБУ). (18, 19) Описана е Deferipron-индуцирана агранулоцитоза в 1% от лекуваните пациенти, водеща до сепсис и остра тубулна некроза. (20)

Bhandari S. et al сравняват нефротоксичните ефекти на трите широко прилагани хелаторни медикаменти: Deferiprone, Deroxamine и Deferasirox. Наблюдават 586 пациенти с β -ТМ на средна възраст 17 г. (2-53 г.). От тях 296 са на лечение с Deferasirox и 290 на лечение с Deroxamine повече от 1 година. Отчитат поява на по-леки реверзибелни, но и тежки животозастрашаващи усложнения като Фанкони-подобен синдром при пациентите, провели над 6-ме-

сечен курс с Deferasirox. Наблюдават покачване на серумния креатинин при 35-38%, протеинурия над 0,5 г/24 часа при 0,5%, Фанкони-подобен синдром при 3-8% от пациентите на лечение с Deferasirox, а също така и прояви на интерстициален нефрит. Предупреждават, че нефротоксичните ефекти на хелаторите могат да зачестят при таласемични пациенти със захарен диабет, артериална хипертония, известна протеинурия и с установена вече хронична бъбречна недостатъчност. Вероятно нефротоксичните ефекти на Deferasirox се дължат на факта, че той лесно прониква в клетката поради добрата си липофилност и образува комплекси с високо съдържание на желязо, които по-трудно могат да напуснат клетката. (14) Ponticelli et al препоръчват редуциране на дозата на Deferasirox на 10мг/кг/ден при покачване на серумния креатинин с 33% над стойностите му преди започване на лечение. (21)

НОВИ БИОМАРКЕРИ ЗА РАННА БЪБРЕЧНА УВРЕДА ПРИ БОЛНИ С β -ТМ

От няколко десетилетия традиционните биомаркери, като серумен креатинин и урея, намират приложение в проследяването на бъбречната функция. Те имат някои недостатъци, поради което са неефективни за ранна и прецизна диагноза на бъбречната увреда.

През последното десетилетие познанията върху патофизиологичните механизми на бъбречните заболявания се обогатиха изключително много. Това доведе до идентифициране на множество протеини, които бързо се индуцират в бъбрека в резултат на бъбречна увреда. Някои от тези молекули, като цистатин С, неутрофилен гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL), β -2-микроглобулин (β -2-МГ) и N-ацетил-D-глюкозаминидаза (NAG), отговарят на специфичните нужди за диагностиката на ранна бъбречна увреда при болните с β -ТМ

ЦИСТАТИН С

Цистатин С е нискомолекулен белтък с молекулна маса 13 kDa, който се продуцира от всички ядроносни клетки. Той е по-точен показател за гломерулната филтрация от серумния креатинин. Концентрацията му е постоянна и се определя главно чрез гломерулна филтрация. Цистатин С е ранен биомаркер за бъбречно увреждане. Стойностите му не се влияят от възраст, пол, мускулна маса, което го прави приложим при деца и възрастни болни с редукция на мускулната маса. Нараства в серума при начални бъбречни увреждания. Като нискомолекулен белтък се филтрира напълно през гломерулната базална мембрана и се реабсорбира изцяло през проксималните тубули. Не се секретира в урината, както това става с креатинина при високи серумни концентрации.

Цистатин С е документиран в много проучвания като ранен и сензитивен маркер за гломерулна дисфункция при болни с β -ТМ. Behaury OG et al. съобщават през 2017 г. за сигнификантно завишени стойности на цистатин С и β -2-микроглобулин при 70 деца с β -ТМ. Цистатин С и β -2-микроглобулин положително корелират със серумния креатинин, урея, феритин, албумин/креатинин отношение, продължителността на хелатиращото лечение и честотата на хемотрансфузиите за година и негативно корелират с креатининовия клирънс и нивото на хемоглобин. Авторите доказват, че цистатин С и β -2-микроглобулин са по-високо специфични и сензитивни маркери (91,4%, 90,0% и 85,7%, 100% съответно) спрямо креатинина и креатининовия клирънс (83,0%, 100% и 81,4%, 100% съответно) в диагностиката на ранни бъбречни увреди при таласемични пациенти. (22)

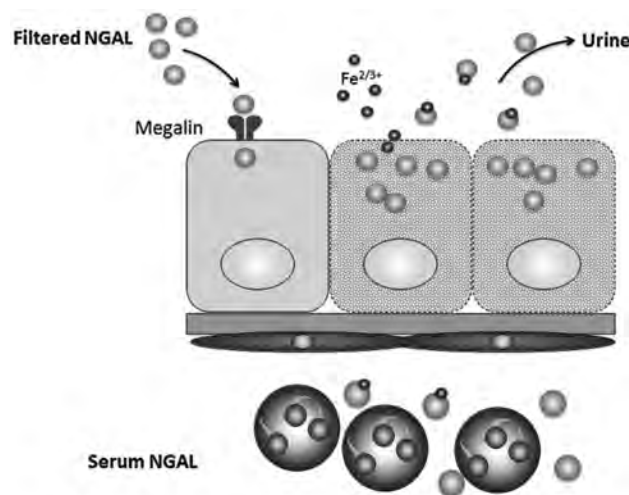
Papassotiriou I. et al. през 2010 г. изследват 150 болни с таласемия, провеждащи лечение с Deferasirox в дози 20–40 мг/кг/ден в продължение на 9 месеца. Измерват концентрациите на цистатин С като маркер за гломерулна филтрация, NGAL – маркер за ренална дисфункция, NT-proBNP – маркер за миокардна увреда и феритин – маркер за желязния свръхтовар. Установяват че, цистатин С се покачва при 60% от пациентите, провеждащи лечение с Deferasirox. Не откриват връзка между цистатин С и серумния NGAL, но установяват положителна корелация между цистатин С, NT-proBNP и феритин, като правят асоциация между цистатин С и настъпването на нежелани кардиоваскуларни събития при болните с таласемия. (23) В други проучване са документираны сигнификантно високи стойности на цистатин С и отношенията: албумин/креатинин, β 2-МГ/креатинин и NGAL/креатинин в сутрешна урина при болни с β -ТМ. Авторите препоръчват рутинно използване на ранните маркери за ренална дисфункция при тази група пациенти. (24, 25)

НЕУТРОФИЛЕН ГЕЛАТИНАЗА-АСОЦИИРАН ЛИПОКАЛИН (NGAL)

Неутрофилният гелатиназа-асоцииран липокалин (NGAL) представлява 25 kDa-протеин, първоначално изолиран от човешки неутрофили, свързан ковалентно с неутрофилната гелатиназа. За първи път е описан през 1993 г. NGAL се експресира в различни тъкани у възрастния индивид, в това число костен мозък, простата, слюнчени жлези, стомах, дебело черво, трахея, бял дроб, черен дроб и бъбрек. Той свързва малки липофилни молекули. Основните лиганди за NGAL са сидерофорите-преносители на желязо. В състояние на стрес (инфекции, възпаления, исхемия, неопластична пролиферация) се наблюдава подчертана експресия на NGAL в увредените епителни клетки както в бъбрека, така и в дебелото черво, черния дроб и белите дробове. NGAL има важни функции: може да бъде донор на желязо

при поражение на бъбрека, да стимулира пролиферацията на увредените клетки, особено епителните и да противодейства на бактериалните инфекции. NGAL свободно се филтрира през гломерула и в голяма степен се реабсорбира в проксималния тубул. (Фиг. 4.) Това означава, че екскрецията на NGAL вероятно се дължи на бъбречна увреда със засягане на реабсорбцията в проксималния тубул и/или индуциране на синтеза de novo на NGAL в дисталния тубул. По отношение на плазмения NGAL самият бъбрек не се явява основен източник. NGAL протеинът в кръвообращението произхожда и от други органи, каквито са черния дроб и белите дробове, а също и от активирани неутрофили, макрофаги и други клетки на имунната система. Всяко намаление на степента на гломерулната филтрация намалява екскрецията на NGAL с последващо повишение в системното кръвообращение при болни с хронична бъбречна увреда (ХБУ).

Фиг. 4. Филтрация, резорбция и секреция на NGAL



Филтрираният NGAL се залавя от проксималните тубулни клетки посредством мегалин (повърхностен рецептор със силна експресия в апикалния участък на епителните клетки в проксималния тубул) и нивата му се повишават в серума и в урината. Charlton et al. NDT (2014) (26).

Velat Sen et al. изследват 52 пациента с β -ТМ на възраст 3–17 год. през 2013–2014 г. Установят значително завишени нива на NGAL/креатинин отношение и NAG/креатинин отношение в първа сутрешна урина при болни с β -ТМ, които сигнализират за нарушения на проксималния тубул. Посочват уринния NGAL за потенциален маркер при скрининг за ренална дисфункция. (27)

БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИН

Бета-2-микроглобулинът (β 2-МГ) е белтък с молекулна маса 11,58 kD, който изцяло се филтрира, а във 99,9% се реабсорбира в проксималния тубул.

Нивото на β 2-МГ в серума може да се нарастне при спадане на гломерулната филтрация и да свидетелства за гломерулно увреждане. При наличието на тубулни лезии неговите стойности в урината се увеличават, а откриването му в нея е маркер за нарушена тубулна реабсорбция-тубулопатия. Ozek G et al. извършват проучване върху 53 пациенти с β -ТМ на възраст 5-19 г. Всички провеждат редовно хемотрансфузионно и хелатиращо лечение с Deferasirox. Авторите изследват маркери за ренална и тубулна дисфункция и установяват, че значителен брой от участниците в проучването имат нарушена бъбречна функция. Доказват повишение на β 2-МГ във втора сутрешна урина при 62%, гломерулна хиперфилтрация при 9,5%, протеинурия при 40%, хиперкалциурия при 60% и хиперурикозурия при 58% от болните. Свързват гломерулните и тубулни увреждания с претрансфузионните ниски стойности на хемоглобина. Не откриват корелация между дозовия режим на Deferasirox и периода на настъпване на реналните нарушения. (28)

N-АЦЕТИЛ- β -D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗА

N-ацетил- β -D-глюкозаминидаза (NAG) е лизозомален ензим в проксималните тубули на бъбреците и може да служи като маркер за проксимална тубулна увреда и нефротоксичност. Има високо молекулно тегло около 130000-140000 Da, поради което не се филтрира през гломерулната базална мембрана, а има чернодробен метаболизъм. Изследването на уринния NAG е бърз, неинвазивен метод за определянето на бъбречната тубулна функция. Високото ниво на уринния NAG е индикатор за тубулно увреждане в резултат на исхемия, възпаление, токсичност. (29) Повишена екскреция на NAG се наблюдава при: инфекции на уринарния тракт, везикоуретерален рефлукс, захарен диабет, нефротичен синдром, гломерулонефрити, нефрокалциноза, хиперкалциурия, уролитиаза, хипертония, перинатална асфиксия, хипоксия, при лечение с аминокликозиди и други нефротоксични лекарства, дисфункция на трансплантацията, бъбрек, сърдечна недостатъчност, β -ТМ, сърповидно-клетъчна анемия. (30)

В много проучвания върху бъбречната функция на болните с таласемии са публикувани данни за повишена екскреция на уринния NAG при таласемични пациенти в сравнение с контролните групи и корелация с количествата на трансфузираното желязо. Абнормната екскреция на уринарния NAG доказва увреждане на проксималния тубул в резултат на липидна пероксидация, медирана от желязния свърхтовар. Mohkam M et al. установяват повишена екскреция на NAG в първа сутрешна урина при 35,9% от изследваните болни с β -ТМ, която директно корелира с възрастта на пациентите, продължителността на хемотрансфузионното ле-

чение и лечението с Deferoxamine. (31) Посочват уринния NAG като предиктор за ранно бъбречно увреждане в при пациентите с β -ТМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При болните с β -ТМ се наблюдават бъбречни увреждания в резултат на хроничната анемия и хипоксия. Своевременното им диагностициране и лечение допринася за удължаване на преживяемостта и подобряване качеството на живот. Съвременните неинвазивни биомаркери за ренална дисфункция могат да бъдат полезен инструмент на клиницистите при мониториране на хелатиращото лечение и в диагностиката на бъбречните заболявания при хемотрансфузионно-зависимите пациенти с таласемия.

Адрес за кореспонденция

Д-р Лилия Иванова Стоянова,
УМБАЛ „Св. Марина“,
Клиника по Вътрешни болести.
9000, Варна, бул. „Христо Смирненски“,
e-mail: lilstoianova67@abv.bg
тел. 0898 413036

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2010, 5:11 10.1186/1750-1172-5-11.
2. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, et al. Survival and complications in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1054:40-47.
3. Търновска-Къдрева Р, Димитров Г, Янева-Суракова Т, Владимирова Л. Сърдечно-съдовуврежданияприбета-таласемиямайор – Сърдечно-съдовизаболявания, 46, 2015, № 2, 23-40.
4. Маринова Е., Димитрова Р. Ендокринни нарушения при Таласемия Майор, Варненски медицински форум, т. 8, 2019, брой 1, 56-62
5. Ponticelli C, Musallam KM, Cianciulli P, Appellini MD. Renal complications in transfusion-dependent beta thalassemia. *Blood Rev.* 2010;24:239-244.
6. Musallam KM, Taher TA. Mechanisms of renal disease in β -thalassemia. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:1299-1302
7. Zhou XJ, Laszik Z, Wang XQ, Silva FG, Vaziri ND. Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. *Lab Invest.* 2000;80:1905-1914
8. Stoyanova E, Cloutier G, Felfly H, Lemsaddek W, Ah-Son N, Trudel M. Evidence for a novel mechanism independent of myocardial iron in β -thalassemia cardiac pathogenesis. *PLoS One* 2012;7(12):e52128
9. Hershko C. Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia. – *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1202: 1-9.
10. Murphy CJ, Oudit GY. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. – *J Card Fail.* 2010; 16: 888-900
11. Cappellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V. Guidelines for the management of transfusion-dependent thalassemia/TDT, 2014, page 44
12. Aldudak B, Karabay Bayazit A, Noyan A, Ozel A, Anarat A, Sasmaz I, Kilinc Y, Gali E, Anarat R, Dikmen N. Renal function in pediatric patients with beta-thalassemia major. *Pediatr Nephrol.* 2000;15:109-112
13. Grossman H, Dische MR, Winchester PH, Canale V. Renal enlargement in thalassemia major. *Radiology.* 1971;100:645-648
14. Bhandari S1, Galanello R. Renal aspects of thalassaemia a changing paradigm. *Eur J Haematol.* 2012 Sep;89(3):187-97. doi: 10.1111/j.1600-0609.2012.01819.x. Epub 2012 Jul 21.
15. Tanji K, Imaizumi T, Matsumiya T, et al. Desferrioxamine, an iron chelator, upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in a human macrophage cell line. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1530: 227- 35.

16. Ponticelli C, Musallam KM, Cianciulli P, Cappellini MD: Renal complications in transfusion-dependent beta thalassaemia. *Blood Rev* 24: 239–244, 2010
17. Prasannan L, Flynn JT, Levine JE. Acute renal failure following deferoxamine overdose. *Pediatr Nephrol*. 2003;18:283–285
18. Adamkiewicz, TV, Erkovitch, M, Krishnan, C, Polsinelli, C, Kermack, D, Olivieri, NF. Infection due to *Yersinia enterocolitica* in a series of patients with beta-thalassemia: incidence and predisposing factors. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1362–6.
19. Robins-Browne, RM, Prpic, JK. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1985; 47: 774–9
20. Galanello R. Deferiprone in the treatment of transfusion-dependent thalassemia: a review and perspective. *Ther Clin Risk Manag*. 2007;3:795–805.
21. Ponticelli C, Musallam KM, Cianciulli P, Appellini MD. Renal complications in transfusion-dependent beta thalassemia. *Blood Rev*. 2010;24:239–244
22. Behairy OG, Abd Almonaem ER, Abed NT, Abdel Haiea OM, Zakaria RM, AbdEllaty RI, Asr EH, Mansour AI, Abdelrahman AM, Elhady HA. Role of serum cystatin-C and beta-2 microglobulin as early markers of renal dysfunction in children with beta thalassemia major. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2017; 10: 261–268/.
23. Papassotiriou I, Margeli A, Hantzi E, Delaporta P, Sergounioti A, Goussetis E, Ladis V, Katamis A. Cystatin C levels in patients with beta-thalassemia during deferasirox treatment. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Mar 15;44(3):152–5. doi: 10.1016/j.bcmd.2010.01.001. Epub 2010 Jan 29.
24. Hamed EA, El-Melegy TN. Renal functions in pediatric patients with beta-thalassemia major: relation to chelation therapy: original prospective study. *Ital J Pediatr*. 2010;36:39
25. Economou M, Printza N, Teli A, et al. Renal dysfunction in patients with beta-thalassemia major receiving iron chelation therapy either with deferoxamine and deferiprone or with deferasirox. *Acta ematol*. 2010;123(3):148–152
26. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jul;29(7):1301–11. doi: 10.1093/ndt/gft510. Epub 2014 Jan 2.
27. Velat Sen, Aydin Ece, Unal Ulica, Murat Soker, Ali Gunes, Ibrahim Kaplan. Urinary early kidney injury molecules in children with beta-thalassemia major. *Pages 607-613 | 2014, 2015.*
28. Ozek G, CartiÖ, Serdaroglu E, Cuhadar S, Yaman Y, Oymak Y, Gunes B, Gözmen S, Vergin C. Renal Dysfunction in Pediatric Thalassemia Major Patients and Evaluation of Urine NGAL Levels in Thalassemia Blood Dec 2014, 124 (21) 4049
29. Mohkam M, Ghafari A. The Role of Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in Diagnosis of Kidney Diseases. *J Ped. Nephrology* 2015;3(3):84-91.
30. Voskaridou E, Terpos E, Michail S, et al. Early markers of renal dysfunction in patients with sickle cell/β-thalassemia. *Kidney International* 2006;69:2037–2042
31. Mohkam M, Shamsian S, Gharib A, Nariman S, Arzanian MT. Early markers of renal dysfunction in patients with beta-thalassemia major. *Pediatric Nephrology* 2008;23(6):971-976)

СЪВРЕМЕННО ЛЕЧЕНИЕ НА МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ ПРИ БОЛНИ С РЕЛАПС И/ ИЛИ РЕФАКТЕРНОСТ. МОЖЕМ ЛИ ДА ПЛАТИМ ЦЕНАТА?

Горанова-Маринова В.^{1,2}, Горанов Ст.¹

1 – Секция „Хематология“, I-ва катедра „Вътрешни болести“, МУ-Пловдив

2 – Клиника по Клинична хематология, УМБАЛ „Св.Георги“, Пловдив

MODERN TREATMENT OF MULTIPLE MYELOMA IN RELAPSED AND REFRACTORY PATIENTS. CAN WE PAY THE PRICE?

Goranova-Marinova V.^{1,2}, Goranov St.¹

1 – Section of Hematology, First Department of Internal Medicine, Medical University – Plovdiv

2 – Clinic of Clinical Hematology, University Hospital «Sv.Georgi», Plovdiv

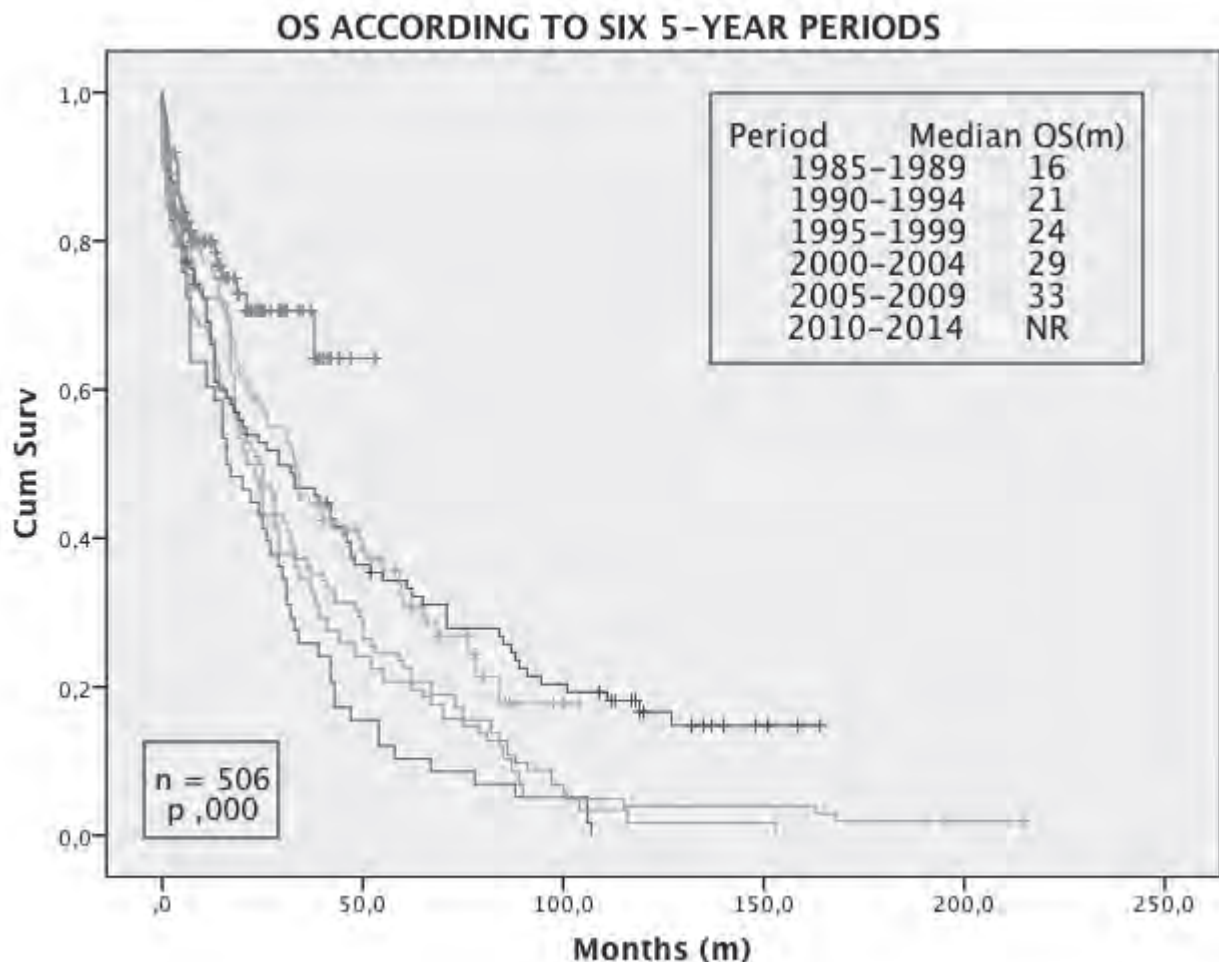
Резюме. ММ е нелечимо малигено хематологично заболяване, което в своята еволюция протича с няколко релапса, като всяка следваща ремисия е все по-кратка. Съвременните терапевтични режими са насочени към удължаване на продължителността на ремисията при добро качество на живот. В последните години прогнозата на пациентите с ММ се подобри значително, главно поради навлизането на нови медикаменти в съчетание с високо-дозова терапия и аутоложна стволово-клетъчна трансплантация. ММ се превърна в една от редките малигнени хемопатии, при които бе постигната категорична полза от съвременното лечение – повече от двойно увеличена преживяемост! Но на каква цена?! За последните 10 години има одобрени 7 нови молекули, като лечението за една година на един пациент със всяка една от тях надхвърля 100 000 USD. В резултат само малка част от пациентите имат достъп до тези терапевтични средства поради регулаторни ограничения, в основата на които е високата им цена. Съвременното лечение на мултиплиения миелом е модел за съвременното лечение на всички неопластични заболявания, но с амплифициран ефект: терапевтичните режими изискват два или три компонента, лечението е продължително, а в много случаи до релапс/ до живот, инкорпорират се разходите за овладяване на усложненията и страничните ефекти. В настоящия обзор се разглеждат съвременните лекарствени комбинации за овладяване на релапс и рефрактерност при пациенти с ММ, като се обсъждат техните клинични предимства, пречупени през високата им финансова стойност, липсата на корелация между стойност и цена, покачването на цените на конвенционалните лекарства, паралелно с тяхната липса от пазара. Предлагането на възможни решения е част от аргументираната позиция на академичната хематологична общност.

Abstract. Multiple myeloma (MM) is an incurable malignant hematological disease, which incorporates in its evolution several relapses, each subsequent remission being shorter. Modern therapeutic regimens are aimed at extending the duration of remission in a good quality of life. In recent years, the prognosis of MM patients improved significantly, mainly due to the introduction of new medications in combination with high-dose therapy and autologous stem cell transplantation. MM has become one of the rare malignant hematopathies in which a definite benefit of modern treatment has been achieved – more than twice doubling of the median survival! But at what a price ?! Over the last 10 years, 7 new molecules have been approved, each of them exceeding \$ 100,000 per patient, per year. As a result, only a minority of patients have access to these therapies due to regulatory barriers, the basis of which is their high cost. The treatment of multiple myeloma is a model for the modern treatment of all neoplastic diseases but with an amplified effect: therapeutic regimens require two or three components, treatment is prolonged, and in many cases until relapse / lifelong, including the cost of controlling the complications and side effects. This review examines the current drug combinations for the management of relapse and refractory patients with MM by discussing their clinical benefits opposite to their high financial cost, the lack of correlation between value and price, the rise in the price of conventional drugs, along with their lack of market. Offering possible solutions is part of the argued position of the academic haematological community.

ВЪВЕДЕНИЕ

Мултиплиеният миелом (ММ) е нелечимо малигнеено хематологично заболяване, което в своята еволюция протича с няколко релапса, като всяка следваща ремисия е все по-кратка. Удължаването на продължителността на ремисията след всеки последващ релапс е предпоставка за удължена преживяемост. Понастоящем ММ се превърна в една от редките малигнени хемопатии, при които бе постигната категорична полза от съвременното лечение – повече от двойно увеличена медиана на преживяемост! Ако през 1993 г. медианата на преживяемост на пациентите с ММ беше приблизително две – три години като само единични пациенти преживяваха 5г, то днес се приема, че един пациент с ММ със стандартен риск ще живее над осем години. Прогнозата на пациентите с ММ се подобри значително, главно поради навлизането на нови медикаменти в съчетание с високо-дозова терапия и автоложна стволово-клетъчна трансплантация.¹⁻³ (Граф. 1)

Граф 1. Динамика на средната преживяемост на пациентите с ММ за периода 1985-2014 г.



Удължаването на общата преживяемост на пациентите с ММ се дължи основно на три групи фактори: 1. Въвеждането на високо-дозовата терапия и автоложната трансплантация на хемопоеични стволови клетки като стандартен терапевтичен метод за всички подходящи пациенти. 2. Въвеждането в клиничната практика на протеазомните инхибитори и имуномодулаторите 3. Съвременните терапевтични режими за овладяване на релапс и рефрактерност, които са насочени към удължаване на продължителността на ремисията при добро качество на живот. В настоящия обзор се раз-

глеждат съвремените лекарствени комбинации за овладяване на релапс и рефрактерност, като се обсъждат техните клинични предимства, пречупени през високата им финансова стойност.

Терапевтични режими за лечение на пациенти с ММ с релапс и/или рефрактерност.

Понастоящем най – широкото терапевтично портфолио в клиничната хематология е на разположение за лечение на пациенти с мултиплен миелом с релапс и/или рефрактерност (ММРР). За двадесет

годишен период 1998-2018г от регулаторните агенции на САЩ (Food and Drug Administration) и Европейския съюз (European Medicinal Agency) са одобрени над двадесет нови лекарства⁴, като най-широко използваните и годината, от която се реимбурсират в САЩ, ЕС и България са представени на табл 1 .

Табл. 1 Одобрени лекарства за лечение на пациенти с ММ

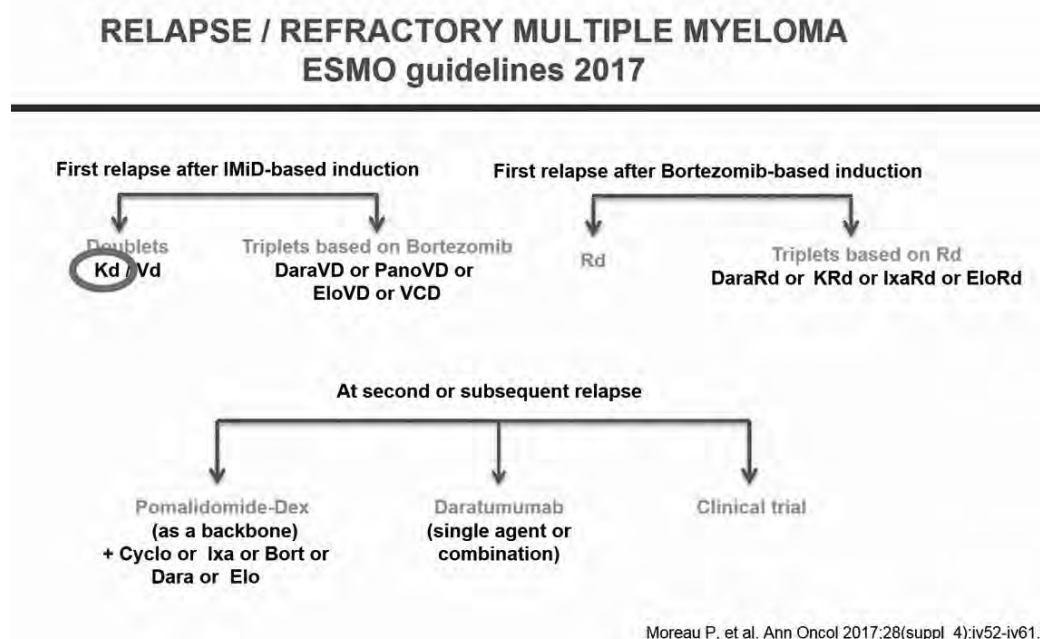
ЛЕКАРСТВО	ОДОБРЕНИЕ ОТ FDA	ОДОБРЕНИЕ ОТ ЕМА	РЕИМБУРСИРАНЕ В БЪЛГАРИЯ
Thalidomide	1998	2008	НЕ СЕ РЕИМБУРСИРА
Bortezomib	2005	2004	2006
Lenalidomide	2006	2007	НЕ СЕ РЕИМБУРСИРА
Carfilzomib	2012	2015	2018
Pomalidomide	2013	2013	НЕ СЕ РЕИМБУРСИРА
Panobinostat	2015	2015	НЕ СЕ РЕИМБУРСИРА
Ixazomib	2015	2016	2019
Elotuzumab	2015	2016	НЕ СЕ РЕИМБУРСИРА
Daratumumab	2016	2017	2019

В медицинските среди, здравните власти, здравно-осигурителните фондове и обществото като цяло нараства безпокойството от изключително високите и лавинообразно нарастващи финансови разходи за лечението на злокачествените заболявания и в частност на ММ. Лечение, което изисква продължително приложение на скъпи лекарства в комбинация или последователно, до прогресия / до живот като при голяма част от болните се добавят и разходите за овладяване на токсичност, странични ефекти и усложнения⁵.

Лечение на пациентите с ММРР в България.

Според международните и национални препоръки и ръководства за лечение на ММ (последна версия 2019г), съвременните терапевтични режими втора и по-висока линия се структурират на базата на 1). Протеазомните инхибитори Bortezomib и Carfilzomib и 2). Имуномодулаторите Thalidomide, Lenalidomide и Pomalidomide в комбинация помежду си или с 3). Алкилиращи агенти (Cyclophosphamide, Melphalan); 4). Кортикостероиди (Dexamethazone, Methylprednisolone, Prednisolone), с възможност за добавяне на 5). Моноклонални антитела (Daratumumab, Elotuzumab)^{2,6-7}.

Граф. 1 Препоръки за лечение на ММ на ESMO



Възможностите за овладяване на релапс при болни с ММ нарастват и в нашата страна. Доскоро, до 2018г, най – често единственият възможен подход в страната бе повторното лечение с Bortezomib – базиран режим., който и понастоящем остава широко използван. Малко болни са подходящи за ефективните, но свързани с висока токсичност „спасяващи“ платина – съдържащи режими. Трансплантацията на хемопоеични стволови клетки е метод, който все по – често намира приложение за лечението на MMPP като втора трансплантация или отложена трансплантация. Известно е, че значително по-малка част от пациентите с MMPP са подходящи за трансплантация в сравнение с новодиагностицираните⁸⁻⁹. От 2018г има възможност за лечение с Carfilzomib (Kymriah) + Dexamethason на пациенти с MMPP, а от 2019г се реимбурсират моноклоналното антитяло Daratumumab (Darzalex) и оралния протеазомен инхибитор от второ поколение Ixazomib (Ninlaro). Така терапевтичният арсенал за българските пациенти се разшири значително, въпреки една значима празнина – липсват медикаментите, които формират скелета на режимите за MMPP – имуномодулаторите. Очаква се навлизането на генерични форми на Lenalidomide и имуномодулатора от трето поколение Pomalidomide (Pomalyst).

Достъпът до съвременно лечение е различен в различните части на света. С най – големи възможности и практически модел за терапевтичен избор са САЩ, Канада, страните от Западна Европа. По света реалната ситуация е по-различна. Анализи на реалната клинична практика, публикувани от автори от Латинска Америка, Балканския регион и др. показват, че навлизането на нови лекарства, времето до одобрението им от здравните власти и възможността за предписване на конкретните лекарства на конкретните пациенти е проблем не само за РБългария, но и за много страни в централна и източна Европа, Латинска Америка и др.¹⁰⁻¹¹ (Фиг 1.)

Фиг. 1 Достъп до терапевтичните режими KRd, Kd, IRd, DRd, DVd по света към юни 2018г



Ефективност на медикаментите за лечение на пациенти с РРММ.

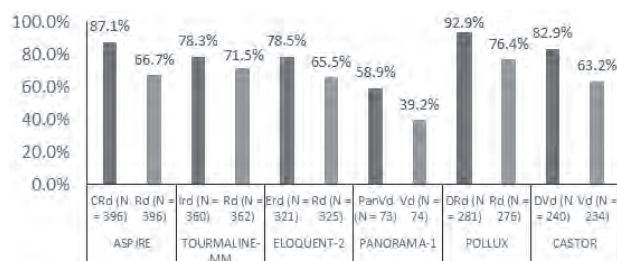
Данните за ефективност и ефикасност на новите медикаменти и терапевтични комбинации, а от там и индикациите с които те получават регистрацията от регулаторните агенции идват от големите многоцентрови рандомизирани клинични проучвания. Основни, включително и регистрационни проучвания на лекарства при РРММ са представени на табл 2.

Табл. 2 Клинични проучвания при MMPP

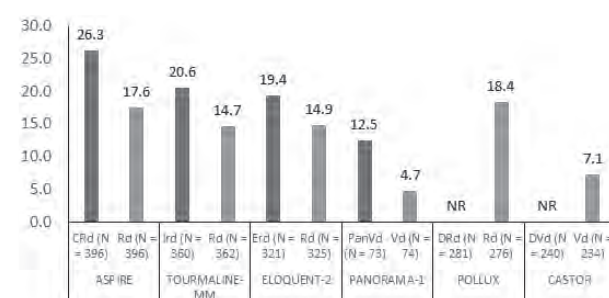
ПРОУЧВАНЕ	СРАВНЯВАНИ ЛЕКАРСТВА
ASPIRE ¹²	KRd vs Rd
ENDEAVOR ¹³	Kd vs Vd
TOURMALINE-MM ¹⁴	IRd vs Rd
ELOQUENT-2 ¹⁵	ERd vs Rd
PANORAMA-1 ¹⁶	PanVd vs Vd
POLLUX ¹⁷	DRd vs Rd
CASTOR ¹⁸	DVd vs Vd
MM-003 ¹⁹	POMDex vs HD-Dex

Въпреки, че представените данни за честота на терапевтичния отговор, продължителността на преживяемостта без прогресия и общата преживяемост не са получени от проучвания, проведени “head-to head”, основателно може да се придобие впечатление за сходна ефективност на различните нови медикаменти и комбинации

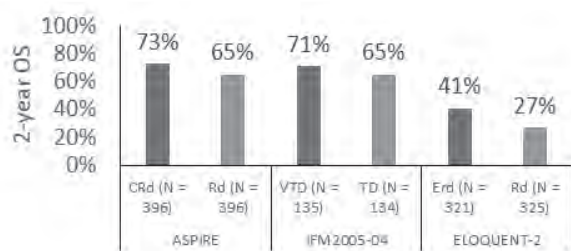
Фиг. 2 Общ терапевтичен отговор – сравнителни данни от 6 клинични проучвания



Фиг. 3. Преживяемост без прогресия – сравнителни данни от 6 клинични проучвания



Фиг. 4. Обща преживяемост на 2г – сравнителни данни



Данните за общ терапевтичен отговор, преживяемост без прогресия, обща преживяемост качество на живот и странични ефекти предоставят ценна информация за клиничните характеристики на тези лекарства, техните предимства и недостатъци. Въпреки големия брой включени пациенти, аргументираните статистически данни и добрите резултати, към съвременните клинични проучвания съществуват много критики.

КАКВО НЕ НИ КАЗВАТ КЛИНИЧНИТЕ ПРОУЧВАНИЯ?

1. Не съществува клинично проучване, което да сравнява директно нови лекарства. Дизайнът на всички цитирани проучвания предлага стандартно рамо, състоящо се от протеазомен инхибитор или имуномодулатор + дексаметазон спрямо експериментално рамо от нов медикамент + имуномодулатор или протеазомен инхибитор + дексаметазон. Има малко, ако изобщо има проучвания, които сравняват съвременните комбинации едни с други²⁰.

2. Дизайнът на съвременните проучвания и формулирането на крайните цели. Обикновено първична крайна цел е „преживяемост без прогресия“ вместо „обща преживяемост“ и „качество на живот“²¹.

3. Кратко време за проследяване. Обичайно докладването на резултатите за ефективност и ефикасност е във времеви период 2-3г, което е твърде кратко за реалистични данни за обща преживяемост. В съвременните пациенти с ММ със стандартен риск имат очаквана обща преживяемост около 8г.

4. За разлика от други индолентни лимфоми и хроничната лимфоцитна левкемия при мултиплен миелом няма „истинска“ таргетна терапия за болни с неблагоприятни цитогенетични рискови фактори. Нито едно от съвременните лекарства не показва достоверно предимство в неблагоприятните рискови групи пациенти.

5. Селекция на пациентите с благоприятни характеристики – по-млада възраст, запазена бъбречна функция, доказан отговор към предходно лечение, добро общо състояние, липса на тежки придружаващи заболявания²¹.

НАРЕД С КОРИГИРАНЕ НА ПОСОЧЕНИТЕ НЕДОСТАТЪЦИ, КАКВО ОЩЕ МОЖЕ ДА БЪДЕ НАПРАВЕНО?

1. В дизайна на клиничните проучвания ефикасността (разходната ефективност) да бъде заложена като вторична крайна цел. Конкретно при миелом спешно се нуждаем от проучвания, които да могат да отговорят на въпроса за разходната ефективност. Известно е, че фармацевтичните компании избягват упорито такива проучвания, докато провеждат проучвания предимно с регулаторни цели. Един от възможните подходи в тази ситуация е да се изисква от регулаторните агенции да бъдат по-взискателни към проучванията по отношение на фармакоикономическите въпроси.

2. Академичната общност, подкрепена от здравните власти, регулаторните агенции и фармацевтичния бизнес да бъде ангажирана с провеждане на проучвания, които отговарят на стратегически въпроси⁵. Например:

- Необходими са проучвания, които идентифицират лекарства, които са ефективни при всеки субтип пациенти с ММРР
- Още по-важно е да се проведат проучвания които посочват лекарства, които НЕ са ефективни за дадена категория пациенти
- Дали еквивалентна продължителност на живота може да бъде постигната при лечение с фиксирана продължителност спрямо настоящия стандарт – продължително лечение години наред²²⁻²⁴
- Известно е че съществуват болни, които постигат дълготрайни ремисии само с Rd или Rd + ASCT.²⁵ Вероятно със съвременни комбинации ще има популация пациенти които постигат и поддържат още по-качествени и дълготрайни ремисии. Отговорът на този въпрос могат да дадат само клинични проучвания.
- Възможно ли е да се адаптира терапията в зависимост от постигнатия отговор: при MRD (-) да спрем? В резултат се очаква подобряване на качеството на живот на пациента и намаление на разходите за лечение²⁶⁻²⁷.

Въпреки посочените критики към клиничните проучвания, новите лекарства за ММРР са несъмнено ефективни. Тяхната повишена ефективност върви, обаче с много голяма финансова стойност. Цените на новите лекарства и терапевтични режими дори в най-богатата страна на света – САЩ са изключително високи, което повдига все повече въпроси и активна обществена дискусия⁴ (табл 3).

Табл 3. Цена на медикаментите и терапевтичните режими за 1 год лечение в САЩ

ЛЕКАРСТВО	Цена в USD в САЩ / 1 год
Bortezomib	50 000
Lenalidomide	168 000
Thalidomide	60 000
Carfilzomib	130 000/ 260 000 за 56мг/м2
Ixazomib	111 000
Pomalidomide	192 000
Daratumumab	120 000
Elotuzumab	120 000
Panobinostat	96 000
Cyclophosphamide	5 800
Melfalan i.v	10 000 на трансплантация
Dexamethasone	3400
РЕЖИМИ	Цена в САЩ / год
VCD	60 000
VRD	220 000
LenDex	240 000
KRd	300 000
IRd	555 000
DRd	290 000
DVRd	340000
D-KRd	590 000
EloLenDex	430 000

Табл 4. Позитивен лекарствен списък, Национален съвет по цени и реимбурсиране към 02.08.2019г

Лекарство	Количество	Референтна цена
Bortezomib* 3.5mg	1 фл	321.05 лв
Carfilzomib (Kyprolis) 10mg	1фл	371.26 лв
Carfilzomib (Kyprolis) 30mg	1фл	1113.78 лв
Carfilzomib (Kyprolis) 60мг	1фл	2227.56 лв
Ixazomib (Ninlaro) 2.3mg	1 оп	5236.30 лв
Ixazomib (Ninlaro) 3.0mg	1 оп	6829.96 лв
Ixazomib (Ninlaro) 4.0mg	1 оп	9106.61 лв
Daratumumab (Darzalex) 20mg/ml – 20ml	1 фл	3964.34 лв
Daratumumab (Darzalex) 20mg/ml – 5ml	1 фл	991.09 лв

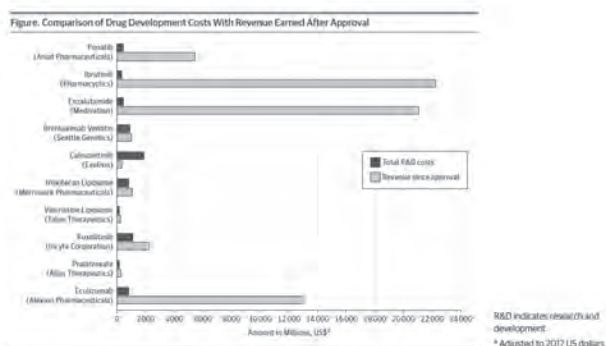
*Към 02.08.2019г – налични 6 генерични продукта

ЗАЩО СЪВРЕМЕННИТЕ ПРОТИВОТУМОРНИ ЛЕКАРСТВА СА ТОЛКОВА СЪПКИ?

1. Високи разходи за разработване на лекарството.

Разработването на един иновативен медикамент е продължителен процес, който включва няколко предклинични, последвани от клинични проучвания за получаване на регистрацията и след тях потвърдителни и мониторингови постмаркетингови проучвания. Претворяването на резултатите от лабораторията в клиниката е свързано и с немалък риск за неуспех²⁸. Предвид възможния риск за провал, фармацевтичните компании обикновено „играят на сигурно“ като структурират няколко паралелни клинични изпитвания и очакват поне едно от тях успешно да доведе до регулаторно одобрение. В резултат фармацевтичните компании компенсират своята инвестиция чрез повишаване на цената на одобрените лекарства²⁹. В анализ на Tufts Center for the Study of Drug Development, авторите изчисляват \$2.7 милиона USD за развойна дейност за едно съвременно противотуморно лекарство³⁰. Тази сума е 8 пъти по-висока от сумата \$32 милиона калкулирана от друга агенция – Public Citizen. Наличието на толкова съществена разлика изисква по-прецизен анализ. Такъв предлагат Prasad and Mailankody, които установяват, че цената за развойна дейност на един съвременен противотуморен медикамент е средно \$648 милиона при проучване върху 10 противотуморни лекарства.³¹ Средната възвращаемост е калкулирана на \$1658.4 милиона за един медикамент! Категорично е становището, че възвращаемостта след одобрение е значително по-висока от разходите за развойна дейност. (граф 2.)

Граф. 2 Инвестиция в развитие и възвращаемост на средствата на нови противотуморни медикаменти



2. Виртуални монополи и липса на пазарна конкуренция.

След регулаторното одобрение, периодът до изтичане на патента е дълъг и гарантира монополно положение на фармацевтичната компания. Дори в случаите, в които новото лекарство е едно от няколко терапевтични опции при една и съща индикация, това не ограничава неговия монопол.

Тъй като ММ е нелечимо заболяване, а новото лекарство обикновено удължава времето до следващия релапс (следващо лечение), болните получават достъп до едно или повече нови лекарства последователно или в комбинация. Така, въпреки че има няколко регистрирани лекарства за ММРР всеки един пациент обикновено достига до всяко едно ново лекарство³². С изтичането на патента фармацевтичните компании разчитат на известни похвати за удължаване на това монополно положение – „нови и подобрени варианти за замяна на по-старата, по-токсична или по-неудобна за прием форма на медикамента“, сделки с генерични фармацевтични компании за забавяне на навлизането на техния продукт, законодателни спънки пред генеричния продукт и т.н. Не на последно място, с подходящ дизайн от дадено клинично проучване може да се остане с впечатление, че старото лекарство е по-неефективно от своята „нова и подобрена“ версия. Логично би било, пазарната конкуренция да доведе до понижаване на цените. Предвид посочените по-горе причини съществува изкривяване на пазарните взаимоотношения и понякога парадоксално цените вместо да падат остават същите или дори се повишават³²⁻³³. Дори конвенционалните Cyclophosphamide и Melphalan понастоящем са много по-скъпи. Факт е, че с навлизането на генерици и биоподобни продукти, истински спад на цените на Европейския пазар не се наблюдава: понижението е до 20-30%, но при по – добри пазарни условия би могло да бъде > 50%. От друга страна генериците и биоподобните имат нужда лекарите да вярват в техните качества, на базата на доказана добра производствена практика и не по-лоши клинични характеристики. За съжаление, известни са данни, които показват, че в до 10% от генериците липсва активно вещество? Дискутира се и широката вариационност в мощността и чистотата на тези лекарства⁴. За всички участници при приложението на генерици и биоподобни изискванията за качество не трябва да бъдат принижавани. Съществуват стъпки в правилната посока: да се улесни законодателната процедура спрямо генеричните и биоподобни медикаменти за по-бърз достъп до пазара като доказан и успешен начин за стимулиране на конкуренцията; да се вземат мерки срещу опитите на фармацевтичния бизнес да прилага стратегията „pay-for-delay“, скорошните предложения на МЗ за повече здравно – осигурителни фондове; продължителността на патента може да бъде законодателно фиксирана и опитите за удължаване да бъдат спирани³⁴⁻³⁵.

3. Относно т. нар „разходна ефективност“.

Когато говорим за пари в лечението на ММ не се опитваме да поставим етикет с цена на човешкия живот. По – скоро се опитваме да поставим цена на продукт, на който е гарантирано монополно положение. В една монополна ситуация, нормалните

пазарни принципи, базирани на качество, потребности и доставка не съществуват. Без разумна протекция нищо не би могло да спре покачването на цените с всяка следваща година, без обоснова на причина, както това се случва при ММРР36. За разлика от САЩ, където застрахователите нямат право да договарят пряко цена с производителя на лекарството 37-39, в повечето Европейски страни, Канада и Австралия регулаторното одобрение е само първата стъпка40-41. После цената на лекарството е подложено на преговори на базата на стойността, която предоставя. В нашата страна също съществува законодателна процедура, която дава възможност на здравните власти в лицето на оторизираните структури да договарят подходяща цена при одобрението на ново лекарство. При одобрението, както и при договарянето на цената, стойността на новото лекарство се определя чрез оценка на клиничната добавена стойност в сравнение с наличните алтернативи; изчисляване на спечелените QALY и инкременталното съотношение цена/ефективност. СЗО малко спорно определя лимит на цената на лекарството като % от БВП / глава население и на практика в страните с по-нисък БВП тази препоръка е невъзможна за изпълнение42-44.

4. Гледната точка на пациентите и гледната точка на обществото.

При сериозни диагнози и смъртоносни болести пациентите са склонни да плащат дори за минимално подобрение. Известно е, че фармацевтичните компании получават подкрепа от страна на пациентските организации, които на свой ред са спонсирани от фармацевтичния бизнес45-46. В повечето развити страни, както и в РБългария пациентите не са преки платци за лекарствата. Така във фармацевтичния сектор е по-лесно да се поддържат нереалистично високи цени за разлика от други сфери на икономиката, в които традиционно клиентът избира продукта и заплаща според това, което може да си позволи. Очевидно е, че този модел на реимбурсиране и навлизане на нови лекарства на пазара е необоснован от социална гледна точка, тъй като и най-богатите здравни системи не са с неизчерпаеми ресурси. За здравноосигурителна система с голям брой здравно неосигурени болни и с по-малки финансови възможности, каквато е нашата, последиците от лавинообразно нарастващите цени на лекарствата са още по-тежки. РБългария от една страна е част от Европейския съюз и българските пациенти би трябвало да имат достъп до лечение, както в останалите европейски страни. От друга страна Р. България е най-бедният член на Европейския съюз и високите цени на онкомедикаментите са изключителен товар за здравно-осигурителната система. Това води до забавяне на процеса на одобрение на нови лекарства средно с 2-3 г спрямо Европа и с още 2-3г спрямо САЩ; отказ на фармацевтич-

ни компании да участват в тежки процедури при един много малък пазар; непълноценни лекарствени комбинации; субдозирание, промяна на ритъма на приложение и др. в опит за спестяване на разходи, а за някои лекарства – както иновативни, така и конвенционални – пълна липса на достъп. Цената за лечението на пациентите с ММ се заплаща от хората без миелом. ММ е само 1% от всички злокачествени заболявания. Всички онкокарства са скъпи, а раковите заболявания са широко разпространени и към днешна дата „ракът“ е най-масовият убиец. Как заплаща обществото? С по – високи здравни осигуровки, по-високи данъци, ограничаване на други социални програми и социални придобивки47-48.

5. По-добри Национални препоръки/ Методични указания/ Фармакотерапевтични ръководства.

Настоящите основни международни и национални препоръки за лечение на ММРР представят списък от терапевтични възможности и служат като основа за реимбурсиране (включване в позитивния лекарствен списък за Р България). Много от авторите на тези указания и препоръки са утвърдени специалисти, които институциите използват като експерти, но те рядко са в конфликт на интереси49. До сега тези международни и национални указания не предоставят препоръки как да се осигури най – разходно-ефективното лечение. Дори и най – балансираните ръководства лесно биха могли да бъдат използвани в подкрепа на най-скъпата възможност, тъй като именно балансираните препоръки вместо да посочат преференциален избор, посочват лекарства с много различни цени като равнопоставени алтернативи. Нужни са препоръки, базирани на доказателства, които критично проучват достъпните данни и не само дават ясна препоръка за преференциални режими, но също идентифицират режими, които да не се прилагат при конкретни групи пациенти, ако няма данни в подкрепа на по-добри резултати в сравнение със стандартното по-евтино лечение50. NCCN за първи път през 2019г започна инициатива за препоръки, базирани на стойността на терапията. ЕМА също разработва подобни изисквания51. IMWG предвиждат фармако-икономическа оценка в следващите препоръки.

КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА – ФАРМАКО-ИКОНОМИЧЕСКИ ПОДХОД В ТРИ ПРИМЕРА.

Пример 1 – Новодиагностициран болен с ММ.

Терапевтичният режим VRD е по-ефективен от Rd при новодиагностицирани пациенти с ММ52. Въпреки това, в много страни вкл България това е скъпа схема, недостъпна поради икономически и регулаторни проблеми. Сравнителни данни за VCD или VTD спрямо VRD, не са налични. Това

не означава, че тези режими са по-неефективни. Клиничната практика показва, че VCD има сходна активност и представлява разумна алтернатива.

Пример 2. Поддържащо лечение.

Lenalidomide значително удължава преживяемостта без прогресия. Оптималната продължителност е неизвестна до сега, въпреки че се трупат данни, както в подкрепа на лечение с фиксирана продължителност, така и в полза на продължителното лечение²²⁻²⁵. За клиничната практика би могло да се обсъди приложение за ограничен период от време (1-2 години), на базата на данни от проучвания ако разходите за неопределена продължителност са неприемливи за регулаторните органи. Подходът с ограничена продължителност на терапията е по-добра алтернатива на неприлагането на каквото и да е посттрансплантационно лечение

Пример 3. Лечение при рецидив.

Успешното лечение на рецидива е възможност да се осигури ефективна терапия и контрол на болестта в продължение на години. Имаме избор за лечение с нови медикаменти, втора АСКТ или повторно лечение с Bortezomib – съдържащ режим. Няма данни, че последователността, в която се прилагат схемите, е от значение по отношение на общата преживяемост. При такава постановка, изборът на по-евтини режими в началото на заболяването е по-рентабилно, тъй като продължителността на терапията намалява при всеки рецидив, както и се появяват генерични форми^{5,48}.

ВМЕСТО ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ГЛЕДНАТА ТОЧКА НА ЛЕКАРЯ/ЕКСПЕРТ

- Фармакоикономическите анализи не могат обективно да оценят едновременно стойността за пациента и стойността за обществото
- Изредихме много критики към различните участници в процеса на формиране на цената на лекарствата, но без обективното участие на академичната общност с насоченост за прагматични решения, които са първо и основно в полза на пациента, напредък не би могъл да бъде постигнат.
- Бъдещето на ММ е светло, именно поради наличието на много нови и ефективни терапевтични възможности.
- На желанието на здравните власти да проявят социална отговорност чрез понижаване на цените посредством засилен контрол противостои първата и основна отговорност на лекаря: пациента.
- Все по-честа е възможността даден пациент да живее достатъчно дълго и с добро качество, за да бъде облагодетелстван от достъп до ново ле-

чение, което да даде възможност за още по-ново лечение...

- Има и друга опция: да приемем, че излекуването е възможно – например с режим Daratumumab+Carfilzomib+Lenalidomide+Dexamethasone, консолидация с АСКТ или CAR-T терапия? Близкото бъдеще ще покаже... Имаме честта да участваме!

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Harousseau JL, Attal M. How I treat first relapse of myeloma. *Blood*. 2017;130(8):963-973
2. Laubach J, Garderet L, Mahindra A, et al. Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia*. 2016;30(5):1005-1017.
3. Sonneveld P, Broijl A. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Haematologica*. 2016;101(4):396-406.
4. Fonseca R, Hinkel J. Value and Cost of Myeloma Therapy American Society of Clinical Oncology Educational Book 2018 :38, 647-666
5. Rajkumar SV, Harousseau JL. Next-generation multiple myeloma treatment: a pharmacoeconomic perspective. *Blood*. 2016;128(24):2757-2764.
6. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, et al. ESMO Guidelines Committee. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv52-iv61.
7. Горанова-Маринова В. Ръководство за диагностика и лечение на хематологични заболявания под редакцията на Генова М, Грудева-Попова Ж, Герчева – Кючукова Л, Калева В, Балаценко Г, Горанов С, Райнов Ю. Глава „Болести на плазмоцитната редица“ стр 421-445. Изд. „Армтрейсър“, Варна 2018г
8. Mohty M, Harousseau JL. Treatment of autologous stem cell transplant-eligible multiple myeloma patients: ten questions and answers. *Haematologica*. 2014;99(3):408-16.
9. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Malard F, et al. Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2019;9(4):44.
10. Pessoa de Magalhães RJ, Crusoe E, Riva E, et al. Analysis of Availability and Access of Anti-myeloma Drugs and Impact on the Management of Multiple Myeloma in Latin American Countries. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19(1):e43-e50.
11. Mohty M, Terpos E, Mateos MV, et al. Myeloma Treatment in Real-world Clinical Practice: Results of a Prospective, Multinational, Noninterventional Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18(10):e401-e419.
12. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al; ASPIRE Investigators. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;372(2):142-152.
13. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A, et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomized, phase 3, open-label multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016;17(1):27-38
14. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, et al; TOURMALINE-MM1 Study Group. Oral ixazomib, lenalidomide, dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016;374(17):1621-1634
15. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, et al; ELOQUENT-2 Investigators. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373(7):621-631
16. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, et al. Overall survival of patients with relapsed multiple myeloma treated with panobinostat or placebo plus bortezomib and dexamethasone (the PANORAMA 1 trial): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2016;3(11):e506-e515.
17. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, et al; POLLUX Investigators. Daratumumab, lenalidomide and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-1331.
18. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, et al. Daratumumab, bortezomib and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(8):754-766
19. San Miguel J, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1055-1066.
20. Richardson P, San Miguel J, Moreau P, et al. Interpreting clinical trial data in multiple myeloma: translating findings to the real-world setting. *Blood Cancer Journal* 2018; 8:109
21. Kim C, Prasad V. Cancer drugs approved on the basis of a surrogate end point and subsequent overall survival: an analysis of 5 years of US Food and Drug Administration approvals. *JAMA Intern Med*. 2015;175(12):1992-1994.

22. Palumbo A, Gay F, Cavallo F, et al. Continuous therapy versus fixed duration of therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2015;33(30):3459-3466.
23. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1770-1781.
24. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, et al; IFM Investigators. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1782-1791.
25. Gay F, Oliva S, Petrucci MT, et al. Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: a randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1617-1629.
26. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016;17(8):e328-e346.
27. Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, Epstein J, Morgan GJ, Crowley J. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood*. 2014;124(20):3043-3051.
28. Moreau P, Rajkumar SV. Multiple myeloma—translation of trial results into reality. *Lancet*. 2016;388:111-113.
29. Yu N, Helms Z, Bach P. R&D costs for pharmaceutical companies do not explain elevated US drug prices. *Health Affairs Blog*. <http://healthaffairs.org/blog/2017/03/07/rd-costs-for-pharmaceutical-companies-do-not-explain-elevated-us-drug-prices/>
30. Avorn J. The \$2.6 billion pill—methodologic and policy considerations. *N Engl J Med*. 2015;372(20):1877-1879.
31. Prasad V, Mailankody Sh. Research and Development Spending to Bring a Single Cancer Drug to Market and Revenues After Approval. *JAMA Intern Med*. 2017;177(11):1569-1575.
32. Bennette CS, Richards C, Sullivan SD, et al. Steady Increase in prices for oral anticancer drugs after market launch suggests a lack of competitive pressure. *Health Aff (Millwood)*. 2016;35:805-812.
33. Goldstein DA, Sarfaty M. Cancer drug pricing and reimbursement: lessons for the United States from around the world. *Oncologist*. 2016;21:907-915.
34. Siddiqui M, Rajkumar SV. The high cost of cancer drugs and what we can do about it. *Mayo Clin Proc*. 2012;87:935-943.
35. Kantarjian H, Rajkumar SV. Why are cancer drugs so expensive in the United States, and what are the solutions? *Mayo Clin Proc*. 2015;90:500-504.
36. Institute for Clinical and Economic Review. Treatment options for relapsed or refractory multiple myeloma: effectiveness, value and value-based price benchmarks. Evidence report. 5 May 2016. http://icer-review.org/wp-content/uploads/2016/05/MWCEPAC_MM_Evidence_Report_050516-002.pdf
37. Chen Y, Lairson DR, Chan W, et al. Cost-effectiveness of novel agents in Medicare patients with multiple myeloma: findings from a U.S. payer's perspective. *J Manag Care Spec Pharm*. 2017;23:831-843.
38. Carlson JJ, Guzauskas GF, Chapman RH, et al. Cost-effectiveness of Drugs to Treat Relapsed/Refractory Multiple Myeloma in the United States. *J Manag Care Spec Pharm*. 2018;24:29-38.
39. Bach PB, Pearson SD. Payer and policy maker steps to support value based pricing for drugs. *JAMA*. 2015;314:2503-2504.
40. Flume M, Bardou M, Capri S, et al; Payers' Insight. Feasibility and attractiveness of indication value-based pricing in key EU countries. *J Mark Access Health Policy*. 2016;4:4.
41. Ratiery J, Powell J. Health technology assessment in the UK. *Lancet*. 2013;382:1278-1285.
42. Pettitt DA, Raza S, Naughton B, et al. The limitations of QALY: a literature review. *J Stem Cell Res Ther*. 2016;6:1-7.
43. Marseille E, Larson B, Kazi DS, et al. Thresholds for the costeffectiveness of interventions: alternative approaches. *Bull World Health Organ*. 2015;93:118-124.
44. Glick HA, McElligitt S, Pauly MV, et al. Comparative effectiveness and cost-effectiveness frequently agree on value. *Health Aff (Millwood)*. 2015;34:805-811.
45. Zafar SY, Peppercom J, Asabere A, et al. Transparency of industry sponsored oncology patient financial assistance programs using a patient-centered approach. *J Oncol Pract*. 2017;13:e240-e248.
46. Zullig LL, Wolf S, Vlastelica L, et al. The role of patient financial assistance programs in reducing costs for cancer patients. *J Manag Care Spec Pharm*. 2017;23:407-411.
47. Lee C, Grigorian M, Nolan R, et al. A retrospective study of direct cost to patients associated with the use of oral oncology medications for the treatment of multiple myeloma. *J Med Econ*. 2016;19:397-402.
48. MacEwan JP, Batt K, Yin W, et al. Economic burden of multiple myeloma among patients in successive lines of therapy in the United States. *Leuk Lymphoma*. 2018;59:941-949.
49. Mitchell AP, Basch EM, Dusetzina SB. Financial relationships with industry among National Comprehensive Cancer Network guideline authors. *JAMA Oncol*. 2016;2:1628-1631.
50. Green T, Bron D, Chomienne C, et al. Costs of haematological disease high and rising. *Lancet Haematol*. 2016;3:e353-e354.
51. Hagenbeek A, Engert A, Kaptein P, et al. On behalf of the EHA Task Force on Fair Pricing/Affordability of Medicines a Top Priority for EHA: Toward a Fair Pricing Model for Innovative Medicines HemaSphere. 2017;1(1) p e12.
52. Durie BG, Hoering A, Abidi MH, et al. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 389 (10068):519-527.

КОСТНА МИНЕРАЛНА ПЛЪТНОСТ ПРИ ВЪЗРАСТНИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С ТРАНСФУЗИОННО – ЗАВИСИМА БЕТА ТАЛАСЕМИЯ В ЕРАТА НА ТРАНСФУЗИОННА И ХЕЛАТИРАЩА ТЕРАПИЯ – РОЛЯ НА ТАЛАСЕМИЯ-СВЪРЗАНИТЕ ОТКЛОНЕНИЯ

Сапунарова К.^{1,5}, Горанова- Маринова В.^{1,5}, Денева Т.³, Цветкова С.⁴, Георгиев П.^{1,5}, Грудева- Попова Ж.^{2,5}

1 – Медицински университет- Пловдив, Медицински факултет,

Първа катедра по вътрешни болести, секция хематология

2 – Медицински университет – Пловдив, Медицински факултет, Катедра по клинична онкология, секция по медицинска онкология, Университетска болница “Св. Георги” Пловдив;

3 – Медицински университет – Пловдив, Фармацевтичен факултет, Катедра по клинична лаборатория, Университетска болница “Св. Георги” Пловдив, Централна клинична лаборатория;

4 – Медицински университет – Пловдив, Медицински факултет, Катедра по образна диагностика, ДКЦ “Св. Георги Победоносец” Пловдив;

5 – Университетска болница “Св. Георги” Пловдив, клиника по клинична хематология;

**Изследването е финансирано по вътреуниверситетски проект №02/2017 на МУ Пловдив*

BONE MINERAL DENSITY IN THE ERA OF TRANSFUSION AND CHELATING THERAPY- HOW SIGNIFICANTLY THE THALASSEMIA ALTERATIONS MATTER – FIRST BULGARIAN STUDY IN ADULT PATIENTS WITH TRANSFUSION DEPENDENT BETA-THALASSEMIA

Sapunarova K.^{1,5}, Goranova-Marinova V.^{1,5}, Georgiev P.^{1,5}, Deneva T.³, Tsvetkova S.⁴, Grudeva-Popova Zh.^{2,5}

1 – Medical University – Plovdiv, Faculty of Medicine, First Department of Internal Medicine, Department of Hematology

2 – Medical University – Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Medical Oncology, University Hospital «Sv. Georgi» Plovdiv;

3 – Medical University – Plovdiv, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Laboratory, University Hospital «Sv. Georgi» Plovdiv, Central Clinical Laboratory;

4 – Medical University – Plovdiv, Faculty of Medicine, Department of Imaging Diagnostics, University Hospital «Sv. Georgi» Plovdiv;

5 – University Hospital «Sv. Georgi» Plovdiv, Clinic of Clinical Hematology;

**The study is funded under the University project №02 / 2017 of the Medical University of Plovdiv*

Резюме.

Въведение: Таласемия- свързаните отклонения продължават да оказват значително влияние върху КМП при пациентите с таласемия дори и в ерата на трансфузионно и хелатиращо лечение.

Цел на изследването: да се характеризира тежестта на отклонения в КМП при възрастни български пациенти с трансфузионно зависима бета- таласемия и връзките ѝ с демографски, антропометрични и таласемия- свързани отклонения: тежест на анемичния синдром, напрегнатост на хематопоезата, тежест на вторичната хемосидероза, спленектомично състояние, тежест на ендокринните отклонения.

Пациенти и методи: Изследвани са 62- ма пациенти с ТЗБТ и 30 клинично здрави доброволци, съпоставими по основни демографски и антропометрични показатели. Костната минерална плът-

ност при цялата популация е измерена чрез двойно енергийна абсорбциометрия (DXA) с апарат HOLOGIC Discovery C (S/N 47070) на спинално ниво L1-L4 и бедрена шийка, представена чрез Z-скори в g/cm². Средните стойности на претрансфузионния хемоглобин, показателите на желязния товар и актуална информация за гонадни и паратиреоидния статус при пациентите са снети от наличната документация.

Статистически анализи: използвани са дескриптивен анализ, тест на Kolmogorov-Smirnov, t-test, Wilcoxon-Mann-Whitney-U, еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA, Pearson и Spearman корелационни анализи, регресионни анализи. Данните са обработени със статистически продукт SPSS, v24 (Statistical package for Social Science, Armonk, NY: IBM corp.). Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SD или медиана (размах) и отчетени при допустимо ниво на грешка алфа 0.05.

Резултати: Установената честота на СОО оценено с най-ниският Z-скор при мъжете с ТЗБТ е: остеопороза 53.1% (n=17), остеопения 40.6% (n=13) и нормална КМП 6.2% (n=2); При жените данните в същата последователност са 56.7% (n=17), 36.7% (n=11), 6.6% (n=4). Разликата в средните стойности на КМП (Z-скор и g/cm²) между пациентите и контролните лица е сигнификантна и при двата пола и на двете изследвани нива (p<0.05). Установихме средни по сила корелации между стойностите на КМП и стойностите на претрансфузионния хемоглобин, периферните еритробласти, чернодробния и сърдечен желязен свръхтовар (Pearson and Spearman correlations). Спленектомията е рисков фактор за развитието на остеопороза при пациентите с ТЗБТ (t-test, p<0.05) Хипогонадизмът и хипопаратиреоидизмът влияят несигнификантно върху КМП във възрастта над 18 години (t-test, p>0.05).

Извод: Установените количествени връзки между КМП и основните таласемия-свързани отклонения създават основа за индивидуализиране на управлението на СОО при възрастните пациенти с ТЗБТ. При анализ на рисковете, когато се обсъжда евентуална спленектомия е необходимо да се има предвид и нейното значимо влияние върху костното здраве на пациентите.

Ключови думи: Таласемия, остеопороза, костна минерална плътност, чернодробен желязен товар, ДЕКСА

Abstract.

Introduction: Even in the era of transfusion and chelating therapy the thalassemia-related alterations continue to influence significantly on bone mineral density (BMD) in patients with thalassemia.

Purpose of the study: In this study we aimed to characterise the osteopenia/osteoporosis syndrome (OOS) in adult Bulgarian patients with transfusion-dependent beta-thalassemia (TDBT), and to evaluate the influence of the leading thalassemia-related alterations on BMD parameters.

Studied populations and methods: 62 TDT patients (32 males, mean age 32.03 $\pm$ 12.99 years, and 30 females, mean age 31.80 $\pm$ 10.60) and 30 (15 males and 15 females) healthy controls, matched for demographic and anthropometric data were studied. BMD Z-scores and areal BMD were measured via dual-energy X-ray absorptiometry (HOLOGIC Discovery C densitometer) at spinal L1-L4 level and the femoral neck. From the patient's records were collected data about pre-transfusion hemoglobin, serum ferritin, liver and cardiac iron overload (magnetic resonance imaging techniques), as well as gonadal and parathyroid status.

Statistical analysis was processed via SPSS, v24. The results were presented as means $\pm$ SD or medians (range). All p-values were two sided, with level of significance 0.05.

Results: The prevalence of OOS in males with TDBT was as follows: osteoporosis 53.1% (n = 17), osteopenia 40.6% (n = 13), and normal BMD 6.2% (n = 2); The distribution of OOS in female with TDBT was as follows: osteoporosis 56.7% (n = 17), osteopenia 36.7% (n = 11), and normal BMD 6.6% (n = 4). The patients with TDBT have significantly lower BMD compared to healthy controls at both investigated levels (p < 0.05). In both sites, significant linear correlations of BMD (Z-scores and areal BMD) were found in pre-transfusion hemoglobin level, peripheral erythroblast count, liver iron concentration, and cardiac T2* (the last parameter not significant for the areal BMD at femoral neck). Splenectomised patients had significantly lower spinal BMD than nonsplenectomised patients (p < 0.05). Hypogonadism and hypoparathyroidism showed a non-significant influence on BMD (p > 0.05 for all comparisons).

Conclusions: The severity of the chronic anemic state, ineffective hematopoiesis, the severity of liver iron overload and splenectomy significantly contribute to the development of OOS in patients with TDBT over the 18 years of age.

Key words: Thalassemia, osteopenia/osteoporosis syndrome, LIC, bone mineral density, DXA

ВЪВЕДЕНИЕ

Общоприетото становище за водещото влияние на таласемия- свързаните фактори върху костната здравина през последните години загуби вниманието на специалистите, и бе заменено от стремеж към откриване на връзки между костната минерална плътност (КМП) и молекулярни механизми, влияещи върху костната здравина. Паралелният напредък в оценката на КМП и железния товар, създадоха условия да бъде събуден отново интересът към изучаване на количествените връзки, които стоят между ниската КМП и основните отклонения при бета-таласемия в ерата на трансфузионно и хелатиращо лечение.

Описанията на таласемичната костна болест от първото съобщение на заболяването от Cooley през 1925 година до наши дни, позволяват да бъдат проследени различните модели на таласемичната костна болест- от тежки костни деформации и ранни фрактури, до добре контролирани пациенти с лекостепенен дефицит на костна маса и дори нормална КМП[1,2]. Макар че в нашето съвремие вече не се наблюдават тежките костни поражения, свързани с това заболяване, проблемът за ниската КМП, като биомеханичен елемент с влияние върху костната здравина, остава предизвикателство [3-8]. По литературни данни честотата на СОО при добре лекувани пациенти с ТМ, от различни етноси и расова принадлежност независимо от пола, е приблизително 40–50% [9,10]. Leung. и екип през 2004г представят данни за остеопороза на спинално ниво при 62% от 53 изследвани китайски пациенти на средна възраст 14 години [11]. Ирански екип изнася данни за СОО при ТМ- до 65,6% сред група от 326 пациенти[12]. При проспективно изследване на 42 индийски пациенти с ТМ, Merchant и екип установяват СОО до незавидните 80 % от пациентите [13].

Характеристиката на СОО при пациентите с бета-таласемия се различава от тази при общата популация с по- младата възраст на пациентите, значителният брой рискови фактори с отношение към костната загуба, отговора към лечението с медикаменти за повлияване на костната деструкция или стимулиране на костния синтез. Преди ерата на хипертрансфузионна и хелаторна терапия, костните фрактури сред пациентите с ТМ и ТИ се съобщават с честота около 50 %, мултипленост и почти винаги с трайни остатъчни тежки деформации[14,3,15,16]. Това води до инвалидизиращи последици, с ограничение на възможността за нормална социална интеграция на тези хора[3].

ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Настоящото изследване цели да се представи честотата на СОО при възрастни български пациенти с трансфузионно зависима бета- таласемия, както и да се оценят: връзката между КМП и демографски и антропометрични показатели, да се да определят количествените зависимости между показателите на КМП и таласемия- свързаните отклонения, както и влиянието на спленектомично състояние, хипогонадизма и хипопаратиреоидизма върху отклоненията в КМП.

ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

В периода м. април 2017 – м. май 2018 са изследвани и проследени общо 92 лица, разпределени както следва: 62- ма пациенти с трансфузионно зависима бета таласемия и 30 клинично здрави доброволци. Пациентите са подбрани сред тези, лекуващи се в клиниките по клинична хематология, клиника по детски и генетични заболявания на УМБАЛ “ Св. Георги” Пловдив и клиника по хематология към УМБАЛ “ Проф. Г. Киркович”, Ст. Загора. Като включващи критерии за подбор на пациентската група се определиха: възраст > 18 г., електрофоретично потвърден бета- таласемичен синдром, трансфузионна зависимост. Изключващите критерии за цялата изследвана група са: възраст < 18 години, анамнеза за фамилни костни заболявания, автоимунни заболявания, продължителна употреба на кортикостероиди, съпътстващо малигнено заболяване; диабет, съмнение за хроничен възпалителен процес, приложение на бифосфонат или денозумаб през последните 2 години. Всички изследвани лица са подписали писмено информирано съгласие преди участието в изследването, съобразено с декларацията от Хелзинки.

Пациентските характеристики и тези на здравите контроли са представени на табл. 1

Проучването е проспективно, диагностично и контролирано.

МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Чрез преглед на информация, приложена в история на заболяването, етапни епикризи, лабораторни фишове или електронни данни, са събрани следните параметри: демографски характеристики, актуални антропометрични данни, средно претрансфузионно ниво на хемоглобин, изчислено на тригодишна ретроспективна база, тежест

на желязния свръхтовар, определен чрез MRI (Ferriscan) техника- в mg/g сухо вещество за черен дроб и чрез времето на транзверзална релаксация (T2* в ms) за миокард. Демографските и антропометрични данни при здравите контроли са събрани в деня на DXA – изследването.

Костната минерална плътност бе измерена чрез метода на двойно енергийна абсорбциометрия (DXA) в областта на лумбални прешлени (ниво L1-L4) и бедрена шийка.. При всички изследвани лица измерването е извършено с апарат HOLOGIC Discovery C (S/N 47070), в базата на ДКЦ “Св. Георги Победоносец” ЕООД, Пловдив при спазване изискванията на протокола на производителя за извършване на изследването. Установеният коефициент на вариация(CV) за измерването на КМП на всички измервани нива е 1,0 %. За подразделяне на групите е приложена дефиницията на СЗО за степените на намаление на КМП. (за най- нисък измерен Z- скор: нормална КМП > /= -1,0-; остеопения < -1,0 > /= -2,5 ; остеопороза < -2.5). За целите на нашите сравнения ползвахме стойностите на КМП, представени в g/cm² и Z-скор, изчислени автоматично от софтуера на апарата въз основа на американска / европейска база данни за кавказката раса.

При статистическата обработка на данните са използвани дескриптивен анализ, тест на Kolmogorov-Smirnov, t-test на Student, Wilkoxon-

Mann-Whitney-U, еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA, Pearson и Spearman корелационни анализи, регресионни анализи. Данните са обработени със статистически продукт SPSS, v24 (Statistical package for Social Science, Armonk, NY: IBM corp.). Резултатите са отчетени при допустимо ниво на грешка алфа 0.05

РЕЗУЛТАТИ

Описателните характеристики на демографските, антропометричните и таласемия- специфичните показатели на пациентите (общо и поотделно за ТМ и ТИ) и здравите контроли, разделено по пол са представени на табл.1а и б. Съотношението между пациентите с ТЗБТ и здравите контроли е 2:1 и за двата пола. От общо 62-ма пациенти с ТЗБТ 47 са с тежка и 15 са със средно- тежка форма на заболяването. Първоначалният сравнителен анализ между тези две групи по основни демографски, антропометрични и таласемия- специфични характеристики, както и показатели на КМП не показва сигнификантна разлика, което позволи те да бъдат обединени в една обща група за целите на последващия анализ. Двете групи от здрави контролни лица са съпоставими с изследваните по пол, възраст и ИТМ (табл 1 а и б).

Табл.1а

Параметър	ТЗБТ, общо (33 пациента)	ТМ подгрупа (24 пациента)	ТИ подгрупа (9 пациента)	Здрави контроли (15 лица)
Възраст, год	32.03(12.99)	27.7(9.3)	43.0(15.08)	33.53(11.03)
средна стойност(CO)				
Височина, см.,	171.4(8.30)	171.5(8.07)	171.0 (9.36)	175.5(2.9)
средна стойност(CO)				
Тегло, кг ,	65.1(10.0)	64.2(9.4)	67.2 (11.8)	74.5(68.8)
средна стойност(CO)				
ИТМ, кг/м ² ,	22.2(2.6)	21.9(12.39)	23.0 (3.09)	23.6(2.57)
средна стойност(CO)				
Среден претр.Хб., г/л,	79.34(10.94)	79.7(11.08)	78.4(11.2)	(-)
средна стойност(CO)				
Среден тромб.брой x10 ⁹ /л	655.22(240.20)	662.83(254.20)	635.80(212.60)	(-)
средна стойност (CO)				
Среден брой еритробл. x10 ⁹ /л	24.22(16.27)	25.80(18.20)	20.15(9.30)	(-)
средна стойност (CO)				
Серумен феритин, ng/ml ,	1679.81(2029.33)	2118.60(2248.50)	558.41(293.4)	(-)
средна стойност (CO)				
ЧЖТ, мг/г с.в.,	11.25(7.58)	11.62(8.20)	10.44(5.98)	(-)
средна стойност (CO)				
СЖТ, T2* , мс,	28.04(9.07)	26.74(10.2)	31.38(3.98)	(-)
средна стойност (CO)				
Спленектомирани/неспленектомирани брой пациенти	23/9	17/6	3/6	0/15
Еугонадиъм/хипогонадиъм, брой пациенти	23/9	14/9	9/0	15/0
Нормо/хипопаратиреоидизъм, брой пациенти	27/5	18/5	9/0	15/0
Z- скор, ниво, L1-L4,	-2.70(1.12)	-2.92(1.05)	-2.12(1.12)	-0.14(0.72)
средна стойност(CO)				
КМП в г/см ² , ниво L1-4,	0.791(0.12)	0.770(0.110)	0.848(0.138)	1.12(0.08)
средна стойност (CO)				
Z -score, бедрена шийка	-1.36(1.11)	-1.47(1.11)	-1.06(1.11)	0.40(0.49)
средна стойност (CO)				
КМП г / см ² , бедрена шийка	0.732(0.12)	0.735(0.11)	0.730(0.153)	0.952(0.075)
средна стойност (CO)				

Табл.16

Параметър	ТЗБТ, общо (30 пациента)	ТМ подгрупа (24 пациента)	ТІ подгрупа (6 пациента)	Здрави контроли (15 лица)
Възраст, год				
средна стойност (СО)	31.8(10.6)	2829(7.41)	44.2(11.55)	32.87(10.73)
Височина, см.,				
средна стойност (СО)	161.3(6.5)	160.2(16.1)	165.3(6.65)	164.5(5.1)
Тегло, кг ,				
средна стойност (СО)	56.81(7.49)	56.33(7.60)	58.33(7.52)	55.13(5.50)
ИТМ, кг/м ² ,				
средна стойност (СО)	21.87(2.6)	22.05(12.81)	21.3(1.32)	20.40(2.01)
Среден претр.Хб., г/л,				
средна стойност (СО)	80.81(10.64)	82.35(11.65)	73.0(2.44)	(-)
Среден тромб.брой х10 ⁹ /л				(-)
средна стойност (СО)	624.70(312.41)	673.30(313.50)	621.60(300.62)	(-)
Среден брой еритробл. х10 ⁹ /л				(-)
средна стойност (СО)	25.94(32.23)	26.80(36.4)	33.50(18.70)	(-)
Серумен феритин , пг/мл ,				(-)
средна стойност (СО)	1593.83(1457.49)	1318.30(11393.90)	1950.00(31613.40)	(-)
ЧЖТ, мг/г с.в.,				(-)
средна стойност (СО)	18.80(13.38)	18.91(14.02)	17.39(9.24)	(-)
СЖТ, Т2*, мс,				(-)
средна стойност (СО)	28.07(9.38)	27.34(10.47)	30.85(4.58)	(-)
Спленектомирани/неспленектомирани				
брой пациенти	22/8	19/5	3/3	0/15
Еугона дизъм/хипогонадизъм,				
брой пациенти	16/14	11/13	5/1	15/0
Нормо/хипопаратиреоидизъм,				
брой пациенти	24/6	18/6	6/0	15/0
Z- скор, ниво, L1-L4,				
средна стойност (СО)	-2.56(1.08)	-2.51(1.12)	-2.68(-0.76)	-0.10(1.16)
КМП в г/см ² , ниво L1-L4,				
средна стойност (СО)	0.790(0.140)	0.806(0.133)	0.687(0.069)	1.08(0.15)
Z-score, бедрена шийка				
средна стойност (СО)	-1.54(0.75)	-1.53(0.79)	-1.80(0.49)	0.15(1.32)
КМП г / см ² , бедрена шийка				
средна стойност (СО)	0.691(0.130)	0.700(0.145)	0.642(0.085)	0.875(0.206)

Табл. 1 а и б. Основни демографски, антропометрични и клинични характеристики на пациентите с ТЗБТ и здравите контроли. 1а- мъже, 1б- жени. Данните са представени като средна стойност (СО-стандартно отклонение), ИТМ- индекс на телесна маса, ЧЖТ- чернодробен железен товар, СЖТ- сърдечен железен товар, (-)- не е изследвано.

Честотното разпределение на пациентите с ТЗБТ, групирани по степен на намаление на КМП според най- ниския измерен Z-скор (спинално ниво) е представено поотделно за двата пола (табл.2) .

Таблица 2. Честотно разпределение на групите мъже и жени с ТЗБТ според тежестта на намаление на костната минерална плътност (спинално ниво).

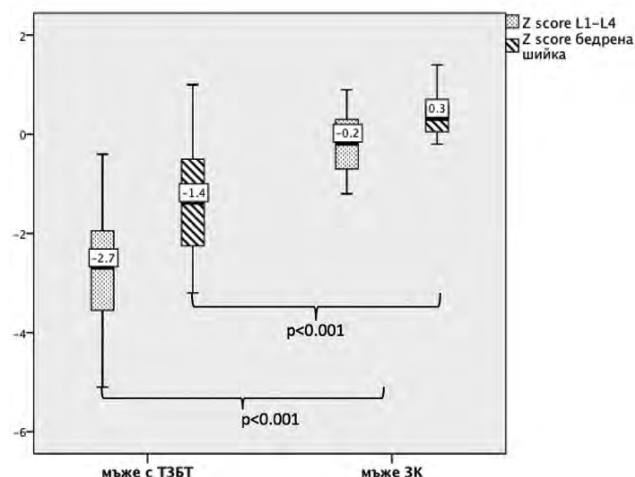
Пол	Статус на костната минерална плътност на спинално ниво L1- L4, N (%)			Общо	Р
	В норма	Остеопения	Остеопороза		
Мъже	2 (6.2)	13 (40.6)	17 (53.1)	32 (100.0)	0.779
Жени	2 (6.7)	11 (36.7)	17 (56.7)	30 (100.0)	
Общо	4 (6.5)	24 (38.7)	34 (54.8)	62 (100.0)	-

При мъжете с ТЗБТ, разделени в три групи според тежестта на намаление на КМП, установихме следната честота на СОО: 53.1% (n=17), 40.6% (n=13), 6.2% (n=2), съответно за остеопороза, остеопения и нормална КМП. Стойностите при жените за трите подгрупи в същата последователност са 56.7% (n=17), 36.7% (n=11), 6.7% (n=2). Не установихме сигнификантна разлика по пол (p=0.779).

Сравнителна оценка на Z- scores на спинално ниво L1- L4 и бедрена шийка при пациентите с ТЗБТ и здравата контролна група.

Средните стойности на КМП, в Z- скор и g/cm² на спинално ниво L1-L4 и ниво на бедрена шийка, представени отделно по пол, са отбелязани в таблица 1 а и б. Сравнителният анализ, осъществен на двете нива, и при двата пола показва сигнификантно по- ниски стойности на показателите на КМП в групата с ТЗБТ ($p < 0.001$ за всички сравнения и при двата пола). Анализът е представен графично на фиг 1а и б.

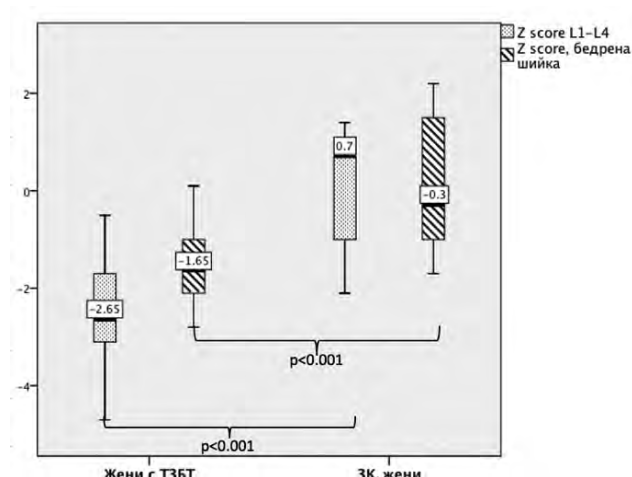
Фиг. 1 а



Оценка на средните стойности на Z- скор при кохортата с ТЗБТ, според възрастта и ИТМ.

Не установихме разлика в стойностите на КМП в групите пациенти с ТЗБТ под и над 28 години. Средният Z- скор на спинално ниво в групата с ТЗБТ под и над 28 години е съответно $-2.82, \pm 1.02$, $-2.43, \pm 1.14$, $p > 0.05$. На ниво бедрена шийка стойностите в двете подгрупи са $-1.49, \pm 0.96$, $-1.40, \pm .95$, $p > 0.05$. Не установихме сигнификантна разлика и в стойностите на КМП в групите ТЗБТ над и под 28 години, представена и в g/ cm².

Фиг. 1 б



Фиг. 1 а и б) Box- Plot – графични анализи на медианите на Z- скор на спинално ниво L1-L4 и бедрена шийка; Фиг 1 а- жени с ТЗБТ и здрави контроли. Фиг. 1 б – мъже с ТЗБТ и здрави контроли. Зоните са отбелязани на легендата.

Според ИТМ стойностите на Z- скор на спинално ниво и бедрена шийка в групата с ИТМ ≥ 22.00 са -2.48 ± 1.18 , -1.26 ± 1.04 ; за групата с ИТМ ≤ 22 са -2.78 ± 0.97 , -1.64 ± 0.80 ($p > 0.05$ за всички сравнения).

Оценка на връзката между показателите на КМП и таласемия- специфични показатели.

Установените корелации между показателите на КМП и ПРЕТРХБ, ПЕРЕРБЛ, ПЕРТРОМБ, СФ, ЧЖТ и СЖТ са представени на табл. 3.

Табл. 3. Корелации между показателите на КМП и таласемия- специфични показатели. rs- корелационен коефициент на Spearman, ПРЕТРХБ- претрансфузионен хемоглобин, ПЕРЕРБЛ- периферни еритробласти, ПЕРТРОМБ- периферни тромбоцити, СФ- серумен феритин, ЧЖТ- чернодробен железен товар, СЖТ- сърдечен железен товар (Spearman nonparametric correlation test) *(данните са значими при ниво на $p < 0.05$); ** (данните са значими при ниво на $p < 0.001$)

Ниво на измерване	Статистически показатели	ПРЕТРХБ	ПЕРЕРБЛ	ПЕРТРОМБ	СФ	ЧЖТ	СЖТ
Z-скор, L1-L4	Корелационен коефициент(rs) ниво на значимост, р брой пациенти	.594** 0.000 62	-.464** 0.000 62	-0.241 0.059 62	-0.147 0.253 62	-.440** 0.000 62	.285* 0.026 61
Z-скор, бедрена шийка	Корелационен коефициент(rs) ниво на значимост, р брой пациенти	.476** 0.000 62	-.359** 0.004 62	-0.087 0.503 62	-0.095 0.462 62	-.478** 0.000 62	.313* 0.014 61
КМП(г/см ²), L1- L4	Корелационен коефициент(rs) ниво на значимост, р брой пациенти	.502** 0.00 62	-.417** 0.001 62	-0.167 0.196 62	0.041 0.749 62	-.302* 0.017 62	0.124 0.343 61
КМП(г/см ²), бедрена шийка	Корелационен коефициент(rs) ниво на значимост, р брой пациенти	.334** 0.008 62	-.294* 0.02 62	-0.218 0.089 62	0.017 0.894 62	-.517** 0.00 62	0.196 0.131 61

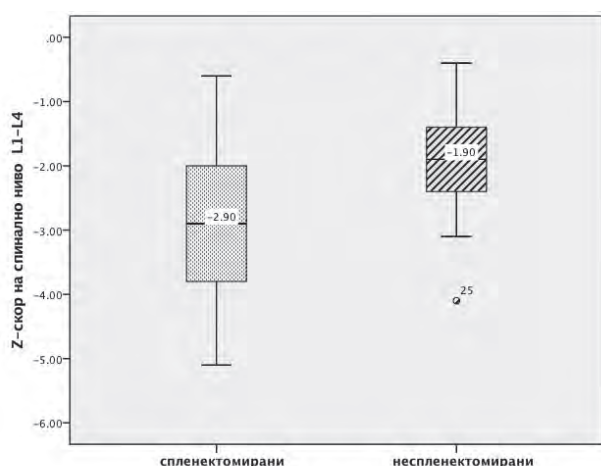
Статистически значими, положителни, средни по сила корелации между Z- скор и ПРЕТРХБ установихме и на двете тествани нива, като по- силна тя е на спинално ниво. Средна по сила, обратна зависимост се отчита между Z- скор и ПЕРЕРБЛ на нива L1-L4 и бедрена шийка. Средна по сила, обратна корелационна зависимост се установява между Z-скоровете на двете нива и железния товар (ЧЖТ и СЖТ). Не установихме сигнификантни корелации на Z-скоровете с ПЕРТРОМБ и СФ. Корелационният анализ, приложен между КМП в g/cm² и същите показатели(табл. 2), показва сигнификантни връзки с ПРЕТРХБ, ПЕРЕРБЛ, ЧЖТ. Силата и посоката на всяка връзка са отбелязани в таблицата. И тук не установихме корелация със

стойностите на СФ, като за разлика от КМП, представена чрез Z- скорове, корелацията на КМП в g/cm² и СЖТ тук се губи.

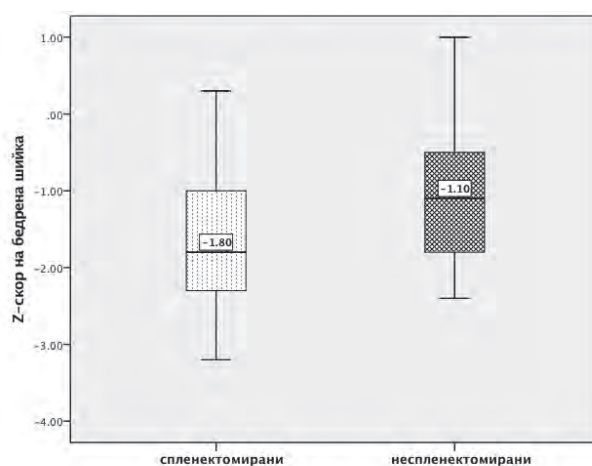
Оценка на КМП в групата ТЗБТ според спленалния статус.

Средният Z-скор за спленектомираната кохорта на спинално ниво е -2.88 ± 1.04 и -1.98 ± 0.98 за неспленектомираните, $p=0.003$; на ниво бедрена шийка стойностите са съответно -1.62 ± 0.90 и -0.98 ± 0.94 , $p=0.016$. (фиг.2). При представяне на стойностите в g/cm² се очертава само тенденция, без да се достига статистическа значимост.

Фиг. 2 а



Фиг. 2 б



Фиг. 2а и б. Box- Plot диаграми на стойностите на Z- скор на спинално ниво L1-L4 и бедрена шийка при спленектомирани и неспленектомирани пациенти.Разликата в стойностите и на двете изследвани нива е сигнификантна($p=0.003$ на спинално ниво L1-L4 и $p<0.016$ на ниво бедрена шийка).

Оценка на КМП в групата ТЗБТ според наличието на хипогонадизъм(ХГ).

На ниво L1-L4, сравнителният анализ не установи разлика в КМП (Z- скор и в g/cm²), при мъжете с ХГ с и без ХЗТ и ЕУГ. Стойностите на спиналния Z- скор, последователно за групите ХГ без хормонозаместваща терапия (ХЗТ) ($n=7$), ХГ с ХЗТ ($n=5$) и еугонадизъм (ЕУГ) ($n=20$) са съответно, -3.01 ± 1.48 , -3.50 ± 0.85 , -2.39 ± 0.95 , $p > 0.05$.Стойностите за КМП в g/cm², в същите групи и последователност са 0.784 ± 0.162 , 0.725 ± 0.0723 , 0.811 ± 0.114 , $p > 0.05$. На ниво бедрена шийка, стойностите на КМП за трите групи в Z- скор и g/cm², са: -1.79 ± 1.12 , -1.66 ± 0.92 , -1.13 ± 1.13 ; 0.695 ± 0.0914 ; 0.655 ± 0.098 , 0.768 ± 0.123 , $p > 0.05$ за всички сравнения, $p > 0.05$ за двете сравнения(Post Hoc ANOVA).

При жените с ТЗБТ, сравнителният анализ също не установи сигнификантни различия и на двете изследвани нива. На ниво L1-L4 стойностите на КМП (Z- скор и в g/cm²), в трите подгрупи, ХГ с ХЗТ($n=12$), ХГ без ХЗТ($n=3$) и ЕУГ($n=15$), стойностите на спиналния Z- скор, последователно са съответно, -2.66 ± 1.20 , -3.03 ± 0.98 , -2.15 ± 1.03 , $p > 0.05$. Стойностите за КМП в g/cm² в същите групи и последователност са 0.764 ± 0.167 , 0.762 ± 0.111 , 0.821 ± 0.148 , $p > 0.05$. На ниво бедрена шийка, стойностите на КМП за трите групи, отново в същата последователност, в Z- скор и g/cm² са, както следва -1.70 ± 1.56 , -1.82 ± 0.58 , -1.27 ± 0.63 ; 0.796 ± 0.333 ; 0.636 ± 0.064 , 0.718 ± 0.101 , $p > 0.05$ за всички сравнения, $p > 0.05$ за двете сравнения(Post Hoc ANOVA).

Оценка на КМП при ТЗБТ според наличието на хипопаратиреоидизъм

На ниво L1-L4, сравнителният анализ не установи разлика в КМП (Z- скор и в g/cm²), при пациентите с и без хипопаратиреоидизъм.Спиналния Z- скор, последователно за подгрупите с хипопаратиреоидизъм($n=11$) и нормопаратиреоидизъм($n=50$) е съответно, -2.77 ± 1.11 , -2.60 ± 1.10 , $p > 0.05$). Стойностите за КМП в g/cm² в двете подгрупи последователно са 0.811 ± 0.121 , 0.792 ± 0.128 , $p > 0.05$. На ниво бедрена шийка, Z- скор и КМП в g/cm² са: -1.42 ± 1.01 , -1.44 ± 0.95 , 0.757 ± 0.166 , 0.709 ± 0.113 , $p > 0.05$ за хипо-

и нормопаратиреоидизъм съответно (independent sample t-test).

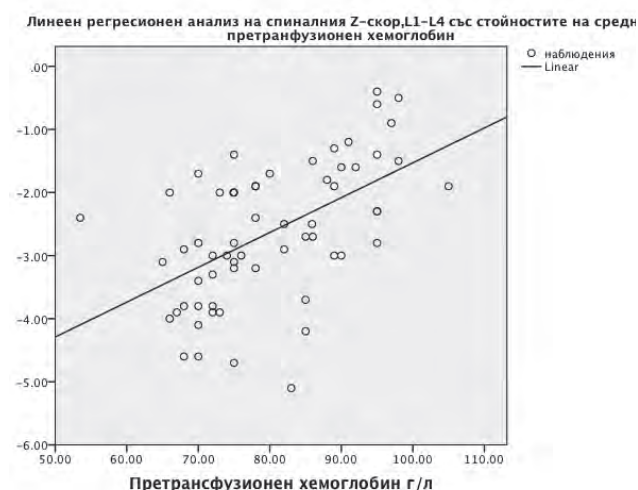
За изследване на самостоятелното влияние на таласемия- свързаните фактори върху стойностите на КМП приложихме регресионни анализи.

Линейната зависимост между стойностите на претрансфузионния хемоглобин и спиналния Z- скор показва средна по сила връзка ($R=0.542$, $\text{adj}R^2=0.29$, $B=0.055$, $p<0.001$). Самостоятелното влияние на претрансфузионния хемоглобин дава близо 30 % от изменението в стойността на спиналния Z- скор. За бедрена шийка, параметрите

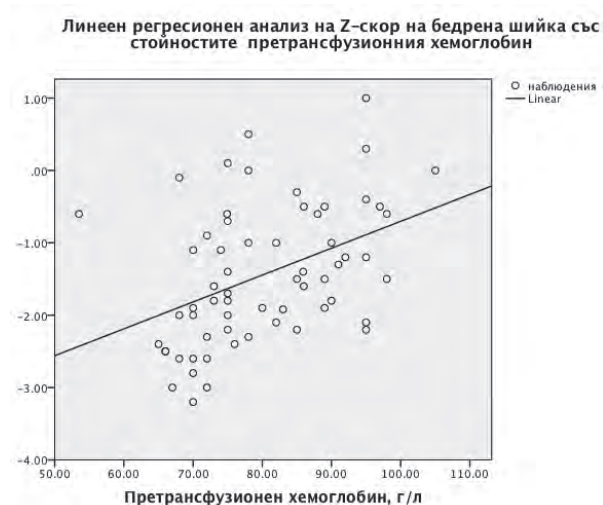
на същата зависимост са: $R=0.420$, $\text{adj}R^2=0.17$, $B=0.037$, $p=0.001$, т.е. връзката е също средна по сила, а степента на изменение на Z- скор в 17 % се обяснява със самостоятелното влияние на претрансфузионния хемоглобин. (фиг. 3а)

Функционалната връзка между Z- скорите и ПЕРЕРБЛ, показват сигнификантна линейна зависимост на ниво бедрена шийка ($R=0.304$, $\text{adj}R^2=0.093$, $B=-0.012$, $p=0.016$). Със самостоятелното влияние на този фактор се обяснява 9 % от изменението на стойността. (фиг. 3б)

Фиг. 3 а



Фиг. 3 б

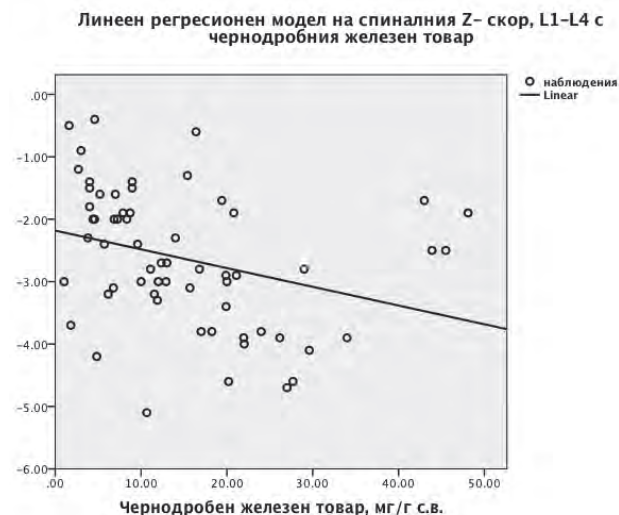


Фиг 3а,б. Линейни регресионни модели между стойностите на ПЕТРХБ и стойностите на Z- скор, на ниво L1-L4 (фиг.3а) и бедрена шийка (фиг.3б).

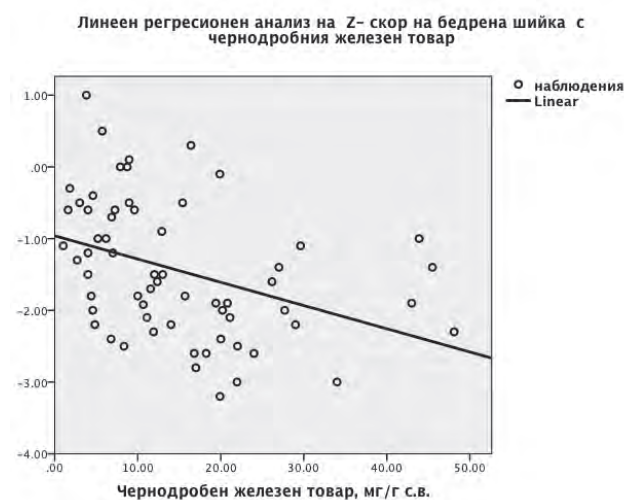
Линейен регресионен модел за оценка на връзката между КМП и тежестта на ЧЖТ и СЖТ

Линейният регресионен анализ, осъществен за оценка на връзката между ЧЖТ и Z-скорите показва сигнификантност и на двете изследвани нива. Резултатите са както следва: на спинално ниво L1-L4: $R=0.312$, $R^2(\text{adj})=0.082$, $B=-0.030$, $p=0.014$, за бедрена шийка: $R=0.387$, $R^2(\text{adj})=0.136$, $B=-0.034$, $p=0.002$. С всяко покачване на ЧЖТ с 1 mg/g d.w., Z-скорът намалява с 0.030 на спинално ниво и с 0.033 на ниво бедрена шийка. Така този фактор повлиява 9.7% от промяната в Z-скара на спинално ниво и 15% на ниво бедрена шийка (фиг. 4).

Фиг. 4 а



Фиг. 4 б



Фиг. 4а и б. Диаграми, представящи линейен регресионен модел между Z-скор и ЧЖТ (мг/г сухо вещество) на спинално L1-L4 ниво (фиг.4а) и ниво бедрена шийка (фиг.4б). Данните относно показаните връзки са отбелязани в текста.

Линейните зависимости между ЧЖТ и КМП в g/cm² показваха сигнификантност и на ниво бедрена шийка: $R = 0.405$, $R^2(\text{adj}) = 0.155$, $B = -0.004$, $p = 0.001$. За всяко повишение на ЧЖТ с 1 mg/g d.w. КМП в g/cm² на ниво бедрена шийка показва спад с 0.004. Линейният модел между КМП в g/cm² и ЧЖТ на спинално ниво не показва сигнификантност, $p = 0.117$.

ОБСЪЖДАНЕ:

С определена честота на остеопорозата от 54.8 % при възрастната българска популация с ТЗБТ, нашите данни заемат междинна позиция спрямо тези, посочени от Dresner (40-50%) и тези на Hashemiech (65,6 %)[9,12]. Към това се добавя честота от 38.7 % на пациентите ни с остеопения. Сумарно, този много висок процент определя СОО като една от водещите болестни прояви при пациентите с бета-таласемия в нашето съвремие. Обобщавайки данните от информационните източници, идващи от различни краища на света, тази много висока честота, аналогична при пациенти с бета-таласемия с различни расови и етнически характеристики, предполага тесни патогенетични връзки с особеностите на основното заболяване. Макар че до момента не са представяни сравнителни данни за СОО при пациенти от различни националности, сигнификантната разлика със здравите контроли от същия етнос, възраст и пол допълнително подкрепя тезата за водещото значение на таласемичното заболяване.

Нашите данни за липса на разлика в тежестта на СОО не само по степента на отклонение, т. нар. Z-скор, но и в абсолютни стойности на КМП в g/cm² сред пациентите с ТЗБТ от различна възраст, пол, ИТМ, на практика, поставя на по-заден план основните демографски и антропометрични фактори, коментирани като водещи рискови фактори при общата популация.

Съществуват работни хипотези, че самото анемично състояние може да провокира развитието на остеопороза. В подкрепа на тази хипотеза стоят хронични анемични състояния, без придружаващи ендокринни отклонения, а с регистрирана остеопороза като усложнение във времето (наследствена сфероцитоза напр.)[17]. Едно от възможните обяснения е, че в условия на анемична хипоксия, в костния мозък се повишава синтезът на хемопоеични растежни фактори – процес, който паралелно стимулира и остекластната клетъчна линия[18]. Хистоморфометрични анализи на кости от миши модели с хронично анемично състояние, предизвикано от регулярна кръвозагуба, отчитат едновременно, както подтиснат костен синтез, така и по-активен процес на костна резорбция[17]. Проучванията върху стойностите на КМП на Scuterali, 1983 при италиански пациенти и Karimi, 2007 при ирански пациенти с ТМ и ТИ установяват сигнификантна корелация между ниската

костна маса и тежестта на анемичното състояние[19,16]. Резултатите от нашето изследване също представят статистическа значимост на тази връзка. Предимство на нашия модел е, че показва конкретни количествени величини на тази зависимост. По този начин се дава по-ясна представа за прякото влияние на претрансфузионните хемоглобиновите нива за поддържане на оптимална КМП и следователно, по-добра костна здравина при тази специфична група пациенти. Определянето на оптималното претрансфузионно хемоглобиново ниво при възрастните пациенти с ТЗБТ е въпрос, който остава отворен в нашето съвремие. Докато при подрастващия организъм нива на претрансфузионния хемоглобин над 90 г/л са ключови за подsigуряване на нормален растеж и развитие, то с годините проблемът за вторичното желязното натоварване взема преднина. Въпреки прилагането на адекватна хелатираща терапия, идеалният хелатор все още не съществува. Това често влияе върху решението на възрастните пациенти да поддържат режим на относително по-ниски претрансфузионни хемоглобинови нива с идеята да се предпазват, с цената на известен компромис, от излишния желязен свръхтовар. Ако с поддържането на претрансфузионни нива на хемоглобина между 90-80 г/л при завършен растеж на организма, функцията на вътрешните органи не се влошава, то по отношение на костната минерална плътност с категоричност можем да твърдим, че се стига до неблагоприятен ефект. Baldini et al. 2010, изказват мнение, че трансфузиите могат да предпазят пациентите с бета-таласемия майор от загуба на костно вещество само ако са приложени в адекватен режим в ранна детска възраст[20]. В допълнение на това, ние можем да твърдим, че в процеса на установяване на оптималния трансфузионен режим при пациентите с ТЗБТ във възрастта над 18 години, е необходимо под внимание да се взема и влиянието му в поддържането на костното здраве. Компромисът в придържането към относително по-ниски претрансфузионни нива при завършен соматичен растеж, би довело и до компромис в управлението на костната здравина.

Напрегнатата хематопоеза е фактор в развитието на СОО, не само заради механичния товар, който упражнява върху костта, а и заради паракринното влияние, чрез свръхпродукция на про-резорбтивни цитокини[18]. Стойностите на периферните еритробласти и тромбоцити, като косвен белег за напрегнатост на хематопоезата, стоят в сигнификантна връзка с показателите на КМП, макар и не за всички измерени нива за двата показателя.

Установяването на връзка между костномозъчния желязен товар и тежестта на СОО при експериментални модели е отразено от няколко екипа в литературата [21-28]. Тежестта на ЧЖТ като отражение на цялостния системен желязен товар, в нашия анализ, стои във връзка с тежестта на СОО при пациентите с ТЗБТ. Възможно е да има

корелация между натрупването на желязото в чердробната тъкан и степента на натрупването му в костния мозък, респ. с проява на токсичност върху костта. Макар че ние не разполагаме с директни хистоморфометрични сравнения, можем да предположим че това е така, имайки предвид положителната сигнификантна връзка: тежест на ЧЖТ-тежест на СОО. Придържането към нисък ЧЖТ е от огромно значение за контрола и на по-добрата КМП при пациентите с ТЗБТ.

Нашите данни за по-тежка проява на СОО при пациентите със спленектомия спрямо неспленектомизирани добавя значението на спленектомията като рисков фактор за развитие на СОО, и това трябва да се взема предвид, когато се обсъжда необходимостта от такава. Нашата хипотеза е, че след спленектомията отпада нейната ролята като допълнително депо на желязо, но е възможно това да се дължи на отпадането на други спленални функции с отношение върху костния метаболизъм.

Ние не констатирахме статистически значима разлика в тежестта на СОО между групите с и без хипогонадизъм и при двата пола. Тази резултати, макар и статистически да определят разликата в стойностите на КМП като несигнификантна, освен че налага да се обсъждат с внимание, изискват и допълнителни разсъждения. Първо, те установяват аналогична честота на хипогонадизма при българските пациенти, родени след 1980 година спрямо пациенти от други националности[29]. Второ, липсата на разлика в КМП между подгрупите с хипогонадизъм с и без ХЗТ би могло да се обясни с късно въведената ХЗТ и потвърждава твърденията на други автори за липса на ефект при ненавременно започнато лечение [30]. Нашите резултати очертават тенденция към по-ниска КМП в групите с ХГ, независимо от приема на ХЗТ, която, обаче, остава в статистически несигнификантната зона. Трябва да отбележим, че приемът на ХЗТ при българските жени с ТМ се регистрира около 25-та година. В този процес, установяването на регулярен цикъл, като първо необходимо условие преди опитите за забременяване, отключва желанието на пациентите за прием на ХЗТ. С това по-късно начало се пропуска най-важният период (по време на пубертета) за използване на положителните ефекти на ХЗТ върху формирането на пиковата костна маса. Късното начало в приема на ХЗТ би обяснило донякъде липсата на разлика в КМП в групите с ХГ с или без ХЗТ в нашето изследване. Противоположни с нашите данни са тези на екипите на Anaplitou et al.1995, и Voskaridou et al.2003, които установяват сигнификантно негативно влияние на хипогонадизма върху костния метаболизъм при пациентите с ТЗБТ[31,10]. Средната възраст в изследваната от Voskaridou популация е 21 год. т.е., доста по-близка до пубертета. Анализирайки неговите данни и нашите резултати, ние предполагаем, че формирането на КМП зависи много

по-силно от гонадната функция в периода на пубертетното развитие(периода на най-скорошно натрупване на костна маса). С годините, след постигането на пиковата костна маса, силата на влияние на таласемия-свързаните характеристики вероятно добива превес в упражняването на отрицателните си ефекти върху костния метаболизъм. При мъжкия пол липсата на разлика между съответните подгрупи води със себе си същата логика като при женския пол. Съвместими с нашите хипотези са данните на Chaterjie и екип от 2011 год., които сравняват ефекта от ХЗТ при жени с първична овариална дисфункция и овариална дисфункция при пациентки с бета-ТМ при еднакви изходни параметри на КМП. При таласемичната група, макар че е отчетено известно подобрение в стойностите на КМП след 2-5 годишно проведено лечение, то е сигнификантно по-ниско спрямо подобрението при пациентките от първата група, и това предполага значима негативна намеса на фактори, свързани с бета-таласемичната болест[32]. Изчистен клиничен модел на таласемия-свързана остеопороза и липса на ендокринопатия, на практика се явяват пациентите с ТИ. Baldini et al 2014, в 20-годишен, ретроспективен анализ на 70 пациенти с ТИ представя данни за остеопороза при 76 % от пациентите в групата, докато само 3-ма от тях са с хипогонадизъм[20]. В този смисъл, обобщено можем да кажем, че приносът на хипогонадното състояние за развитието на СОО при таласемичните пациенти е второстепенен, а ХЗТ би могла да има известен положителен ефект при хипогонадните пациенти, само ако е навременно започната и дълготрайно приложена.

Изследвания с изолиран първичен хипопаратиреоидизъм съобщават за по-високи стойности на КМП в тези случаи (данни, подкрепени с хистоморфометрични анализи)[33]. Това се обяснява с биологичните ефекти на ПТХ (анаболен ефект при физиологични стойности, резорбтивен ефект при високи, и вероятен протективен ефект при ниски стойности). При българската таласемична кохорта с хипопаратиреоидизъм не само не установихме повишена КМП, дори обратно, регистрирахме, макар и несигнификантна тенденция за по-ниска КМП в групата с хипопаратиреоидизъм. За разлика от ефекта на хипопаратиреоидното състояние върху костния кръговрат при изолираните случаи на хипопаратиреоидизъм, тук при условия на комплексно увреждане на костта, този ефект се губи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Настоящото изследване за първи път представя задълбочен анализ на актуалното състояние на КМП при възрастни български пациенти с ТЗБТ. То е стъпка напред в работата по ограничение на несъвършенствата в управлението на остеопорозата при пациентите с бета таласемия в нашата страна.

Количествените връзки между таласемия- специфичните отклонения и стойностите на КМП, които установихме в настоящото изследване са от практическо значение за подобрене на управлението на СОО. При вземане на решение за евентуална спленектомия, трябва да се предвиди и последващия ѝ негативен ефект върху костното здраве на пациентите. В допълнение, при регистриране на отклонения в гонадната функция, навременно приложеното хормонално заместително лечение би могло да даде своя положителен принос. С тази основа на поведение, медикаментите за лечение на СОО, които все по- активно навлизат и в областта на таласемичната костна болест, вероятно ще дадат по- ефективно своя принос върху съхранението на костната здравина.

Адрес за кореспонденция

Д-р Катя Сапунарова

МУ- Пловдив, Първа катедра

по вътрешни болести, секция хематология

бул. " В. Априлов " 15 а, Пловдив

e-mail: kasapunarova@yahoo.com

Address for correspondence:

Dr. Katya Sapunarova

MU – Plovdiv, First Department of

Internal Medicine, Department of Hematology,

15a, V. Aprilov Blvd., Plovdiv, Bulgaria,

e-mail: kasapunarova@yahoo.com

БИБЛИОГРАФИЯ:

- Cooley TB, Lee P. A series of cases of splenomegaly in children with -anaemia and peculiar bone change. Transactions of the American Pediatric Society. 1925;37:29.
- Katz K, Horev G, Goshen J, Tamary H. The pattern of bone disease in transfusion-dependent thalassemia major. Isr J Med Sci. 1994;30:577–80.
- Exarchou E, Politou C, Vretou E, Pasparakis D. Fractures and epiphyseal deformities in B- thalassaemia. Clin Orthop. 1984; 189: 229-233. 1984;
- Vogiatzi MG, Macklin EA, Fung EB, Cheung AM, Vichinsky E, Olivieri N, et al. Bone disease in thalassemia: a frequent and still unresolved problem. J Bone Miner Res. 2009;24 (3):543–57.
- Terpos E, Voskaridou E. Treatment options for thalassemia patients with osteoporosis. Ann NY Acad Sci. 2010;1202:237–43.
- Toumba M, Skordis N. Osteoporosis syndrome in thalassaemia major: an overview. J Osteoporos. 2010; 2010: 537673.
- Haidar R, Musallam KM, Taher AT. Bone disease and skeletal complications in patients with beta thalassemia major. Bone. 2011;48(3):425–32.
- Skordis N, Toumba M. Bone disease in thalassaemia major: recent advances in pathogenesis and clinical aspects. Pediatr Endocrinol Rev. 2011;8(Suppl 2):300–6.
- Dresner Pollack R, Rachmilewitz E, Blumenfeld A, Idelson M, Goldfarb AW. Bone mineral metabolism in adults with beta-thalassaemia major and intermedia. Br J Haematol. 2000;111(3):902–7.
- Voskaridou E, Kyrtonis MC, Terpos E, Skordili M, Theodoropoulos I, Bergele A, et al. Bone resorption is increased in young adults with thalassaemia major. Br J Haematol. 2001;112(1):36–41.
- TF Leung et al, Bone mineral density in children with thalassaemia major: determining factors and effects of bone marrow transplantation, Bone Marrow Transplantation, 2005, 36, 331–336
- Hashemieh M., Azarkevan A., Radfar M, Saneifard H., Hosseini –Zijoud SM., Noghabaei G., Yaseri M., Prevalence of osteoporosis among thalassaemia patients from Zafar Adult Thalassaemia Clinic, Iran, IJBC 2014; 6 (3): 143-148
- Merchant R& Amish Udani & Vipla Puri & Valentina D'cruz & Deepak Patkar & Aarti Karkera Evaluation of Osteopathy in Thalassaemia by Bone Mineral Densitometry and Biochemical Indices, Indian J Pediatr (2010) 77:987–991
- Dines DM, Canale VC, Arnold WD. Fractures in thalassaemia. J Bone Joint Surg. 1976;58:662–666.
- Finsterbush A. et al, Fracture patterns in thalassaemia, Clin Orthop. 1985; 192:132-136;
- Karimi M, Ghiani AF, Hashemi A, et al. Bone mineral density in beta thalassemia major and intermedia. Indian Pediatr. 2007;44:29–32.
- Gurevitch O, Slavin S The hematological etiology of osteoporosis; Med.Hypotheses 2006;67(4):729-35
- Morabito N, Gaudio A, Lasco A, et al. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of thalassaemia-induced osteoporosis: new pieces of the puzzle. J Bone Miner Res. 2004;19:722–727.
- Scuteralli PN, Orzincolo C, Calzolari F, Tilotta F. The ribs in β-thalassemia. Course of the changes in relation to transfusion therapy. Radiol Med (Torino). 1983;69:654–60.
- Baldini et al., (2014), Beta-Thalassaemia Intermedia: Evaluation of Endocrine and Bone Complications, BioMed Research International, Article ID 174581, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/174581>
- Bordat, C., Constans, A., Bouet, O., Blanc, I., Trubert, C. L., Giro, R., et al. (1993). Iron distribution in thalassemic bone by energy-loss spectroscopy and electron spectroscopic imaging. Calcif. Tissue Int. 53, 29–37. doi: 10.1007/BF01352012
- Yamasaki K, Hagiwara H. Excess iron inhibits osteoblast metabolism. Toxicol Lett. 2009;191:211–215
- Tsang Z, Ross FP, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. Blood. 2010;116:2582–2589.
- Jamie TzaiBone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress (Blood. 2010;116(14):2582-2589 .
- Yang Q, Qian J, Abramson SB, Huang X. Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2-induced osteoblastogenesis. J Bone Miner Res. 2011;26:1188–1196.
- Francesca R, Silverio P, Giulia B, Livio Luongo, Chiara Tortora, Dario Siniscalco, Matteo Francese, Marco Torella, Bruno Nobili, Vincenzo Di Marzo, Sabatino Maione, 'Iron Overload Causes Osteoporosis In Thalassaemia Major Patients Through Interaction With Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Channels, Haematologica December 2014 99: 1876-1884;
- Balogh, E., Tolnai, E., Nagy, B. Jr., Nagy, B., Balla, G., Balla, J., et al. (2016). Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin. Biochim. Biophys. Acta. 1862, 1640–1649. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.06.003
- Jeney V.Front Pharmacol. 2017 Feb 21;8:77. doi: 10.3389/fphar.2017.00077. eCollection 2017. Review
- De Sanctis V. Et al., 2013, Growth and endocrine disorders in thalassaemia: The international; network on endocrine complications in thalassaemia (I- CET) position statement and guidelines, Ind. Journal Endocrinol. Metabol. Jan-Feb., 17(1):1-18
- Carmina E, DiFede G, Napoli N, et al. Hypogonadism and hormone replacement therapy on bone mass of adult women with thalassemia major. Calcif Tissue Int. 2004; 74:68–71.
- Anapliotou ML, Kastanias IT, Psara P, Evangelou EA, Liparaki M, Dimitriou P. The contribution of hypogonadism to the development of osteoporosis in thalassaemia major: new therapeutic approaches. Clin Endocrinol (Oxf). 1995;42:279–287.
- Chatterjee R, Katz M, Bajoria R. Use of hormone replacement therapy for correction of high turnover bone disease in hypogonadal beta-thalassemia major patients presenting with osteoporosis: comparison with idiopathic premature ovarian failure. Hemoglobin. 2011;35(56):6538.
- Mishaela R et al., Hypoparathyroidism & clinical features, skeletal microstructure and parathyroid hormone replacement, Arq Bras Endocrinol Metabol, 2010 Mar; 54(2): 220-226

ВИТАМИН D, ПОТЕНЦИАЛНО МОДИФИЦИРУЕМ РИСКОВ И ТЕРАПЕВТИЧЕН ФАКТОР ПРИ ХЛЛ?

Гръкланов В.¹, Денева-Койчева Т.²

1 – I-ва катедра по вътрешни болести, МУ – Пловдив, Клиника по клинична хематология, УМБАЛ “Свети Георги”, гр.Пловдив

2 – МУ – Пловдив, Централна клинична лаборатория, УМБАЛ “Свети Георги” гр.Пловдив

VITAMIN D, A POTENTIALLY MODIFIABLE RISK AND THERAPEUTIC FACTOR IN CLL?

Graklanov V.¹, Deneva-Koicheva T.²

1 – First Department of Internal Medicine, Medical University – Plovdiv, Clinic of Clinical Hematology, St. George Hospital, Plovdiv

2 – Medical University – Plovdiv, Central Clinical Laboratory, University Hospital «St. George» Plovdiv

Резюме.

Цел. Да се изследва серумното ниво на витамин D при новодиагностицирани пациенти с хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ).

Пациенти и методи. В проучването бяха измерени серумните нива на витамин D при 32 пациента (11 жени, 21 мъже) със средна възраст от 68 години и диагноза ХЛЛ съгласно критериите на International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) чрез имуноензимен метод за количествено определяне на 25(ОН)-витамин D с оригинални ELISA – kits Immundiagnostic, преди започване на имунохимиотерпия.

Резултати. При всички 32 пациента се регистрира серумно ниво под оптималното (< 30 ng/ml). При 11 пациента серумното ниво на витамин D е между 20-30 ng/ml, докато при останалите 21 пациент се регистрира дефицит на витамин D. (ниво на витамин D под 20 ng/ml). Тежък дефицит на витамин D (ниво на витамин D < 10 ng/ml) се регистрира при 28.1 % от пациентите.

Заклучение. В това проучване установихме изключително ниски серумни нива на витамин D в болшинството от новодиагностицирани пациенти с ХЛЛ.

Ключови думи: Твитамин D, ХЛЛ, VDR.

Abstract.

Purpose. To investigate the serum levels of vitamin D in newlydiagnosed patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL).

Patients and methods. In this study we measured the serum levels of vitamin D in 32 patients (11 women, 21 men) with a median age of 68 years and a diagnosis of CLL according to the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) criteria. The immunoassay tests used for the quantification of 25 (OH) – Vitamin D were original ELISA- kits Immundiagnostic and the measurement was done before starting immunochemotherapy.

Results. Serum levels below the optimum (<30 ng / ml) were recorded in all 32 patients. In 11 patients, serum vitamin D levels were between 20-30 ng / ml, while in the remaining 21 patients a vitamin D deficiency (vitamin D levels below 20 ng / ml) was recorded. Severe vitamin D deficiency (vitamin levels <10 ng / ml) was recorded in 28.1% of patients.

Conclusion. In this study, we found extremely low serum vitamin D levels in the majority of newly diagnosed CLL patients.

Key words: vitamin D, CLL, VDR.

ВЪВЕДЕНИЕ

Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е нелечимо заболяване, характеризиращо се с клонална експанзия на CD5(+)/CD19(+) В клетки. Повечето от левкемичните клетки са във фазата G0/G1 на клетъчния цикъл и имат дълъг живот. Следователно В-ХЛЛ е типичен пример за злокачествено заболяване, причинено от нефункционалност в механизмите на клетъчна смърт а не от високия пролиферативен потенциал на малигнения клон.¹ Ин витро проучванията показват ефективност на витамин D и аналозите му върху клетъчни линии от пациенти със ХЛЛ. В ин витро проучване с аналог на витамин D3, EB1089, върху клетки от В-ХЛЛ взети от 102 пациенти се установява че, EB1089 индуцира апоптоза във всички тествани проби, впечатляващи данни за цитотоксичността на аналога на витамин D. Също така е доказано че В-ХЛЛ клетките са по-чувствителни към EB1089, отколкото Т клетките от един и същи пациент. Фактът че експресията на p53, p21 и Bax не е била променена под въздействието на EB1089 показва че апоптозата индуцирана с EB1089 е независима от p53. Най-вероятно EB1089 води до апоптоза чрез активиране на p38 митоген-активираната протеин киназа и потискане на екстрацелуларната сигнал-регулираща киназа (ERK) с последващо активиране на каспазаната каскада (каспаза3).² Витамин D реализира биологичното си действие чрез регулиране на генната транскрипция (геномен ефект) и чрез активиране на сигнални трансдукционни пътища в или близо до плазмените мембрани (негеномен или бърз ефект).³ Механизмът на действие се медира чрез свързване с рецептор за витамин D (VDR).⁴ VDR се експресира в клетки, участващи в хомеостазата на калция и фосфатите, като ентероцитите, остеобластите, паратиреоидните и дисталните клетки на бъбречните тубули.⁵ Установено е, че клетките при ХЛЛ, кожният Т-клетъчен лимфом със сезаризация както и Т-клетъчна едрогранулирана лимфоцитна левкемия (Т-LGLL) имат силна експресия на VDR.^{2,6,7} Разнопосочни са и данните за значението на полиморфизма на витамин D рецептора и риска от възникване на В-ХЛЛ както и изхода на заболяването. Rajab A.A.S. и съавт. установява че VDR FokI мутатния генотип (Ff) се свързва с висок риск от възникване на В-ХЛЛ.⁸ Ква F. и съавт. пак в проучване включващо генотипизиране на 34 пациента с В-ХЛЛ и изследване на 4 полиморфизми на VDR (FokI, TaqI, BsmI and ApaI) не намира статистически значима разлика в алелното разпределение между пациентите с В-ХЛЛ и здравата контролна кохорта.⁹ Дефицитът на витамин D е здравен проблем с пандемични размери. В световен мащаб се смята, че 1 на 7 души (14%) имат недостатъчност или дефицит на витамин D.¹⁰ Въпреки липсата на категоричен консенсус за оптималните нива на витамин D, експертите смятат за долна граница от 30 ng/mL за адекватно ниво на витамин D. (таблица 1.)^{11,12}

Таблица 1. Диагностични нива на витамин D.

серумно ниво на 25(OH) (ng/ml)	серумно ниво на 25(OH) (nmol/L)	лабораторна диагноза
<10	<25	тежък дефицит
<20	<50	дефицит
20-30	50-75	недостатъчност
30-100	75-250	нормално за „слънчеви“ страни
>100	>250	излишък
>150	>325	интоксикация

Предложената граница на 25(OH)D за оптимално здраве на скелета е нивото, което намалява PTH до минимум и увеличава усвояването на калций до максимума.^{13,14} Препоръките за лечение с витамин D зависят от доста фактори като възрастовата група, телесното тегло, етническа принадлежност (тип кожа) както и географската ширина на пребиваване.¹⁵ Освен това тези препоръки не се отнасят за хора страдащи от определено заболяване както и имащи дефицит на витамин D.¹⁶ За пациенти с лабораторно потвърден дефицит на витамин D, т.е. серумно ниво на витамин D по-ниско от 20 ng/mL (50 nmol/L) лечението с витамин D е задължително. При пациенти с дефицит на витамин D терапевтичната доза (зависима от възрастта и телесното тегло) трябва да се приложи според наличните регионални или национални препоръки за лечение, с продължителност на лечението от 1 до 3 месеца.^{16,17,18} Има доста проучвания които търсят връзка между дефицитът на витамин D и значението му като рисков фактор за възникване на неопластичните заболявания както и влиянието му върху изхода от заболяването. Целта на проучването е да изследваме нивата на витамин D при новодиагностицирани пациенти с ХЛЛ.

ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

ПАЦИЕНТИ

В проучването бяха включени 32 пациента (11 жени, 21 мъже) със средна възраст от 68 години и

диагноза ХЛЛ съгласно критериите на International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL) (таблица 2.) Пациентите бяха диагностицирани в клиниката по клинична хематология при УМБАЛ „Св.Георги“ – гр.Пловдив (МУ-Пловдив) в периода от месец ноември 2014 до месец март 2016 година. Изследването беше одобрено от комисията по научна етика към МУ-Пловдив и бе проведено в съгласие с декларацията от Хелзинки. Всички пациенти подписаха писмено информирано съгласие за участие в проучването.Данните за пациентите са представени в таблица 2.

Таблица 2. Характеристики на пациентите.

Пациенти (n=32)		
пол	Ж	34,4 %
	М	65,6 %
средна възраст	68 години (45-90)	
клиничен стадий по Rai	0	3.1%
	I	43,8%
	II	37,5%
	III	6,3%
	IV	9,4%
клиничен стадий по Binet	A	62.5%
	B	25.0%
	C	12.5%

По отношение на параклиничните маркери за активност на болестта, данните са представени в таблица 3.

Таблица 3. Маркери за параклинична активност.

Параклинични маркери за активност на болестта		
СУЕ	< 30mm/h	81.3%
	> 30mm/h	18.7%
CRP	< 10 mg/l	75.0%
	> 10 mg/l	25.0%
LDH	< 460 U/l	59.4%
	> 460 U/l	40.6%
β2mg	< 1.9 mg/l	12.5%
	> 1.9 mg/l	87.5%

СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

За провеждане на изследването са използвани методите на описателната статистика и методите на статистическите изводи и заключения. Обработката на данните е извършена чрез специализиран софтуерен продукт за социални изследвания IBM SPSS, версия 25.0 и MS Excel 2017, което позволява бърза и акуратна подготовка на резултатите за последващ анализ. Възприетото критично ниво на значимост при проверка на нулевата хипотеза H_0 е $\alpha = 0,05$ (Z критерий = 1,96), при гаранционна вероятност 95%.

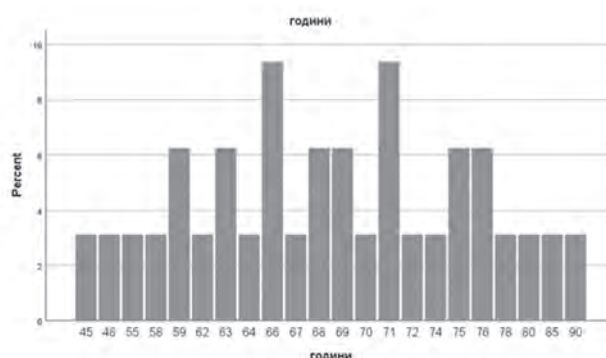
ИЗМЕРВАНЕ НА НИВОТО НА ВИТАМИН D

Пробите за серумно изследване на витамин D бяха взимани при първата хоспитализация на пациентите, преди започването на имунохимиотерапията. Нивото на витамин D в серума бе изследвано в Централна клинична лаборатория при УМБАЛ “Свети Георги” гр.Пловдив. Използван бе имуноензимен метод за количествено определяне на 25(OH)-витамин D с оригинални ELISA – kits Immundiagnostic, Австрия, каталожен № K 2109.

РЕЗУЛТАТИ

Най-младият пациент е на 45г. а най-възрастният на 90 години.(фигура1).Освен това при всички пациенти бе изследвана пълна кръвна картина (ПКК). Резултатите от ПКК бяха както следва: средно ниво на хемоглобин (Hgb) 124.5 + 22.28 g/l, среден брой на левкоцити (WBC) 52.45 + 49.90 G/l и среден брой на тромбоцити (PLT) 215.88 + 88.33 G/l.

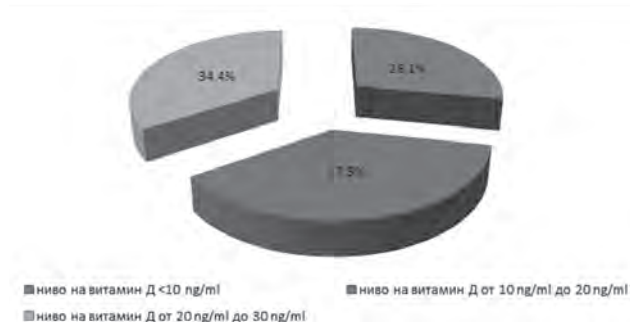
Фигура 1. Разпределение на пациентите по възраст.



При всички 32 пациента с новодиагностицирана ХЛЛ е регистрирано серумно ниво под оптималното (< 30 ng/ml). 11 пациента са с недостатъчност на витамин D, серумно ниво между 20-30 ng/ml, докато останалите 21 пациенти са с дефицит на витамин D. (ниво на витамин D под 20 ng/ml). Тежък дефицит на витамин D (ниво на витамин D < 10 ng/ml) се регистрира при 28.1 % от пациентите.

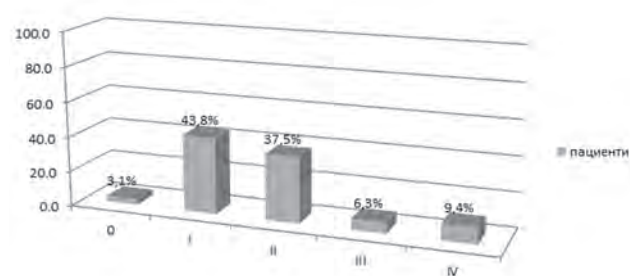
Резултатите са представени на фигура 2.

Фигура 2. Разпределение на пациентите в зависимост от нивото на витамин D.

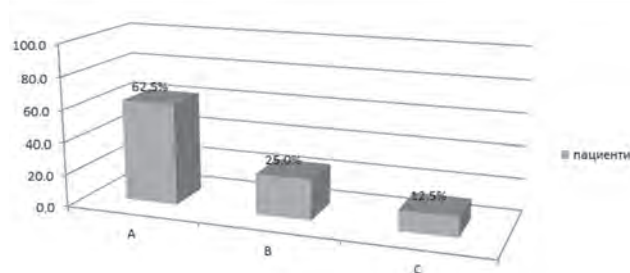


Установи се статистически значима връзка между нивото на витамин D и клиничният стадий по Rai и Binet. Пациентите с по-високо ниво на витамин D имат по-нисък риск и нужда от лечение с имунохемioterapia заради по-ниския клиничен стадий. Разпределението по клинични стадии е показано на фигура 3 и фигура 4.

Фигура 3. Разпределение на пациентите в зависимост от клиничния стадий по Rai.

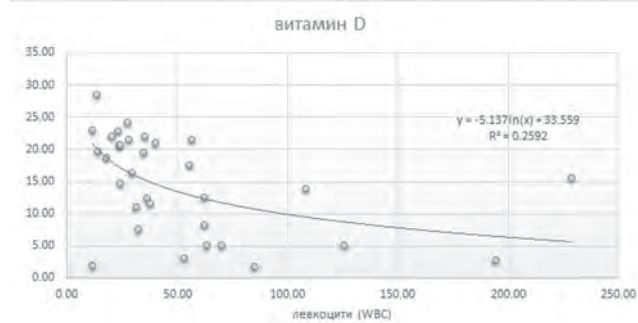


Фигура 4. Разпределение на пациентите в зависимост от клиничния стадий по Binet.



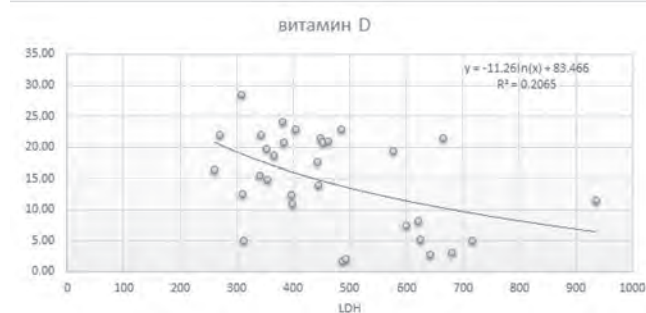
Установи се също че, пациентите с по-висок левкоцитен брой имат по-ниско ниво на витамин D. Тази зависимост е показана на фигура 5 и е статистически значима с $p = 0,017$.

Фигура 5. Зависимост между нивото на витамин D и левкоцитния брой (WBC).



Подобна статистически значима връзка се установи и между серумното ниво на витамин D и серумните стойности на лактат дехидрогеназата (LDH). Пациентите с по-високо ниво на витамин D имат по-ниски стойности на ЛДХ. (фигура 6.)

Фигура 6. Зависимост между нивото на витамин D и LDH.



ДИСКУСИЯ

Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е най-честият вид левкемия в развитите страни, с непрекъснато нарастваща честота. Натрупването на моноклонални неопластични В лимфоцити при ХЛЛ е резултат от дисбалансът между пролиферацията и апоптозата на левкемични клетки.^{19,20} Все повече се натрупват литературни данни по отношение на ефекта на витамин D върху клетъчните процеси на диференциация, пролиферация, ангиогенеза и апоптоза.²¹ Ниските серумни нива на витамин D се свързват с по-висок риск от НХЛ включително ХЛЛ.^{22,23} В проучване на Molica и съавт. включващо 130 пациента с В-ХЛЛ се установява дефицит на витамин D при 82.3% от пациентите. При 41 пациент (31.5%) е установен тежък дефицит на витамин D (< 10нг/мл), при 66 пациента(50.7%) е установен умерен дефицит (10-24нг/мл) и при 23 пациента е установено оптимално ниво на витамин D (25-80нг/мл). Освен това не е установена и зависимост между нивото на витамин D и годишния сезон.²⁴ В друго проучване върху 60 пациента с В-ХЛЛ дефицит на витамин D е установен при 34 пациента (56.7%), като по-висока честотата на дефицит е наблюдаван при пациентите от мъжки пол (40%) докато при

жените процентът е бил 16.6%.²⁵ Резултатите от тези проучвания са приблизителни до резултатите от нашето проучване, в което установихме недостатъчност на витамин D в 34.4 % от изследваните пациенти, дефицит в 66.6% от пациентите (тежък дефицит при 28.1% от пациентите). Описани са единични случаи на постигане на ремисия при пациенти с дефицит на витамин D и В-ХЛЛ. Arlet J.B. и съавт. публикуват случай на възрастен пациент с В-ХЛЛ и дефицит на витамин D при който заместителното лечение с витамин D е довело да ремисия на болестта с продължителност на ремисията от 13 месеца.²⁶ В заключение, в това проучване установихме изключително ниски серумни нива на витамин D в болшинството от новодиагностицирани пациенти с ХЛЛ. Дали витамин D е потенциално модифицируем рисков и терапевтичен фактор при ХЛЛ ?

Благодарности: МУ Пловдив по проект № ДП-02/2013г.

Адрес за кореспонденция

e-mail: dr.grkkanov@yahoo.com

БИБЛИОГРАФИЯ.

1. Reed JC. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 1998;25:11-18.
2. Pepper C, Thomas A, Hoy T, et al. The vitamin D3 analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38MAPK activation and suppression of ERK activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Blood.* 2003;101(7):2454-2460.
3. Norman AW, Mizwicki MT & Norman DP (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 3, 27-41.
4. DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80, 1689S-1696S.
5. Jones G, Strugnell SA & DeLuca HF (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78, 1193-1231.
6. Mroczek C, Felcht M, Sommer A, Schrader A, Klemke CD, Herling M, Schlaak M, Fabri M. Vitamin D controls apoptosis and proliferation of cutaneous T-cell lymphoma cells. *Exp Dermatol.* 2015; 24(10):798-800. [PubMed: 25940772]
7. Olson KC, Kulling PM, Olson TL, Tan SF, Rainbow RJ, Feith DJ, Loughran TP Jr. Vitamin D decreases STAT phosphorylation and inflammatory cytokine output in TLLG Leukemia. *Cancer Biology & Therapy.* 2016 Accepted.
8. Sara A. A. Rajab, Ibrahim K. Ibrahim, Enaam A. Abdelgader, Eldirdiri M. Abdel Rahman, Mahdi H. A. Abdalla. Vitamin D receptor gene (FokI) polymorphism in Sudanese patients with chronic lymphocytic leukaemia. *American Journal of Research Communication*, 2015, 3(7): 71-78.
9. Kwa, F, Kapuscinski, M and Cole-Sinclair, Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphisms in Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) Patients (abstract); *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 2007 vol. 110, no. 11, pp. 246B-246B.
10. Holick MF. Vitamin D deficiency. *New Engl J Med.* 2007;357:266-281
11. Cannell, J.J.; Hollis, B.W.; Zasloff, M.; Heaney, R.P. Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. *Expert Opin. Pharmacother.* 2008, 9, 107-118.
12. Lips, P. Vitamin D deficiency of secondary hyperparathyroidism in the elderly: Consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* 2001, 22, 477-501.
13. Heaney, R.P.; Dowell, M.S.; Hale, C.A.; Bendich, A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003, 22, 142-146.
14. Chapuy, M.C.; Preziosi, P.; Maamer, M.; Arnaud, S.; Galan, P.; Hercberg, S.; Meunier, P.J.; Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteopros. Int.* 1997, 7, 439-443.
15. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):53-8.
16. Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokol D, Czech-Kowal-

- ska J, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe – recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynologia Polska.* 2013;64(4):319-27.
17. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.
18. Haq A, Wimalawansa SJ, Pludowski P, Al Anouti F. Clinical practice guidelines for vitamin D in the United Arab Emirates. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2016.
19. Chiorazzi N.: Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2007; 20: 399-413.
20. O'Brien S., del Giglio A., Keating M.: Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1995; 85: 307-318.
21. Hossein-Nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013; 88: 720-755.
22. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 451-459.
23. Lim U, Freedman DM, Hollis BW et al. A prospective investigation of serum 25-hydroxyvitamin D and risk of lymphoid cancers. *Int J Cancer* 2009; 124: 979-986.
24. Molica S, Digiesi G, Antenucci A et al. Vitamin D insufficiency predicts time to first treatment (TFT) in early chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res.* 2012;36:443-447.
25. Parveen C., Zeeshan R., Sultan S., Irfan M.S. Serum 25-hydroxyvitamin D Insufficiency in B-Chronic Lymphoid Leukemia at the Time of Disease Presentation in Pakistan, *Asian Pac J Cancer Prev*, 16 (14), 5983-5986.
26. Arlet JB, Callens C, Hermine O, et al (2012). Chronic lymphocytic leukaemia responsive to vitamin D administration. *Br J Haematol*, 156, 148-9.

ДАЛИ ДИФУЗНИЯТ В-ЕДРОКЛЕТЪЧЕН ЛИМФОМ Е D-ЛИМФОМ?

Гръкланов В.¹, Горанов Ст.¹, Денева-Койчева Т.²

1 – I-ва катедра по вътрешни болести, МУ – Пловдив, Клиника по клинична хематология, УМБАЛ “Свети Георги”, гр.Пловдив

2 – МУ – Пловдив, Централна клинична лаборатория, УМБАЛ “Свети Георги” гр.Пловдив

IS DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA A D-LYMPHOMA?

Graklanov V.¹, Goranov S.¹, Deneva-Koicheva T.²

1 – First Department of Internal Medicine, Medical University – Plovdiv, Clinic of Clinical Hematology, St. George Hospital, Plovdiv

2 – Medical University – Plovdiv, Central Clinical Laboratory, University Hospital «St. George» Plovdiv

Резюме.

Цел. Да се изследва серумното ниво на витамин D при новодиагностицирани пациенти с НХЛ-дифузен В-едроклетъчен лимфом (НХЛ-DLBCL).

Пациенти и методи. В проучването бяха измерени серумните нива на витамин D на 34 пациента (16 жени, 18 мъже) със средна възраст от 60.4 години и хистологично верифицирана диагноза НХЛ-дифузен В-едроклетъчен лимфом (НХЛ-DLBCL) чрез имуноензимен метод за количествено определяне на 25(ОН)-витамин D с оригинални ELISA – kits Immundiagnostic, преди започване на имунохимиотерапия.

Резултати. При всички 34 пациента се регистрира серумно ниво под оптималното (< 30 ng/ml). При двама пациента серумното ниво на витамин D е между 20-30 ng/ml, докато всички останали пациенти са с дефицит на витамин D, (ниво на витамин D под 20 ng/ml). Тежък дефицит на витамин D (ниво на витамин D < 10 ng/ml) се регистрира при 61.8 % от пациентите.

Заклучение. В това проучване установихме изключително ниски серумни нива на витамин D в болшинството от новодиагностицирани пациенти с НХЛ-DLBCL.

Ключови думи: витамин D, НХЛ-DLBCL, VDR.

Abstract.

Purpose. To investigate the serum levels of vitamin D in newlydiagnosed patients with NHL-diffuse large B-cell lymphoma (NHL-DLBCL).

Patients and methods. In this study we measured the serum levels of vitamin D in 34 patients (16 women, 18 men) with a median age of 60.4 years and a histologically verified diagnosis of NHL-diffuse B-cell lymphoma (NHL-DLBCL).The immunoassay tests used for the quantification of 25 (OH) – Vitamin D were original ELISA- kits Immundiagnostic and the measurement was done before starting immunochemotherapy.

Results. Serum levels below the optimum (<30 ng / ml) were found in all 34 patients. In two patients, serum vitamin D levels were between 20-30 ng / ml, while all other patients had vitamin D deficiency (vitamin D levels below 20 ng / ml). Severe vitamin D deficiency (vitamin D levels) <10 ng / ml) was found in 61.8% of patients.

Conclusion. In this study, we found extremely low serum vitamin D levels in the majority of newly diagnosed NHL-DLBCL patients.

Key words: vitamin D, NHL- DLBCL, VDR

ВЪВЕДЕНИЕ

Дифузият В-едроклетъчен лимфом (DLBCL) е агресивно злокачествено заболяване на В-лимфоцитите, характеризиращо се с наличие на бързо пролифериращи големи клетки с базофилна цитоплазма и везикуларни ядра.¹ DLBCL е най-често срещаният подтип лимфом. През последното десетилетие честотата на DLBCL нараства значително, особено сред мъжете, като причината за това остава все още неясна.² В обобщен анализ на International Lymphoma Epidemiology (InterLymph) Consortium е установено, че при по-често излагане на слънце и съответно очаквано по-високи нива на витамин D, рискът от развитие на неходжкинов лимфом е по-нисък.³ Проучване на Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancer не успява да подкрепи хипотезата, че повишеното ниво на витамин D е свързано с намален риск от НХЛ.⁴ Витамин D реализира биологичното си действие чрез регулиране на генната транскрипция (геномен ефект) и чрез активиране на сигнални трансдукционни пътища в или близо до плазмените мембрани (негеномен или бърз ефект).⁵ Механизмът на действие се медира чрез свързване с рецептор за витамин D (VDR).⁶ VDR се експресира в клетки, участващи в хомеостазата на калция и фосфатите, като ентероцитите, остеобластите, паратиреоидните и дисталните клетки на бъбречните тубули. VDR също присъства в широк спектър от други клетки и тъкани, включително в макрофагите, лимфоцитите, кожни кератиноцити, клетките в β -островите на панкреаса, яйчника, невронната тъкан, белия дроб, гонадите, простатата, плацентата и мастната тъкан.^{7,8} Така витамин D освен добре известният ефект върху мускулноскелетната система също има и значителна палитра от екстраоскелетни ефекти.⁹ Дефицитът на витамин D е глобален здравен проблем. В световен мащаб се смята, че 1 на 7 души (14%) имат недостатъчност или дефицит на витамин D.¹⁰ Въпреки липсата на категоричен консенсус за оптималните нива на витамин D, експертите смятат за адекватно ниво на витамин D (таблица 1.)^{11,12} стойност над 30 ng/mL

Таблица 1. Диагностични нива на витамин D.

серумно ниво на 25(OH) (ng/ml)	серумно ниво на 25(OH) (nmol/L)	лабораторна диагноза
<10	<25	тежък дефицит
<20	<50	дефицит
20-30	50-75	недостатъчност
30-100	75-250	нормално за „слънчеви“ страни
>100	>250	излишък
>150	>325	интоксикация

Предложената граница на 25(OH)D за оптимално здраве на скелета е нивото, което намалява РТН до минимум и увеличава усвояването на калций до максимум.^{13,14} Дефицитът на витамин D се свързва със сърдечно-съдови заболявания, повишен риск от фрактури, дислипидемия, нарушения на метаболизма на глюкозата, наддаване на тегло, инфекциозни заболявания, множествена склероза, разстройства на настроението и когнитивна дисфункция.¹⁵ Препоръките за лечение с витамин D зависят от доста фактори като възрастовата група, телесното тегло, етническа принадлежност (тип кожа) както и географската ширина на пребиваване.¹⁶ Освен това тези препоръки не се отнасят за хора страдащи от определено заболяване, както и имащи дефицит на витамин D.¹⁷ За пациенти страдащи от определено заболяване, препоръките за профилактика с витамин D трябва да бъдат съобразени със спецификата на болестта, а именно дали болестта е резултат на дефицит на витамин D или не.¹⁸ За пациенти с лабораторно потвърден дефицит на витамин D, т.е. серумно ниво на витамин D по-ниско от 20 ng/mL (50 nmol/L) лечението с витамин D е заължително. При пациенти с дефицит на витамин D терапевтичната доза зависи от възрастта и телесното тегло трябва да се приложи според наличните регионални или национални препоръки за лечение, с продължителност на лечението от 1 до 3 месеца.^{17,19,20} Има много проучвания които търсят връзка между дефицитът на витамин D и значението му като рисков фактор за възникване на неопластичните заболявания както и влиянето му върху изхода от заболяването. В този контекст едно проучване доказва, че лечението с витамин D може да засили ритуксимаб-медираната цитотоксичност *in vitro*.²¹ Целта на проучването е да изследваме нивата на витамин D при новодиагностицирани пациенти с DLBCL.

ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

ПАЦИЕНТИ

В проучването бяха включени 34 пациента (16 жени, 18 мъже) със средна възраст от 60.4 години и хистологично верифицирана диагноза НХЛ-дифузен В-едроклетъчен лимфом (таблица 2.) Пациентите бяха диагностицирани в Клиниката по клинична хематология при УМБАЛ „Св.Георги“ – гр.Пловдив (МУ-Пловдив) за периода от месец декември 2014 до месец април 2016 година. Изследването беше одобрено от комисията по научна етика към МУ-Пловдив и бе проведено в съгласие с декларацията от Хелзинки. Всички пациенти подписаха писмено информирано съгласие за участие в проучването.

Данните за пациентите са представени в таблица 2.

Таблица 2. Характеристики на пациентите.

Пациенти (n=34)		
пол	Ж	47,1 %
	М	52,9 %
средна възраст	60,41 години (38-82)	
клиничен стадий по Ann Arbor	IA	11,8%
	IB	2,9%
	IIA	8,8%
	IIB	11,8%
	IIBs	2,9%
	IIIA	8,8%
	IIIB	23,5%
	IIIBs	2,9%
	IVA	11,8%
	IVB	14,7%
екстранодално ангажиране	ДА	44.1%
	НЕ	55.9%
наличие на В симптоми	ДА	41.3%
	НЕ	58.7%

По отношение на параклиничните маркери за активност на болестта, данните са представени в таблица 3.

Таблица 3. Маркери за параклинична активност.

Параклинични маркери за активност на болестта		
СУЕ	< 30mm/h	47.1%
	> 30mm/h	52.9%
CRP	< 10 mg/l	38.2%
	> 10 mg/l	61.8%
LDH	< 460 U/l	35.3%
	> 460 U/l	64.7%
β 2mg	< 1.9 mg/l	11.8%
	> 1.9 mg/l	88.2%

СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ

За провеждане на изследването са използвани методите на описателната статистика и методите на статистическите изводи и заключения. Обработката на данните е извършена чрез специализиран софтуерен продукт за социални изследвания IBM SPSS, версия 25.0 и MS Excel 2017, което позволява бърза и акуратна подготовка на резултатите за последващ анализ. Възприетото критично ниво на значимост при проверка на нулевата хипотеза H_0 е $\alpha = 0,05$ (Z критерий = 1,96), при гаранционна вероятност 95%.

ИЗМЕРВАНЕ НА НИВОТО НА ВИТАМИН D

Пробите за серумно изследване на витамин D бяха взимани при първата хоспитализация на пациентите, преди започването на имунохимиотерапията. Нивото на витамин D в серума бе изследвано в Централна клинична лаборатория при УМБАЛ "Свети Георги" гр.Пловдив. Използван бе имуноензимен метод за количествено определяне на 25(OH)-витамин D с оригинални ELISA – kits Immundiagnostic, Австрия, каталожен № K 2109.

РЕЗУЛТАТИ

Най-младият пациент е на 38г. а най-възрастният на 82 години. Освен това при всички пациенти бе изследвана пълна кръвна картина (ПКК). Резултатите от ПКК бяха както следва : средно ниво на хемоглобин (Hgb) 120.2 ± 16.5 g/l, среден брой на левкоцити (WBC) 7.41 ± 2.78 G/l и среден брой на тромбоцити (PLT) 285.12 ± 104.52 G/l. При всички 34 пациента с новодиагностициран НХЛ-DLBCL е регистрирано серумно ниво под оптималното (< 30 ng/ml). Двама пациента са с недостатъчност на витамин D, серумно ниво между 20-30 ng/ml, докато всички останали пациенти са с дефицит на витамин D. (ниво на витамин D под 20 ng/ml). Тежък дефицит на витамин D (ниво на витамин D < 10 ng/ml) се регистрира при 61.8 % от пациентите.Резултатите са представени на фигура 1.

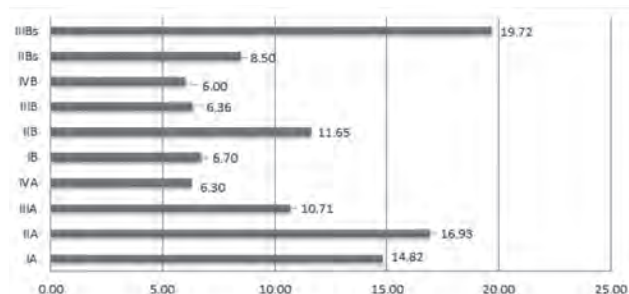
Фигура 1. Разпределение на пациентите в зависимост от нивото на витамин D.



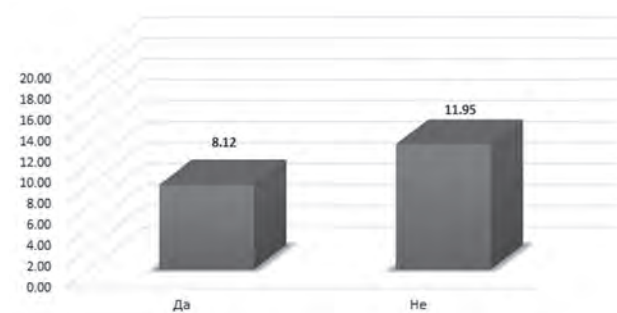
Не се установи статистически значима връзка между нивото на витамин D и клиничният стадий

по Ann Arbor.(фигура 2.) При пациентите с наличие на „В“ симптоми се установиха по-ниски средни стойности на витамин D.(фигура 3.)

Фигура 2. Средни стойности на нивото на витамин D в зависимост от клиничния стадий по Ann Arbor.

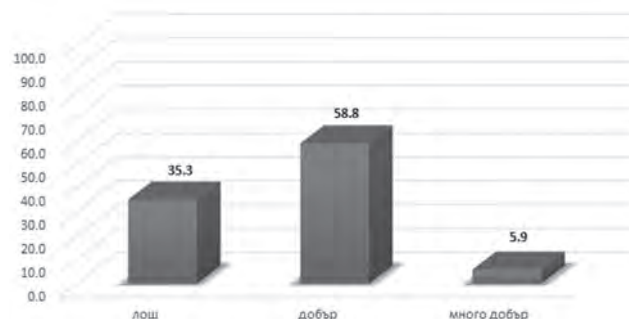


Фигура 3. Средни стойности на нивото на витамин D в зависимост от наличието или липсата на „В“ симптоми.

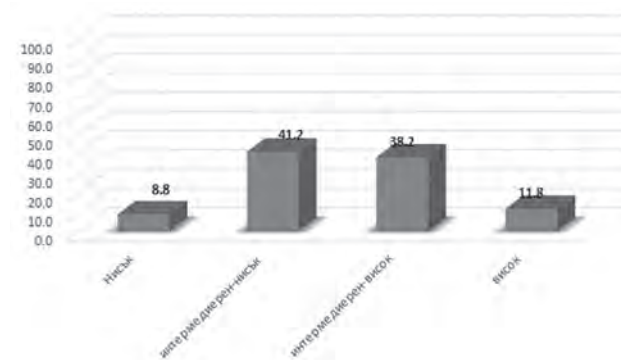


R-IPi (Revised International Prognostic Index) и NCCN IPi (NCCN International Prognostic Index) бяха използвани за определяне на прогнозата при пациентите. Според R-IPi с много добра прогноза бяха 5.9%, с добра 58.8% и с лоша 35.3% от пациентите. Според NCCN IPi в групата с нисък риск попаднаха 8,8%, с интермедиерен-нисък 41,2%, с интермедиерен-висок 38,2% и висок 11,8% от пациентите. (фигура 4 и фигура 5.)

Фигура 4. Разпределение на пациентите в зависимост от R-IPi.



Фигура 5. Разпределение на пациентите в зависимост от NCCN IPi.



Установи се статистическа значима връзка между R-IPi и нивото на витамин D ($p=0,038$), пациентите с по-ниско ниво на витамин D имаха по-лоша прогноза от пациентите с по-високо ниво на витамин D. Такава зависимост не се установи между NCCN IPi и нивото на витамин D ($p=0,154$).

ДИСКУСИЯ

Все повече се натрупват литературни данни по отношение на ефекта на витамин D върху клетъчните процеси на диференциация, пролиферация, ангиогенеза и апоптоза.²² Ниските серумни нива на витамин D се свързват с по-висок риск от НХЛ.^{23,24} И обратно, по-честото и по-дълго излагане на слънце, което съответно води до по-високи серумни нива на витамин D, намалява риска от развитие на НХЛ.³ В публикация на van der Rhee и съавт. се съобщава, че почти всички епидемиологични изследвания показват, че хроничното (непрекъснато) излагане на слънце е свързан с намален риск от рак на колона, гърдата, простата и НХЛ (неходжкинов лимфом).²⁵ Nohaus и съавт. в проспективно проучване включващо 155 пациента с DLBCL установяват дефицит на витамин D (ниво < 20 мг/мл) в 105 пациента (67%), недостатъчно ниво (20-29нг/мл) в 32 пациента (21%) и нормално ниво (ниво > 30нг/мл) в 18 пациента (12%).²⁶ Резултатите от това проучване са приблизителни до резултатите от нашето проучване в което установихме недостатъчност на витамин D в 5.9% от изследваните пациенти, дефицит в 32,3% от пациентите и тежък дефицит в 61,8% от пациентите. Към момента са оскъдни данните за дефицита на витамин D и прогностичното му значение при пациентите с НХЛ.^{27,28} Drake и съавт. също установяват, че недостатъчността на витамин D се свързва с по-лоша преживяемост без събития(EFS) и обща преживяемост (OS) при пациентите с DLBCL.²⁷ В заключение, в нашето проучване установихме изключително ниски серумни нива на витамин D в болшинството от новодиагностицирани пациенти с НХЛ-DLBCL. Възможност ли е за профилактиране и модифициране на клиничното протичане на неопластичните заболявания и в частност НХЛ с

обикновени витаминни таблетки?
Това е предизвикателство пред нас.

Благодарности: МУ Пловдив по проект № ДП-02/2013г.

Адрес за кореспонденция
е-mail: dr.grklanov@yahoo.com

БИБЛИОГРАФИЯ.

1. M. Martelli, et al., Diffuse large B-cell lymphoma, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 87 (2) (2013) 146–171.
2. Szekeley E, Hagberg O, Amljots K, Jerkeman M. Improvement in survival of diffuse large B-cell lymphoma in relation to age, gender, International Prognostic Index and extranodal presentation: a population based Swedish Lymphoma Registry study. *Leuk Lymphoma* 2014;55:1838–43.
3. Krickler A, Armstrong BK, Hughes AM, et al. Personal sun exposure and risk of non Hodgkin lymphoma: a pooled analysis from the InterLymph Consortium. *Int J Cancer*. 2008; 122(1):144–154.
4. Purdue MP, Freedman DM, Gapstur SM, Helzlsouer KJ, Laden F, Lim U, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of non-hodgkin lymphoma: cohort consortium vitamin D pooling project of rarer cancers. *Am J Epidemiol* 2010;172:58–69.
5. Norman AW, Mizwicki MT & Norman DP (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 3, 27–41.
6. DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80, 1689S–1696S.
7. Jones G, Strugnell SA & DeLuca HF (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78, 1193–1231.
8. Norman AW (2008) From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr* 88, 491S–499S.
9. Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X & Porta A (2003) New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88, 695–705. DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80, 1689S–1696S.
10. Holick MF. Vitamin D deficiency. *New Engl J Med*. 2007;357:266–281.
11. Cannell, J.J.; Hollis, B.W.; Zasloff, M.; Heaney, R.P. Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. *Expert Opin. Pharmacother.* 2008, 9, 107–118.
12. Lips, P. Vitamin D deficiency of secondary hyperparathyroidism in the elderly: Consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr. Rev.* 2001, 22, 477–501.
13. Heaney, R.P.; Dowell, M.S.; Hale, C.A.; Bendich, A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003, 22, 142–146.
14. Chapuy, M.C.; Preziosi, P.; Maamer, M.; Arnaud, S.; Galan, P.; Hercberg, S.; Meunier, P.J.; Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteopros. Int.* 1997, 7, 439–443.
15. LeBlanc ES, Zakher B, Daeges M, et al. Screening for vitamin D deficiency: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2015;162:109–122.
16. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):53–8.
17. Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokol D, Czech-Kowalska J, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe – recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynologia Polska.* 2013;64(4):319–27.
18. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2016;101(2):394–415.
19. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911–30.
20. Haq A, Wimalawansa SJ, Pludowski P, Al Anouti F. Clinical practice guidelines for vitamin D in the United Arab Emirates. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2016.
21. Bruns, H., M. Büttner, M. Fabri, D. Mougiakakos, J. T. Bittenbring, M. H. Hoffmann, et al. 2015. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 7: 282ra47.
22. Hossein-Nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013; 88: 720–755.
23. Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 451–459.
24. Lim U, Freedman DM, Hollis BW et al. A prospective investigation of serum 25-hydroxyvitamin D and risk of lymphoid cancers. *Int J Cancer* 2009; 124: 979–986.
25. van der Rhee H, Coebergh JW, de Vries E. Is prevention of cancer by sun exposure more than just the effect of vitamin D? A systematic review of epidemiological studies. *Eur J Cancer* 2013;49:1422–36.
26. Hohaüs C et al. Vitamin D deficiency and supplementation in patients with aggressive B-cell lymphomas treated with immunochemotherapy *Cancer Medicine* 2018; 7(1):270–281/
27. Drake MT, Maurer MJ, Link BK, Habermann TM, Ansell SM, Micallef IN, et al. Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2010;28:4191–8.
28. Porojnicu AC, Robsahm TE, Ree AH, Moan J. Season of diagnosis is a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a possible role of sun-induced vitamin D. *Br J Cancer* 2005;93:571–4.

**АНТИАГРЕГАНТНА ТЕРАПИЯ. ПРИЛОЖЕНИЕ В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА
И ПОВЕДЕНИЕ ПРИ КЪРВЕНЕ**

Динева Д., Паскалева И.

Отделение по лабораторна диагностика
МБАЛ-Национална Кардиологична Болница, София

**ANTIPLATELET THERAPY. APPLICATION IN CLINICAL PRACTICE AND
MANAGEMENT OF BLEEDING.**

Dineva D., Paskaleva I.

Department of clinical laboratory
National Heart Hospital, Sofia

Резюме. Потискането на тромбоцитната функция е ключов фармакологичен механизъм в лечението и профилактиката на артериалната тромбоза. Двойната антитромбоцитна терапия (ДАТТ) с ацетилсалицилова киселина (АСА) и P2Y₁₂ инхибитори се налага като основна терапия за предотвратяване на исхемичните усложнения след перкутанна коронарна интервенция (ПКИ) със стент имплантация. Заедно с увеличаващия се брой пациенти, приемащи тези средства, нарастна и асоциираният риск от кървене. Използването на тромбоцитните функционални тестове може да идентифицира пациентите с повишен риск от тромбоемболични събития или кървене. Тази статия представя характеристиките на най-често използваните антиагреганти, препоръките на европейското дружество по кардиология (ESC) от 2017г. за провеждането на ДАТТ след ПКИ, препоръките за поведение при кървене, като и препоръки за провеждането на ДАТТ при пациенти с тромбоцитопения. Споделен е нашия десетгодишен опит за оптимизиране на антитромбоцитната терапия при пациентите с повишен риск от кървене (ADP-тест < 18 U) с импедансна агрегометрия с апарат Multiplate.

Ключови думи: антиагрегантна терапия, мониториране на антитромбоцитна терапия, риск от кървене

Abstract. Inhibition of the platelet function is a key pharmacological mechanism in the treatment and prevention of arterial thrombosis. Dual antiplatelet therapy (DAPT) with acetylsalicylic acid (ASA) and P2Y₁₂ inhibitors is a major therapy for the prevention of ischemic complications after percutaneous coronary intervention (PCI) with a stent implantation. Together with the increasing number of patients taking these agents, the associated risk of bleeding is increasing. The use of platelet function tests may identify patients at increased risk of thromboembolic events or bleeding. This article presents the characteristics of the most commonly used antiplatelet agents, the recommendations of the European Society of Cardiology (ESC) of 2017 for DAPT management after PCI, management of bleeding complications and recommendations for DAPT management in patients with thrombocytopenia. Here we are presenting our 10-year experience of the optimisation of the antiplatelet therapy in patients with an increased bleeding risk (ADP-test < 18 U) by impedance aggregometry with Multiplate.

Key words: antiplatelet therapy, monitoring of antiplatelet therapy, risk of bleeding

УВОД

В профилактиката и лечението на артериалните тромбози широко приложение в клиничната практика имат антитромбоцитните медикаменти (фиг. 1). Настоящите проучвания показват, че използването на адаптирана и съобразена комбинирана антитромбоцитна терапия води до подобряване на клиничния изход при тромбоцитно активиране след имплантиране на стент. Заедно с увеличаващия се брой пациенти, приемащи тези средства, нараства и асоциираният риск от кървене, особено при хирургични интервенции или травми.

Фиг.1. Приложение на антитромбоцитните медикаменти



Намерените различия в отговора към антитромбоцитната терапия при пациенти със сърдечно съдови заболявания доведе до използването на тромбоцитни функционални тестове за мониториране биологичните ефекти на антитромбоцитните медикаменти, търсене на по-ефективна терапия и идентифициране на пациенти с повишен риск от тромбемболични събития или кървене. Съчетаването на нови опростени тестове и "point-of-care" (POC) апарати доведе до тенденция към увеличено използване на тромбоцитните функционални тестове до леглото на болния извън специализираните лаборатории. Импедансната агрегометрия с апарат Multiplate позволява бързо и лесно мониториране ефективността на различни групи антитромбоцитни медикаменти, което би могло да осигури оптимизиране на дозите, за постигане на терапевтично подобрене.

Разнообразието от стандартни и нови антитром-

боцитни медикаменти разкрива възможности за подбор на подходящ клас със съответна тромбоцитна специфичност, съобразен с по-изразена ефективност и безопасност на действие.

Съществуват няколко класа медикаменти, повлияващи функцията на тромбоцитите по различни механизми:

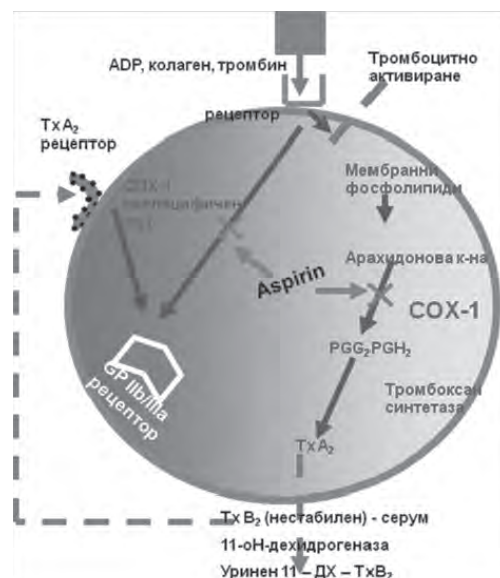
1. Циклооксигеназни инхибитори – Aspirin
2. Фосфодиестеразни инхибитори: Dipyridamol, Cilostazol
3. ADP-рецепторни антагонисти (P2Y12-антагонисти)
Тиенопиридини : Clopidogrel (Plavix), Prasugrel (Efient)
Директни нетиенопиридинови P2Y12-антагонисти: Cangrelor, Ticagrelor, Elinogrel
4. GP IIb/IIIa антагонисти:
 - моноклонални антитела: Abciximab (ReoPro)
 - нискомолекулни пептиди: Eptifibatide (Integrilin)
 - пептидомиметици: Tirofiban (Agrastat)

ЦИКЛООКСИГЕНАЗНИ ИНХИБИТОРИ - АСПИРИН

Механизъм на действие

Фармакологичният ефект на аспирина се дължи на повлияване биосинтезата на простагландините чрез ковалентна модификация на циклооксигеназата по пътя на необратима ацетиляция (фиг. 2). Блокира необратимо и двете изоформи, инхибиторният му ефект върху COX1 е около 170 пъти по-голям от този върху COX2. Инхибицията на COX2 е свързана с неговия противовъзпалителен ефект, а инхибицията на COX1 – с неговия анти-тромботичен ефект ¹.

Фиг. 2. Механизъм на действие на аспирина по Gurbel PA et al. J Am Coll Cardiol. 2007;50(19):1822-1834.



Фармакокинетика

След орален прием аспириинът бързо се резорбира, попада в плазмата след около 20 минути, довежда до измерима тромбоцитна инхибиция след 1 час. Антиагрегантният ефект обаче е съответен на живота на тромбоцитите, поради това че аспирин-индуцираната инхибиция на COX е необратима и безядрените тромбоцитите не са способни да образуват нов ензим.

Фармакодинамика

Пълно инактивиране на тромбоцитната COX-1 се постига с дневна доза от 75 – 100 мг. Доза от 100 mg дневно е напълно достатъчна да подтисне напълно образуването на TxA2 в тромбоцитите и се превърна в стандарт в лечението и профилактиката на коронарните заболявания. Общата тромбоцитна циклооксигеназна активност след прекратяване на терапията се възстановява с около 10% на ден в резултат на образуването на нови тромбоцити. Повечето от пациентите възвръщат нормални стойности на агрегация от 3 до 5 дни след спиране на терапията.

АДФ-РЕЦЕПТОРНИ АНТАГОНИСТИ

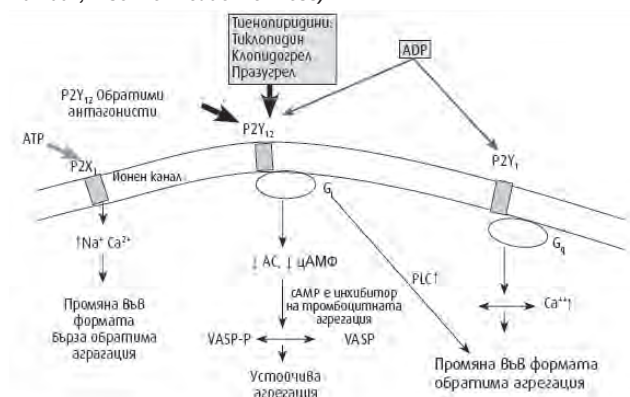
Необратими P2Y₁₂ антагонисти – тиенопиридини

Тиенопиридините са неактивни лекарствени форми, които се метаболизират до активни субстанции в черния дроб.

Механизъм на действие

Инхибират АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация чрез селективно и необратимо свързване с P2Y₁₂ АДФ – рецепторите, което довежда до инхибиране на аденилат-циклазата и намаляване на цАМФ.

Фиг. 3. Схематично представяне на взаимодействието между АДФ и АТР с тромбоцитните P2 рецептори (P2X₁, P2Y₁, P2Y₁₂). АТР активира P2X₁ рецептора, екстрацелуларните Ca²⁺ йони навлизат в тромбоцитите, предизвикват промяна във формата им. Активирането на P2Y₁ рецептора иницира агрегацията, P2Y₁₂ рецептора е отговорен за стабилизацията на тромбоцитния тромб. Активирането му допълнително увеличава мобилизацията на вътреклетъчния Ca и секрецията от плътните гранули, стимулирана от секреторните агонисти като TxA₂ и тромбин. (по Marco Cattaneo, The Platelet P2 Receptors, Platelets 2 Ed 2007, Elsevier/Academic Press).



КЛОПИДОГРЕЛ

След перорален прием около 50% от медикамента се резорбират в тънките черва², около 85-90% се хидролизират до неактивен метаболит, а останалите 10-15% се метаболизират в черния дроб до активен метаболит чрез цитохромната ензимна система CYP450³ (фиг. 4). В първата стъпка на метаболизирането се образува 2-охо-clopidogrel с участието на три ензима: CYP1A2, CYP2B6 и CYP2C19. Във втората стъпка, при която се образува лабилен активен метаболит участват 4 ензима: CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4. Полиморфизмите на CYP2C19 гените са отговорни в най-голяма степен за различния фенотипен отговор към лечението⁴.

CYP2C19*1 алелът е див тип на G алела с пълна активност

CYP2C19*2 е алелът с намалена активност

CYP2C19*17 е алелът с увеличена активност

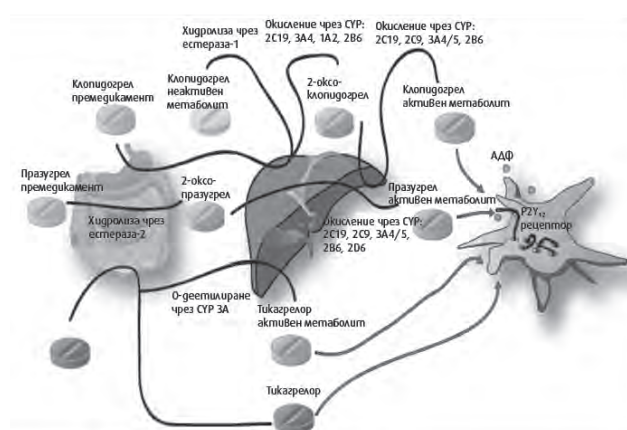
Според носителството на алелните варианти популацията се разделя на:

- Див тип или нормални метаболизатори, носители на CYP2C19*1/1 – по-голяма част от населението.

- Слаби метаболизатори – носители на CYP2C19*2/2 или CYP2C19*2 /3 – около 3,5 % от населението

- Ултрабързи метаболизатори – носители на CYP2C19*1/1, CYP2C19*17/17 – около 3,8 % от населението

Фиг. 4. Метаболизъм на P2Y₁₂-рецепторните инхибитори (Max-Paul Winter et al. Personalized antiplatelet therapy with P2Y₁₂ receptor inhibitors, Advances in Interventional Cardiology 2015;4(42):11)



Тромбоцитно инхибиране от около 30% настъпва от 4 – 6 ч след единична натоварваща доза от 300 mg и постепенно прогресира до 40-60% при прилагане на поддържаща доза от 75 mg до около 3 – 7 дни и остава постоянно до прекъсване на лечението. Инхибирането на тромбоцитите достига изходни нива за 5 – 7 дни.

ПРАЗУГРЕЛ

Тиенопиридин, който също се метаболизира в черния дроб до активен метаболит чрез едностъпално оксидиране чрез цитохромната ензимна система CYP450 (3A4, 2B6, 2C9, 2C19). Превръщането на празугрел в активен метаболит в сравнение с клопидогрел е по-бързо, нивата на активния метаболит са по-високи. Метаболизмът е зависим в много по-малка степен от генетични вариации и лекарствени взаимодействия.

Празурел показва по-висока степен на инхибиране в сравнение с останалите тиенопиридинови и много по-бързо действие – от 30 минути до няколко часа. След прилагане на 60 mg натоварваща доза тромбоцитното инхибиране настъпва от 15 до 30 минути като максимално инхибиране от около 60-70 % се достига за 2 – 4 ч. Прилагането на 10 mg поддържаща доза осигурява 65 – 75 % инхибиране на агрегацията⁵ Прилага се в 40 или 60 mg натоварваща доза, последвана от 5 или 10 mg поддържаща доза.

Обратими P2Y12 антагонисти –предизвикват обратима инхибиция на АДФ-индуцираната тромбоцитна агрегация.

ТИКАГРЕЛОР

Тикагрелор е първият перорален директен обратим инхибитор с 60 -70% инхибиране на тромбоцитната агрегация. Не изисква метаболитно активиране за разлика от клопидогрел и празугрел, характеризира се с по-бързо начало на действието и по- малка междуиндивидуална вариабилност поради липсата на биотрансформация⁶. Инхибицията настъпва бързо – до 2 часа след приложение на 180 mg натоварваща доза. Поддържаща доза – 90 mg два пъти дневно. Тромбоцитната функция се възстановява бързо след прекъсване на приема.

P2Y12 ИНХИБИТОРИ – ХАРАКТЕРИСТИКА

На табл. 1 са представени характеристиката, предимствата и недостатъците на отделните перорални P2Y12 инхибитори, основаващи се на разликите в тяхния метаболизъм.

Табл. 1. Характеристика на P2Y12 инхибиторите.(по Franz Weidinger, ESC 2012)

	Clopidogrel	Prasugrel	Ticagrelor
Клас	Тиенопиридин	Тиенопиридин	Триазолопиримидин
Действие	Необратимо	Необратимо	Обратимо
Активация	Зависима от метаболизирането	Независима от метаболизирането	Активен медикамент
Начало на действието	2- 4 ч.	30 мин.	30 мин.
Продължителност на действието	3 -10 дни	5 -10 дни	3 -4 дни
Спиране на терапията преди хирургично лечение	5 дни	7 дни	3 дни

ИСТОРИЯ НА ДААТ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С КОРОНАРНА АРТЕРИАЛНА БОЛЕСТ

От публикуването на първото рандомизирано клинично проучване, показващо превъзходството на ДААТ пред антикоагулантната терапия при пациенти, предложени на перкутанна коронарна интервенция⁷ (ПКА) се навършват 23 години. На базата на повече от 35 рандомизирани клинични проучвания, включващи повече от 225 000 пациенти, ДААТ е сред най-сериозно изследваните терапии в областта на сърдечно-съдовата медицина. ДААТ е високо ефективна стратегия за превенция на инстент тромбозата. Рисковете обаче от късна и много късна инстент тромбоза са намалели значително след появата на новото поколение медикамент-излъчващи стентове (МИС). От друга страна, има нови доказателства, че ДААТ намалява дъл-

госрочния риск от МИ, несвързан със стента, както и от инсулт. Следователно ДААТ се превръща от локална (т.е. свързана със стента) стратегия, към системна терапевтична стратегия (т.е. способна да предотврати оклузията на тромботичния артериален съд) за подобряване на общия клиничен изход на пациента.

Основните въпроси, които възникват при провеждането на ДААТ са: как да изберем правилния P2Y12 инхибитор за двойната антитромбоцитна терапия и за какъв период. Отговор на тези въпроси дават насоките на Европейското дружество по кардиология от 2017 г., разработени съвместно с Европейското дружество по сърдечна и гръдна хирургия.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА ДААТ НА ESC ОТ 2017 Г

Препоръките на ESC от 2017 г за провеждане на ДААТ след ПКА са представени на фиг. 5. При пациентите със САБ препоръчвания P2Y12 инхибитор е клопидогрел, при пациентите с ОКС препоръчаните P2Y12 инхибитори са тикагрелор или празугрел. Продължителността на терапията зависи от оценката на риска от кървене

Фиг. 5. Алгоритъм за провеждане на ДААТ при пациенти след ПКА

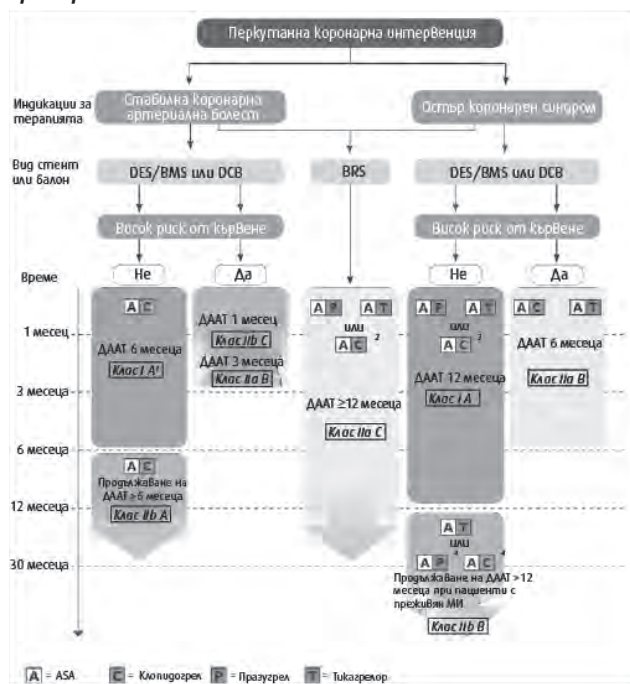
Цветното кодиране отговаря на класовете препоръки на ESC (тъмносив = клас I, светлосив = клас IIa, сив = клас IIb)

1: След PCI с DCB – 6 месеца. ДААТ следва да се преобсъди (клас IIa B).

2: При пациенти със стабилна CAD или, в случай на ACS, с противопоказания за лечение с празугрел или тикагрелор.

3: При пациенти с противопоказания за лечение с празугрел или тикагрелор.

4: При пациенти с противопоказания за лечение с тикагрелор.



ДААТ И ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ

Пациентите с тромбоцитопения с ОКС и стент имплантация на ДАТ са изложени на по-висок риск както от кървене, така и парадоксално от исхемични събития⁸.

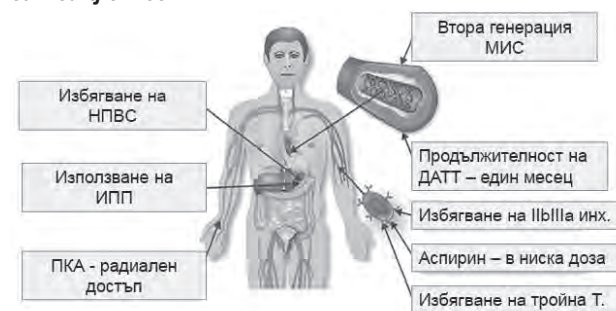
Наличието на тромбоцитопения е независим предиктор за смъртност (HR 1.74) и нежелани сърдечни събития през първата година – (HR 1.39). Рискът от смъртност и кървене корелират директно със степента на тромбоцитопенията. Всяко 10% понижение на броя на тромбоцитите се свързва с повишена смъртност (OR 1,39) и кървене (OR 1,89)⁹.

От P2Y12 инхибиторите клопидогрел е свързан с по-нисък риск от кървене в сравнение с тикагрелор и празугрел и по-подходящ за тази група пациенти. Кангрелор има плазмен полуживот от 3 до 6 минути, функцията на тромбоцитите се възстановява в рамките на 1 час след прекратяване на инфузията и може да бъде по-подходящ при пациентите с по-висок риск от кървене.

Стратегиите за минимизиране на риска от кървене при пациенти с ОКС с ПКА и тромбоцитопения са представени на фиг. 6 и фиг. 7.

Необходими са рандомизирани клинични проучвания, оценяващи безопасността и ефикасността на различните антитромбоцитни режими в тази рискова група.

Фиг. 6. Стратегии за минимизиране на риска от кървене при пациенти с ОКС с ПКА и тромбоцитопения. The management of antiplatelet therapy in acute coronary syndrome patients with thrombocytopenia: a clinical conundrum, Eur Heart J. 2017;38(47):3488-3492. doi:10.1093/eurheartj/ehx531



Фиг. 7. Тромбоцитопения и ОКС, The management of antiplatelet therapy in acute coronary syndrome patients with thrombocytopenia: a clinical conundrum, Eur Heart J. 2017;38(47):3488-3492. doi:10.1093/eurheartj/ehx531



ДААТ И ЕСЕНЦИАЛНА ТРОМБОЦИТЕМИЯ (ЕТ)

Пациентите с ЕТ имат повишен риск от артериални тромбози¹⁰. Причините са свързват с хипервискозитетен синдром, увеличен тромбоцитен turnover, увеличение на количеството на незрелите тромбоцити. Тези пациенти имат и повишен риск от кървене поради развитие на вторичен vWD, особено при повишен тромбоцитен брой над 1 000 – 1 500 x 10⁹/l. Тромбозата е по-честа от хеморагията. Те-

рапевтична стратегия е насочена към редукция на тромбоцитния брой.

За тази група пациенти празугрел и тикагрелор биха били по-ефективни в сравнение с клопидогрел. Изследването на тромбоцитната инхибция може да бъде полезно с цел оценка на тромбоцитната реактивност и постигане на оптимално тромбоцитно инхибиране ¹¹.

В алгоритмите за терапия на ЕТ от 2018 г. (фиг. 8) основният антиагрегант е аспирин в еднократен или двукратен прием в зависимост от степента на риска.

Фиг. 8 Алгоритъм за терапия на ЕТ от 2018 г., Tefferi A., Vannucchi A., Barbui T., Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018, Blood Cancer Journal, volume 8, 2018



Препоръките на ESC от 2017 дават и указания за поведение при кървене на фона на ДААТ в зависимост от неговата тежест:

ПРЕПОРЪКИ НА ESC ОТ 2017 ПРИ КЪРВЕНЕ НА ФОНА НА ДААТ ± ОАК

ТРИВИАЛНО КЪРВЕНЕ

ВСЯКО КЪРВЕНЕ, НЕ ИЗИСКВАЩО МЕДИЦИНСКА ИНТЕРВЕНЦИЯ ИЛИ ДОПЪЛНИТЕЛНА ОЦЕНКА

Напр. кожни хематоми, екхимози, петехии, самоотзвучаващ епистаксис, минимална конюнктивална хеморагия

1. Продължаване на ДААТ.
2. При провеждане на тройна терапия – продължаване на ОАК или еднократно пропускане на следващата доза.
3. Успокояване на пациента, обсъждане на превантивни стратегии, убеждаване на пациента относно важността на провеждане на терапията.

СЛАБО КЪРВЕНЕ

ВСЯКО КЪРВЕНЕ, ИЗИСКВАЩО МЕДИЦИНСКО ОБСЛУЖВАНЕ, НЕ ИЗИСКВАЩО ХОСПИТАЛИЗАЦИЯ

Напр. епистаксис, умерена конюнктивална хеморагия, генито-уринарно кървене, кървене от горния или долния ГИТ без сигнификантна кръвозагуба, леко хемоптоие

1. Продължаване на ДААТ, обсъждане на краткосрочна продължителност или преминаване към по-слаб P2Y12 инхибитор.
2. При провеждане на тройна терапия – преминаване към двойна терапия, за предпочитане с клопидогрел и ОАК.
3. Идентифициране и лечение на състоянията, свързани с кървенето – (дуоденална язва, хемориди), прибавяне на ИПП, убеждаване на пациента относно важността на провеждане на терапията.

УМЕРЕНО КЪРВЕНЕ

ВСЯКО КЪРВЕНЕ, СВЪРЗАНО СЪС СИГНИФИКАНТНА КРЪВОЗАГУБА (Hb >30 g/l), ИЗИСКВАЩО ИЛИ НЕ ХОСПИТАЛИЗАЦИЯ

Напр. генито-уринарно кървене, кървене от горния или долния ГИТ със сигнификантна кръвозагуба, или изискващо трансфузия

1. Спиране на ДААТ и продължаване с монотерапия, за предпочитане с P2Y12 инхибитор, особено в случаите на ГИК от горния тракт. Реинициране на ДААТ възможно най-скоро. Обсъждане на краткосрочна ДААТ с привключване към по-слаб P2Y12 инхибитор, особено при възобновяване на кървенето.
2. При провеждане на тройна терапия – обсъждане спирането на ОАК или задържането му ако кървенето е контролирано при много висок тромботичен риск (механични клапи, CHA2DS2-VASc >4 и др.). Възобновяване на терапията по възможност през първата седмица; поддържане на INR между 2,0 – 2,5 (ОАК), при ДОАК – преминаване към най-ниската ефективна доза. Обсъждане преминаването към двойна терапия, за предпочитане клопидогрел с ОАК. При пациенти на двойна терапия с ОАК- обсъждане спирането на антиагреганта ако се счита за безопасно.
3. Приложение на i.v. ИПП при ГИК, идентифициране и лечение на състоянията, свързани с кървенето, убеждаване на пациента относно важността на провеждане на терапията.

ТЕЖКО КЪРВЕНЕ

ВСЯКО КЪРВЕНЕ, ИЗИСКВАЩО ХОСПИТАЛИЗАЦИЯ, СВЪРЗАНО СЪС СИГНИФИКАНТНА КРЪВОЗАГУБА (Hb >50 g/l), ХЕМОДИНАМИЧНО СТАБИЛНО И НЕНАРАСТВАЩО БЪРЗО

Напр. тежко генито-уринарно, респираторно кървене или ГИК

1. Обсъждане спиране на ДААТ, продължаване с монотерапия, за предпочитане P2Y12 инхибитор.

При персистиране на кървенето – преустановяване на терапията. При преустановяване на кървенето – преоценка на нуждата от ДААТ – продължаване с монотерапия, за предпочитане P2Y12 инхибитор. При възобновяване на ДААТ – обсъждане на краткосрочна продължителност или преминаване към по-слаб P2Y12 инхибитор.

2. При провеждане на тройна терапия – обсъждане спирането на ОАК и възобновяването му ако кървенето е контролирано при много висок тромботичен риск (механични клапи, CHA2DS2-VASc>4 и др.) Възобновяване на терапията през първата седмица по възможност; поддържане на INR между 2,0 – 2,5 (ОАК), при ДОАК – преминаване към най-ниската ефективна доза. Обсъждане преминаването към двойна терапия, за предпочитане клопидогрел с ОАК. При пациенти на двойна терапия с ОАК- обсъждане спирането на антиагреганта ако се счете за безопасно.

3. Приложение на i.v. ИПП при ГИК. Трансфузии на RBC при Hb < 78 g/l, Трансфузии на тромб. концентрати, спешно хирургично или едноскопско лечение на източника на кървене

ЖИВОТОЗАСТРАШАВАЩО КЪРВЕНЕ

ВСЯКО ТЕЖКО АКТИВНО КЪРВЕНЕ, ЗАСТРАШАВАЩО ЖИВОТА

Напр. масивно генито-уринарно, респираторно кървене, кървене от горния или долния ГИТ, интракраниално, спинално или интраокуларно кървене или всяко друго кървене, довеждащо до хемодинамичен нестабилитет

1. Незабавно преустановяване на антитромбоцитната терапия. При преустановяване на кървенето – преоценка на нуждата от ДААТ – продължаване с монотерапия, за предпочитане P2Y12 инхибитор, особено в случаите на ГИК от горния тракт.

2. Спирането на ОАК и възобновяване при висок тромботичен риск

3. Обемно заместване при хипотензия. Приложение на i.v. ИПП при ГИК. Трансфузии на RBC независимо от стойността на Hb, трансфузии на тромбоцитни концентрат. Приложение на i.v. ИПП при ГИК, спешно хирургично или едноскопско лечение на източника на кървене.

Антиагрегантният отговор към ДААТ се измерва чрез ex vivo тестове за тромбоцитна функция. Тези тестове измерват остатъчната тромбоцитна активност и позволяват титруването на терапията, с цел намирането на баланса между нейната ефективност и безопасност.

ТЕРАПЕВТИЧЕН ОТГОВОР КЪМ ДААТ – РАЗГРАНИЧИТЕЛНИ СТОЙНОСТИ ЗА ОПТИМАЛЕН АНТИАГРЕГАНТЕН ЕФЕКТ

На базата на мета-анализ от 17 рандомизирани проучвания, включващи 20 839 пациентите изведени разграничителни граници¹², свързани с исхемични събития и с кървене, които оформят терапевтичен прозорец за оптимално тромбоцитно инхибиране (фиг. 6). Високата тромбоцитна реактивност (HPR) е свързана с риск от исхемични усложнения (2.7 пъти по-голям риск от СТ). Ниската тромбоцитна реактивност (LPR) е свързана с по-голяма честота на кървене (1.7 по-голям риск от голямо кървене). Оптималната тромбоцитна реактивност (OPR) е свързана с най-ниска честота на исхемични събития и хеморагии¹³.

Фиг. 9. Gross et al. Platelet Function Testing on Antiplatelet Medications, Seminar in Thrombosis and Hemostasis – February 2016



ОПТИМИЗИРАНЕ НА АНТРИМБОЦИТНАТА ТЕРАПИЯ

Мониторирането на тромбоцитната инхибция по време на терапия с цел поддържане на реактивността в рамките на терапевтичния прозорец спомага за предотвратяване на нежеланите събития от кървене и стент тромбоза (СТ)¹⁴.

ТЕРАПЕВТИЧЕН ОТГОВОР КЪМ ДААТ С MULTIPLATE АГРЕГОМЕТРИЯ – 10-ГОДИШЕН ОПИТ В НКБ

Методът MEA е въведен за първи път в страната в клиничната лаборатория на НКБ през 2008 г. Годино се изследват и проследяват средно около 800 пациента от кардиологичните клиники в болницата и амбулаторни пациенти от страната¹⁵.

Най-голям брой изследвания бяха извършени в периода 2010 – 2013 г., когато основният използван P2Y12 инхибитор беше клопидогрел и основната цел на изследванията беше установяване и преодоляване на резистентността към терапията с оглед намаляване на нежеланите исхемични събития. С прилагането на празугрела и тикагрелора – медикаментите с по-силен и предвидим антиагрегантен ефект, основните ни задачи станаха ус-

тановяване на LPR и кървене на фона на ДААТ и неговото минимизиране.

На базата на проучване, обхващащо 604 пациента след ПКА и стент имплантация¹⁶, получихме оптималната cutt-off стойност – 45 U (изведена от ROC анализ) за предсказване честотата на инстен тромбозите през 30 дневен период. Площта под ROC кривата – 0.864 (95% CI 0.772-0.957, $p < 0.0001$), показва 0,84 чувствителност и 0,79 специфичност. От друго проучване (описано по-долу), включващо 77 пациенти с по-силно инхибирана агрегация и кървене на фона на ДААТ дефинирахме разграничителна граница на ADP-индуцираната тромбоцитна агрегация за риск от настъпване на хеморагия¹⁷.

Установените от нас разграничителни стойности бяха много близки до тези, установени от Sibbing et al (табл. 2).

Табл. 2. Разграничителни стойности на тромбоцитните функционални тестове в НКБ.

Тест, единици	Cutoff-граница, свързана с исхемични събития	Cutoff-граница, свързана с кървене
MULTIPLATE ADP-тест, U, Sibbing et al.	> 46	< 19
MULTIPLATE ADP-тест, U, НКБ	> 45	< 18
MULTIPLATE ASPI-тест, U, НКБ	> 20	< 4

ПАЦИЕНТИ С ПОТИСНАТА АГРЕГАЦИЯ И КЪРВЕНЕ НА ФОНА НА ДААТ

В проучване, обхващащо 70 пациенти с повишено инхибирана тромбоцитна агрегация и кървене при прилагането на P2Y12 рецепторни инхибитори, оценихме честотата на пациентите с LPR и дефинирахме разграничителна стойност на ADP-индуцираната тромбоцитна агрегация за риск от настъпване на хеморагия. (фиг. 10).

Фиг. 10. Дизайн на проучването



РЕЗУЛТАТИ

В петгодишно проследяване на пациенти със стойности на ADP тест под 18 U и наличие на малки кръвоизливи (TIMI несигнификантно кървене – епистаксис, екхимози, субконюнктивално кървене) установихме честотата от 0,6 %/г. Средната стойност на ADP теста в групата пациенти на терапия с клопидогрел и с хеморагии беше $12 \pm 6,9$ Усрещу 24 ± 10 U в групата пациенти с добър отговор. В групата пациенти на терапия с празугрел и тикагрелор установихме по-ниски средни стойности – съответно $9,3 \pm 6,4$ U и $10,7 \pm 6,4$ U.

Увеличеният отговор към P2Y12 рецепторните инхибитори беше дефиниран като ADP-тест под 18 агрегационни единици. Антиагрегантната терапия при пациентите с хеморагия беше индивидуализирана чрез намаляване на поддържащата доза, заменяне на един P2Y12 инхибитор с друг, с което се постигна оптимално инхибиране и намаляване на кървенето.

Представяме няколко клинични случаи с кървене на фона на ДААТ и с последващо мониториране, които демонстрират приложението и ползата на MULTIPLATE тестовете за постигане на оптимално тромбоцитно инхибиране и липса на повторна хеморагия:

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ №1

69 годишна жена, ИБС, едноклонова коронарна болест, STEMI, ПКА стент x 2 на ДКА (МИС), ЗСН. Приема 75 mg клопидогрел и 100 mg ASA. След 2 месеца манифестира субконюнктивална хеморагия. Проведени изследвания: тромбоцити – $230 \times 109/L$, INR = 1.1, aPTT = 32 sec, ADP-8 U; ASPI- 3 U (табл. 3).

Табл. 3. Клиничен случай № 1

период	Медикамент/доза	Стойност на ADP тест	Стойност на ASPI тест
05.2013	Clopidogrel 75 mg/ASA 100 mg	17 U	5 U
07.2013	Clopidogrel 75 mg/ASA 100 mg	8 U	3 U
09.2013	Clopidogrel 0 mg/75 mg (редуване)/ ASA 75 mg	16 U	12 U
01.2014	Clopidogrel 0 mg/75 mg (редуване)/ ASA 75 mg	20 U	9 U

Пациентката остана на терпия с прием на клопидогрел 75 mg през ден. При проследяване в период от 6 месеца беше установен ADP тест в границите на оптималния отговор без повторна конюнктивална хеморагия.

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ №2

65 годишен мъж с ИБС, стент на ЛАД (МИС). Приема 150 mg клопидогрел и 100 mg ASA. Други рискови фактори: преживян исхемичен инсулт, диабет тип 2. След половин година се появяват петехии и екхимози по крайниците. Проведени изследвания: Тромбоцитен брой – 195×109/L; INR 1.1; aPTT 31 s, ADP – 12 U; ASPI – 8 U (табл. 4).

Табл. 4. Клиничен случай № 2

период	Медикамент/доза	Стойност на ADP тест	Стойност на ASPI тест
11.2013	Clopidogrel 75 mg/ASA 100 mg	58 U	12 U
12.2013	Clopidogrel 150 mg	31 U	-
07.2014	Clopidogrel 150 mg/ASA 100 mg	12 U	8 U
08.2014	Clopidogrel 75 mg/ASA 100 mg	32 U	14 U
11.2014	Clopidogrel 75 mg/ASA 100 mg	34 U	-

Пациентът остана на терпия с клопидогрел 75 mg дн. При проследяване в период от 3 месеца беше установен ADP тест в границите на оптималния отговор без данни за тривиално кървене.

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ №3

Мъж на 70 год. с STEMI, ПКА стент х 2 (МИС) на ЛАД. Приема Brilique 2 x 90 mg и ASA 100 mg. След 1 месец – субконюнктивална хеморагия и екхимози по крайниците. Проведени изследвания: тромбоцити – 245 x 109/L, ADP – 8 U; ASPI – 5 U (табл. 5).

Табл. 5. Клиничен случай № 3

период	Медикамент/доза	Стойност на ADP тест	Cutoff-граница, свързана с кървене
10.2015	Brilique 2x90 mg/ASA 100 mg	8U	5 U
11.2015	Clopidogrel 75 mg /ASA 100 mg	23 U	7
12.2015	Clopidogrel 75 mg /ASA 100 mg	17 U	5

Брилик беше заменен с клопидогрел 75 mg дн. При последващо проследяване беше установен ADP тест в границите на оптималния отговор без повторна кървене.

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ №4

Мъж на 60 години, ИБС, STEMI, ПКА, стент на ЛАД. Приема 75 mg клопидогрел и 100 mg ASA. След 5 месеца е с данни за мелена. Фиброгастроскопията обективизира хеморагично-ерозивен гастрит. Проведени изследвания: Hb – 122 g/l; Hct – 0.35; INR 1.2 aPTT 35 s; Тромбоцити – 195 x 109/L, ADP тест – 4 U; ASPI тест – 1 U (табл. 6).

Табл. 6. Клиничен случай № 4

период	Медикамент/доза	Стойност на ADP тест	Стойност на ASPI тест
07.2013	Clopidogrel 75 mg	4 U	1 U
09.2013	Clopidogrel 0 mg/75 mg (редуване)	8 U	-
11.2013	Clopidogrel 0 mg/75 mg (редуване)	13 U	-
05.2014	Clopidogrel 0 mg/75 mg (редуване)	42 U	-

Пациентът остана на монотерапия с прием на клопидогрел 75 mg през ден. При проследяване в период от 9 месеца беше установяван ADP тест в границите на оптималния отговор без настъпили нежелани исхемични и хеморагични събития.

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ №5

Мъж на 69 години, ИБС, едноклонова коронарна болест, ПКА, стент на OM1, AX III ст. Приема 75 mg клопидогрел и 100 mg ASA. След 2 месеца съобщава за световъртеж и повръщане, слабост на долни крайници, загуба на съзнание. Проведена КАТ – субарахноидален кръвоизлив. Извършена трепанация. Проведени изследвания: тромбоцити = 310 × 10⁹/L; INR 1.2; aPTT 33 s, ADP тест – 11 U; ASPI тест – 5 U (табл. 7).

Табл. 7. Клиничен случай № 5

период	Медикамент/доза	Стойност на ADP тест	Стойност на ASPI тест
06.2011	Clopidogrel 75 mg/ASA 100 mg	11 U	5 U
07.2011	Clopidogrel 0 mg/75 mg (редуване)/ASA 100 mg	28 U	10 U
09.2011	ASA 100 mg	-	3 U
12.2011	ASA 75 mg	-	9 U
06.2012	ASA 75 mg	-	10 U

Пациентът остана на монотерпия с прием на аспирин 75 mg дн. При последващо проследяване беше установен ASPI тест в границите на оптималния отговор без настъпване на нежелани исхемични и хеморагични събития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получените от нас резултати показват, че импедансната агрегометрия е бърз и надежден метод за оценка на тромбоцитната функция. In vitro измърването на тромбоцитната агрегация позволява индивидуализиране на антитромбоцитната терапия с P2Y₁₂ рецепторни антагонисти за достигане на адекватно тромбоцитно инхибиране и до минимизиране на риска както от исхемични събития, така и от хеморагия. Увеличено инхибирана

ADP-индуцирана тромбоцитна агрегация под 18 U и наличие на кръвене изисква преобсъждане на дозата и групата P2Y₁₂-медикаменти при провеждане на краткосрочна и дългосрочна антиагрегантна терапия.

Адрес за кореспонденция

Д-р Добринка Динева Савова, д.м.

Отделение по лабораторни диагностика

МБАЛ-НКБ, София

ул. Коньовица № 65, гр. София, 1309

e-mail: dobdineva@yahoo.com

тел. 029211377 GSM 0888330899

Correspondence address:

Dobrinka Dineva Savova, MD, PhD

Clinical Laboratory Department

National Heart Hospital, Sofia

65 Koniovitza str., Sofia 1309

e-mail: dobdineva@yahoo.com

Tel. 029211377 GSM 0888330899

БИБЛИОГРАФИЯ

- Awtry E, Loscalzo J, Aspirin, Platelets 2 Ed Michelson 2007; Academic Press: 1099 – 1125
- Wallentin L P2Y₁₂ inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use Eur Heart J 2009; 30: 1964-77
- Angiolillo DJ, Ortiz AF, Bernardo E. Variability in individual responsiveness to clopidogrel J Am Coll Cardiol 2007;49:1505-16
- Паскалева И, Динева Д., Байчева В, Цаева Р, Кънева Р. Георгиев Б. Гочева Н. Влияние на генетичните варианти CYP2C19*2 и CYP2C19*17 върху АДФ индуцирана тромбоцитна агрегация при пациенти на лечение с тиагенопиридини. сп. Българска кардиология, том XIX 2013 №4, стр 16 – 26.
- Brandt John, Christopher D. Payne, Stephen D. Wiviott, Govinda Weerakkody, Nagy A. Farid, David S. Small, Joseph A. Jakubowski, Hideo Naganuma, Kenneth J. Winters. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation, AHJ 2007, 153
- Wallentin L, Becker RC, Budaj A. et al., Ticagrelor versus Clopidogrel in patients with acute coronary syndromes N Engl J Med 2009; 361: 1045-1057
- ESC GUIDELINES, European Heart Journal (2017) 0, 1–48
- Yadav M at all, Effect of baseline thrombocytopenia on ischemic outcomes in patients with acute coronary syndromes who undergo percutaneous coronary intervention. Can J Cardiol 2016;32:226–233.
- Wang TY, Ou F-S, Roe MT, Harrington RA, Ohman EM, Gibler WB, Peterson ED. Incidence and prognostic significance of thrombocytopenia developed during acute coronary syndrome in contemporary clinical practice. Circulation 2009;119: 2454–2462.
- Recurrent Cardiovascular Events Despite Antiplatelet Therapy in a Patient with Polycythemia Vera and Accelerated Platelet Turnover Am J Case Rep, 2017; 18: 945-948
- Evaluation of platelet reactivity using PRU in ACS with ET. J of cardiology cases 2015 178-180
- Bleeding and stent thrombosis on P2Y₁₂-inhibitors: collaborative analysis on the role of platelet reactivity for risk stratification after percutaneous coronary intervention. Eur Heart J 2015;36:1762–1771.)
- Aradi D. et al. Working Group on Thrombosis of the ESC, Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing PCI. Eur.Heart J. 2014
- Platelet Function Testing in Patients on Antiplatelet Medications Article in Seminars in Thrombosis and Hemostasis February 2016
- Власовска М., Орбецова М., Георгиев Б. и сътр., Профилактика, диагностика, терапия, Актуални проблеми 2018, Хавитус
- Динева Д., Паскалева И., Гочева Н., Байчева В., Георгиев Б. Тромбоцитен отговор при лечение с клопидогрел и аспирин при пациенти с имплантирани коронарни стентове, оценен чрез импедансна агрегометрия на апарат Multiplate. сп. Българска Кардиология, 2011, XVII, 2: 16-25.
- Dineva D., Paskaleva I., Baycheva B., Gocheva N., Georgiev G., Trendafilova E. Assessing in low platelet reactivity (LPL) with multiple electrode impedance aggregometry (MEA) and risk of bleeding in patients receiving P2Y₁₂ receptor inhibitors. XXVI ISTH Congress and 63 Annual SSC Meeting 8-13 July 2017, Berlin, Germany DOI:10.1002/rth2.12026 Special Issue p.1338 – abstract

ХЕПАРИН-ИНДУЦИРАНА ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ

Дончева Е., Паскалева И., Динева Д.

Отделение по лабораторна диагностика – МБАЛ НКБ, София

HEPARIN-INDUCED THROMBOCYTOPENIA

Doncheva E., Paskaleva I., Dineva D.

Clinical Laboratory Department – National Heart Hospital, Sofia

Резюме. Хепарин-индуцираната тромбоцитопения (ХИТ) е комплексен клиничко-биологичен синдром, свързан с висока заболеваемост и смъртност, ако не е разпознат навреме. Възниква след експозиция към хепарин, независимо от вида, дозата и начина на приложение. В настоящия обзор се дискутират рисковите фактори, патофизиологията и клиничната изява на заболяването. Представени са съвременните препоръки в диагностичния подход и обещаващи терапевтични възможности за приложение на фондапаринукс и директни орални антикоагуланти (ДОАК) при ХИТ.

Ключови думи: хепарин, тромбоцити, тромбоза, фондапаринукс, ДОАК

Abstract. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is complex clinical-biological syndrome associated with high morbidity and mortality if not recognized in time. HIT occurs after heparin exposure, regardless of the type, dose, and route of administration. The main topics to be discussed in this review are the risk factors, pathophysiology and clinical manifestation. Current guidelines on diagnostic algorithm and promising therapeutic options for fondaparinux and direct oral anticoagulants (DOAC) in HIT are presented.

Key words: heparin, platelets, thrombosis, fondaparinux, DOAC

ВЪВЕДЕНИЕ

Употребата на нефракционирания хепарин (НФХ) в клиничната практика има над 100 годишна история [1]. Никой от съвременните орални и парентерални антикоагуланти не притежава уникалната комбинация от фармакологични характеристики на хепарина: бързо начало на действието, способност за инхибиране на множество фактори на кръвосъсирването, наличие на специфичен антидот, лесно лабораторно мониториране. В съвременната медицина, НФХ и неговият дериват – нискомолекулният хепарин (НМХ), намират приложение за профилактична и терапевтична антикоагулация при редица индикации, за които липсва подходяща алтернатива – сърдечносъдовата хирургия, механични сърдечни клапи, тромбоза, асоциирана с онкологично заболяване, хроничен диализа.

ХИТ е тежко, потенциално летално усложнение на терапията с НФХ, по-рядко с НМХ. Медира се от антитела, насочени срещу мултимерни комплекси, съставени от ендогенния тромбоцитен фактор 4 (ТФ4) и хепарин (ТФ4-Х комплекси) [2], в резултат на което се развива състояние на хиперсъсирваемост с клинична изява на тромбоцитопения и/или тромбоза [3]. Ранното разпознаване на синдрома е от критично значение, поради високата заболеваемост и смъртност в резултат на артериални, венозни или микросъдови тромбози [4]. Лечението

с алтернативен антикоагулант намалява риска от тромбоза с 50 – 70% [5].

ЕПИДЕМИОЛОГИЯ

Честотата на ХИТ при пациенти, получаващи хепарин, варира между 0.1 и 5%, като 25 – 50% от тях развиват хепарин-индуцирана тромбоцитопения с тромбоза (ХИТТ) [6]. Най-важните рискови фактори се отнасят до индикацията за терапия с хепарин, вида и дозата на използвания медикамент, продължителността на лечение, пола на пациента. ХИТ е 3 пъти по-честа при пациенти след травма или хирургия, особено в ортопедията и кардиохирургията [7], в сравнение с пациенти във вътрешните отделения и е много рядка в гинекологията и педиатрията [8]. НФХ се асоциира с 10 пъти по-висок риск от ХИТ, в сравнение с НМХ, докато при синтетичния пентазахарид фондапаринукс рискът е минимален [1, 6, 8]. Епидемиологичните данни за различната имуногенност и честота на ХИТ след прилагане на НФХ и НМХ предоставя възможности за превенция на заболяването. В инициативата "Избегни хепарина", която е започнала в Торонто през 2007 година, НФХ е системно заместван с НМХ за тромбoproфилактика и/или лечение [9]. Изследователите отчитат значимо намаляване на случаите на суспектна ХИТ (с 42%), на положителните имунологични тестове за анти-

тела (с 63%) и на потвърдените случаи на ХИТ/ХИТТ (със 79%, респективно 91%). Освен това заместването на НФХ с НМХ е свързано с намаляване на медицинските разходи, поради по-ниската честота на ХИТ. Терапевтичната доза хепарин води до по-голяма редукция в броя тромбоцити, в сравнение с профилактичната, въпреки че минимални количества хепарин, каквито се използват в разтворите за промиване на катетри, също могат да провокират антицялообразуване [10]. ХИТ възниква при 2 – 3% от пациентите, които получават НФХ за повече от 6 последователни дни, честотата е значително по-ниска при краткосрочно лечение [8]. Жените са застрашени 2 пъти повече от мъжете да развият ХИТ [4, 7].

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

ХИТ е ятрогенно заболяване, което се причинява от антицелуларния клас IgG, насочени срещу неопептопи върху комплекса ТФ4-Х и които се формират след експозиция към хепарин [11]. Веднъж образувани, антицелуларите могат да активират тромбоцитите и да доведат до увеличен тромботичен риск [12]. Състоянието на хиперсъсирваемост се медира също от активирането на моноцити, неутрофили и ендотелни клетки, в резултат на което се освобождава тъканен фактор и проадхезивни повърхностни молекули [8].

ХИТ антиген – комплексът ТФ4-Х

ТФ4 е положително зареден протеин, който се съхранява в алфа-гранулите на тромбоцитите и се освобождава в големи количества на местата на тяхната активация [1]. Свързването на ТФ4 с отрицателно заредения хепарин и формиране на имуногенен комплекс е възможно само при определени стехиометрични съотношения на двата компонента, позволяващи неутрализация на електричния заряд. През 2015 година беше описана кристалната структура на комплекса ТФ4-Х; което даде тласък в разбирането на фините молекулни механизми в патофизиологията на ХИТ [13]. В процеса на образуване на комплекса ТФ4-Х, хепаринът придобива линейна структура; това позволява присъединяване на нови тетрамери ТФ4 и формиране на мултимерни комплекси с големина над 670 kDa [12]. По този начин хепаринът оказва стабилизиращо действие върху тетрамерната конформационна структура на ТФ4-Х комплекса. Експресията на неопептопи върху ТФ4 е възможна само при специфични условия – свързване на ТФ4 към хепаринови молекули с минимална дължина на веригата над 11 захарида и надхвърляне на енергийния праг за конформационни промени [14].

В нормална плазма концентрацията на ТФ4 се намира в следи, но повишени нива се установяват при пациенти с диабет, инфекция, бъбречно заболяване, след травма и кардиопулмонален байпас [6]. В присъствие на хепарин концентрацията на

ТФ4 може да се увеличи до 30 пъти [15].

ХИТ антицяло

Характерно при ХИТ е образуване на антицелулар от клас IgG, които са насочени директно към комплекса ТФ4-Х. Описани са и антицелулар от клас IgM и IgA, но тяхното клинично значение е незначително [16]. Отдавна е известно, че основна клетъчна мишена на ХИТ-антицелуларите са тромбоцитите, които експресират FcγR1a рецептори [1]. Свързването на антицелуларите към рецепторите води до активиране на тромбоцитите, съпроводено с освобождаване на прокоагулантни микрочастици и интензивно тромбинообразуване. Освен тромбоцитите, ХИТ антицелуларите са способни да активират и моноцитите. Клетъчната активация на моноцитите посредством FcγR1a рецепторите води до експресия на тъканен фактор, който на свой ред стимулира активирането на тромбоцитите посредством тромбин [17]. Ролята на моноцитите в медирането на тежкото състояние на хиперсъсирваемост беше показана в скорошно проучване [18].

Литературните данни показват, че имунният отговор при ХИТ е много по-чест, в сравнение с клинично изявената тромбоцитопения и тромбоза. В общата популация между 8 и 17% от пациентите, лекувани с хепарин, образуват антицелулар срещу ТФ4-Х комплексите, докато в кардиохирургията техният дял достига 50% [1]. Бързата продукция на IgG антицелулар (средно 4 дни след експозиция), без първоначално образуване на IgM антицелулар, подсказва, че се касае за вторичен имунен отговор, независимо от липсата на предшестваща експозиция към хепарин при повечето пациенти с ХИТ [19]. Въз основа на тези наблюдения е предложена хипотезата, че сенсibiliзацията настъпва в резултат на действието на други фактори на околната среда. При бактериална инфекция, при която е налице активация на тромбоцитите, освободеният ТФ4 може да се свърже ефективно към бактериалната клетъчна стена [12]. Това се явява отключващ фактор за имунен отговор при последваща експозиция към хепарин. Освен това ТФ4-Х комплексите могат да активират комплемента и да се свържат към CD 21 рецептора на В клетките, увеличавайки по този начин образуването на антицелулар [20].

ТЕРМИНОЛОГИЯ И КЛИНИЧНИ ВАРИАНТИ

Изолирана ХИТ

Терминът „Изолирана ХИТ“ се отнася до случаите, при които единствената клинична изява на заболяването е тромбоцитопенията. Това състояние се приема за протромботично, поради високата честота на последваща тромбоза (20 – 50%) [21].

Остро начало на ХИТ

При 30% от пациентите броят на тромбоцитите започва да намалява веднага след прилагане на

хепарин, в рамките на първите 24 часа. Най-често се дължи на предходна експозиция към хепарин (до 100 дни), поради наличието на циркулиращи антитела [22]. Характерно за ХИТ антителата е, че са транзиторни. Установяват се в серума на пациенти между 50 и 85 дни, в зависимост от лабораторния метод – функционален или имунологичен [8]. В диференциално-диагностичен план на ХИТ с остро начало е особено важна внимателната клинична оценка и потвърждаване на диагнозата с лабораторен метод, тъй като бързият спад в тромбоцитния брой е нетипичен и е възможно да се дължи на друга причина.

Забавено начало на ХИТ

Отнася се до състояние, при което ХИТ се изяснява или влошава дни и дори седмици след преустановяване на терапията с хепарин. Описана е за първи път от Warkentin и Kelton през 2001 година и се наблюдава приблизително в 10% от случаите [23]. В серума на пациенти, изследвани посредством функционален метод, се установяват високотитърни антитела, способни да активират тромбоцитите дори и в отсъствието на хепарин [24]. ХИТ-антителата реагират кръстосано с комплекси, формирани от ТФ4 и отрицателно заредени хепариноподобни глюкозаминогликани -GAG (хондроитин-сулфат), намиращи се върху клетъчната повърхност [1, 22]. Тези пациенти са с тенденция за по-тежка тромбоцитопения и по-висока честота на венозна гангрена на крайниците [25]. При липса на своевременно диагноза съществува риск от повторна експозиция към хепарин, което е свързано с висока заболяемост и смъртност.

Спонтанна ХИТ

Спонтанно образуване на антитела в отсъствие на предшестваща експозиция към хепарин (сероконверсия), се наблюдава най-често при пациентите в кардиохирургията и ортопедията [1, 12]. Проучване на Vito и сътр. установява, че хирургичното възпаление предоставя достатъчно мощни сигнали за образуване на автоантитела в отсъствие на хепарин [26]. Освен това динамичната механична тромбопрофилактика може да увеличи тъканната увреда и да доведе до тромбоцитна активация с освобождаване на ТФ4 и GAG и последващо формиране на комплекси между тях, които се разпознават от ХИТ антителата [12].

КЛИНИЧНА МАНИФЕСТАЦИЯ

Клиничната картина на ХИТ се характеризира с два основни симптома – тромбоцитопения и/или тромбоза. Необходима е внимателна оценка на връзката между времето на клинична изява на заболяването и началото на терапията с хепарин.

Тромбоцитопения

Тромбоцитопенията представлява главната манифестация на ХИТ и се наблюдава при 95% от пациентите [1]. Типичното начало (в 65% от случаите) е между 5 и 10 дни от започване на терапията с хепарин [4]. Може да бъде абсолютна (намаление на тромбоцитния брой $< 150 \times 10^9/L$) или относителна – намаление с 30 – 50% от изходния брой. Абсолютната тромбоцитопения често е умерена ($50 - 70 \times 10^9/L$), характерно е, че не е свързана с кървене [5]. Тежка тромбоцитопения ($< 20 \times 10^9/L$) може да се развие при фулминантна форма и консумативна коагулопатия [27].

Възстановявяване на тромбоцитния брой в референтни граници се наблюдава в рамките на една седмица след преустановяване на хепарина в 65 – 90% от случаите, въпреки че е възможно да отнеме и седмици при малка част от пациентите [1, 8]. Дори и при възстановен брой, риск от тромбоза съществува 4 – 6 седмици след поставяне на диагноза, поради наличие на циркулиращи антитела [1, 6].

Тромбоза

Въпреки, че ХИТ се характеризира с тромбоцитопения, заболяването може да прогресира до парадоксално протромботично състояние, с честота на тромботичните събития при нелекувани пациенти между 50 и 89%, вкл. 5% риск от смърт поради тромбоза [6]. Тромботичните усложнения засягат кръвоносни съдове от всеки калибър; възможно е да настъпят преди изявата на тромбоцитопенията [4]. По-честа е венозната тромбоза (отношение 4:1 спрямо артериалната) [24], както и дълбоката венозна тромбоза на долните крайници (ДВТ), с или без белодробна емболия (БТЕ) [4]. Описани са тромбози на атипично място – адренални вени, мозъчни венозни синуси, мезентериални вени [4]. ХИТ-асоциираната ДВТ може да прогресира до венозна гангрена на крайниците, особено при лечение с витамин К антагонисти (ВКА), поради комбинирания ефект на ХИТ антителата и ВКА върху инхибирането на протеин С [1, 28]. Ампутация на крайниците се налага при 5 – 10% от пациентите с потвърдена диагноза [5].

Други усложнения на ХИТ включват системни и анафилактични реакции – фебрилитет, диспнея, некротични кожни лезии на инжекционните места, кардиопулмонален арест, които настъпват 5 – 30 минути след интравенозно приложение на болус НФХ и до 2 часа след подкожно приложение на НМХ [4, 24].

Понастоящем не е напълно изяснено, защо някои серопозитивни пациенти остават асимптоматични, докато други прогресират до тежка клинична изява. Не са установени разлики по отношение на маркерите за тромбофилия – PrC, PrS, AT, FVL [29]. Проучване на полиморфизма в гена, кодиращ FcγRIIa рецептора на тромбоцитите, показва по-ви-

сок риск от тромбоза при хомозиготните носители на 131 RR алела [30]. Установена е връзка между тромботичния риск и тежестта на тромбоцитопенията – той е 8 пъти по-висок при пациенти с > 90% намаление на изходния тромбоцитен брой спрямо пациентите с 30% намаление [31].

СКРИНИНГ

Обичайно скринингът за ХИТ включва серийни измервания на тромбоцитния брой при пациенти, получаващи НФХ или НМХ за най-малко 4 дни. Поради многото други причини за тромбоцитопения, трябва да се има предвид, че рутинното мониториране на тромбоцитния брой също може да доведе до ненужно преустановяване на терапията с хепарин и прилагане на алтернативен антикоагулант при пациенти, които в действителност нямат ХИТ.

Според препоръките на Американското дружество по хематология [8] мониториране на тромбоцитния брой при нисък риск от ХИТ (<0.1%) не е необходимо. С нисък риск са пациентите на терапия с НМХ във вътрешни и гинекологични отделения, след малка хирургия или травма, и всички пациенти получаващи фондапаринукс. При умерен (0.1 – 1%) и висок (>1%) риск е необходимо мониториране на броя тромбоцити. Умерен риск имат пациенти, получаващи НФХ във вътрешни и гинекологични отделения, както и такива, получаващи НМХ след голяма хирургия или травма. За високорискови се приемат пациентите в хирургични и травматологични отделения, получаващи НФХ в постоперативния период. При предшестваща експозиция към хепарин в рамките на предходните 30 дни, преди настоящия курс на лечение, мониторирането следва да започване в деня на стартиране на терапията с хепарин (ден 0). Ако пациентът не е получавал хепарин в последните 30 дни, то измерване на тромбоцитния брой се извършва между 4 и 14 ден или до преустановяване на терапията с хепарин. Честотата на измерване зависи от риска

за ХИТ – при висок риск е необходимо ежедневно мониториране, а при умерен риск – веднъж на всеки 2 – 3 дни.

ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ

ХИТ представлява клинично-биологичен синдром. Диагностичният подход включва комбинацията на два ключови компонента – оценка на клиничната картина и резултатите от лабораторните тестове.

Възможности за клинична прогноза

Оценката за клинична вероятност е от първостепенно значение в диагностичния алгоритъм, тъй като позволява да се изчисли риска за ХИТ преди получаване на резултатите от лабораторните тестове. Разработени са няколко системи за предсказване на клиничната вероятност за ХИТ, които ръководят клиничните решения за терапевтично поведение и/или извършване на лабораторен тест. Най-широко използвана е т.нар. скала на 4-те Т (4Ts), предложена от Warkentin и сътр. [32]. Оценяват се 4 критерия за ХИТ (табл. 1) – тромбоцитопения, време на изява на тромбоцитопенията спрямо началото на хепариновата терапия, наличие на тромботични усложнения, наличие или отсъствие на други причини за намаления брой тромбоцити. Пациентите се стратифицират в 3 групи:

С нисък риск (0 – 3 т.) – под 1% вероятност за ХИТ

С умерен риск (4 – 5 т.) – 10% вероятност за ХИТ

С висок риск (6 – 8 т.) – 50% вероятност за ХИТ

Класически пример за висока клинична вероятност е пациент с 50% редукция в тромбоцитния брой, изявена между 5 и 10 ден от начало на терапията с хепарин, с абсолютен брой $\geq 20 \times 10^9/L$, новопоявила се тромбоза и без друга причина за тромбоцитопения.

Табл. 1. Скала '4Ts' за оценка клиничната вероятност за ХИТ, по Warkentin и сътр. [32]

	2 точки	1 точка	0 точки
Тромбоцитопения	>50% Спад $\geq 20 \times 10^9/L$ Няма хирургия в посл. 3 дни	30-50%; Или спад $10-19 \times 10^9/L$	<30%; Или спад $<10 \times 10^9/L$
Време на изява	Ясно начало м/у 5 – 10 ден; Или ≤ 1 ден (при експозиция < 30 дни)	>10 дни или неясно начало; Или <1 ден при скорошна експозиция (31-100 дни)	≤ 4 дни без предходна експозиция
Тромбоза	Нова тромбоза (потвърдена) Кожна некроза Анафилактична р-я след болус	Прогресираща/рецидивиреща тромбоза Еритематозни кожни лезии Суспектна тромбоза	Няма
Други причини за тромбоцитопения	Липсва	Възможна	Дефинитивна

Диагностичната акуратност на скалата е оценена в редица проучвания. Мета-анализ показва висока отрицателна предсказваща стойност на групата с нисък риск (0.998; 95% CI 0.970-1.000) [32], което позволява изключване на ХИТ при тези пациенти [1]. От друга страна, положителната предсказваща стойност в групата с умерен/висок риск е ниска – 0.14; 95% CI 0.09-0.22, респ. 0.64; 95% CI 0.40-0.82 [32]. Това налага диагностично уточняване чрез потвърдителен лабораторен тест и прилагане на алтернативен антикоагулант [6]. Важно е да се съобразят ограниченията на системата за изчисляване на клинична вероятност, както и динамичната природа на ХИТ. Например несигурност/липсващи данни по отношение времето на започване на хепариновата терапия, възникване на тромботично усложнение преди изявата на тромбоцитопенията, могат да доведат до некоректна интерпретация и пациентът да бъде погрешно оценен с нисък риск за ХИТ. В тези случаи се препоръчва извършване на лабораторно изследване за наличие на анти-тела.

Тежестта на тромбоцитопенията подпомага диференциалната диагноза на ХИТ. Често при аутоимунна или лекарствено-индуцирана тромбоцитопения, както и при септично състояние, тромбоцитният брой е $< 20 \times 10^9/L$ [4]. Освен това намаленият брой тромбоцити самостоятелно не може да отдиференцира ХИТ от други състояния, свързани с тромбоцитопения, особено при критични пациенти. В проспективно проучване на Williamson и сътр., обхващащо над 3000 пациенти в интензивни отделения, честотата на лекостепенната тромбоцитопения ($100-149 \times 10^9/L$) е 15.3%, на умерената ($50-99 \times 10^9/L$) – 5.1% и на тежката ($<50 \times 10^9/L$) – 1.6% [33]. Фундаментален диагностичен критерий в 4Ts скалата е наличието/отсъствието на други причини за тромбоцитопения (табл. 2). Некоректната диагноза на тромбоцитопенията е свързана с риск за пациента, тъй като е възможно да се касае за прохеморагично, а не за протромботично състояние, и включването на алтернативен антикоагулант да провокира кървене.

Табл. 2. Диференциална диагноза на тромбоцитопения, по East и сътр. [4]

Състояние	Коментар
Сепсис	SIRS критерии, положителни хемокултури
ДИК	Удължени АРТТ, РТ, хипофибриногенемия
Масивна кръвозагуба	Източник на кървене, масивни хемотрансфузии, удължени АРТТ и РТ, хипокалциемия, хипотермия
Тромботична микроангиопатия	Шизоцити на периферна кръвна натривка, остро бъбречно увреждане, инсулт или неврологичен дефицит, хемолиза
Имунна тромбоцитопения	Диагноза на изключване, липсва универсален тест за анти-тела
Лекарствено-индуцирана тромбоцитопения	Анамнеза за употреба на лекарства, спад $< 20 \times 10^9/L$ (рядко при ХИТ), възможни са петехиални обриви
Кардиопулмонален байпас Екстракорпорална мембранна оксигенация Интрааортна балонна помпа	Деструкция на тромбоцитите

Лабораторна диагноза на ХИТ

Приблизително 40% от пациентите, оценени посредством 4Ts скалата, имат умерена или висока клинична вероятност за ХИТ и изискват допълнително лабораторно изследване за потвърждаване на диагнозата [22]. Използват се две основни групи лабораторни методи. Имунологичните (антигенни) методи установяват наличието на циркулиращи анти-тела, независимо от техния капацитет за активиране на тромбоцитите. Функционалните методи откриват анти-тела, индуциращи хепарин-зависима тромбоцитна активация. Най-общо двете групи лабораторни методи идентифицират различни фази в патогенезата на заболяването – началната имунна реакция и активирането на тромбоцитите, водещо до тромбоза.

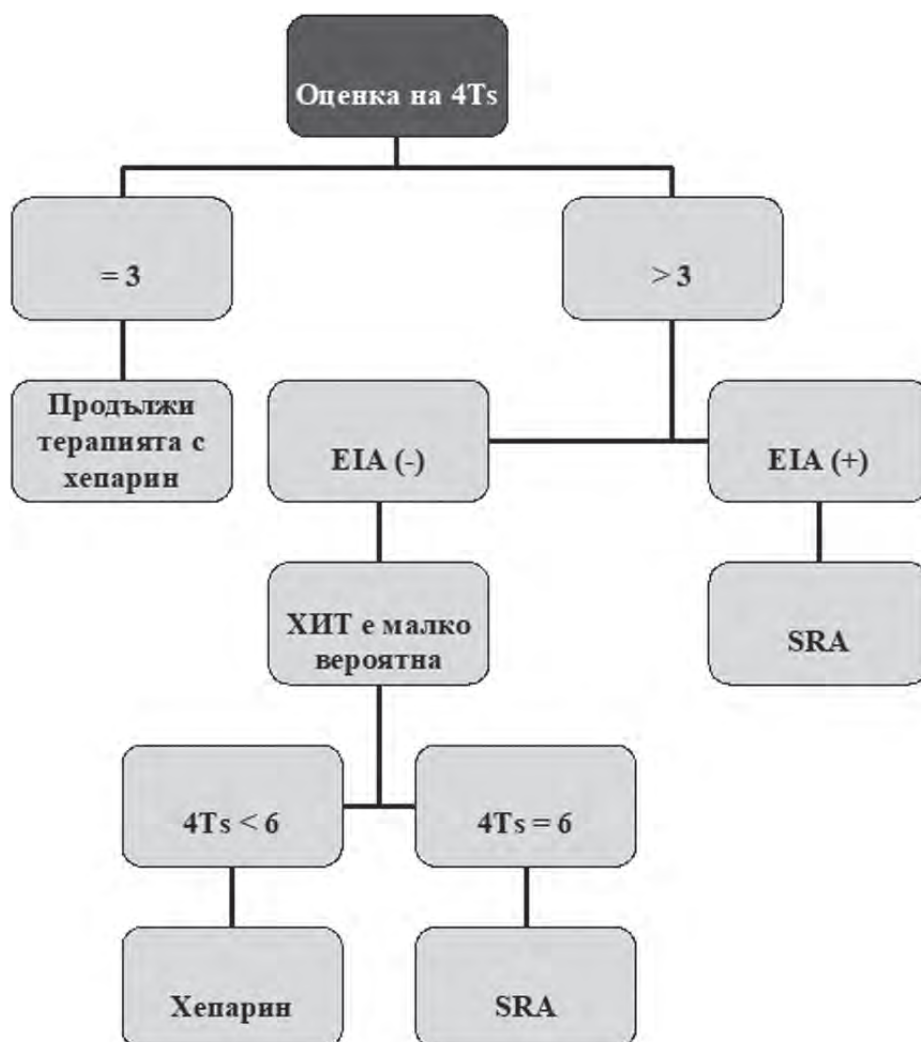
Имунологични методи

Имунологичните методи измерват анти-ТФ4-Х антителата и могат да бъдат полиспецифични (IgG, IgA, IgM) или моноспецифични (IgG). Съществуват редица аналитични платформи, разработени за серологична диагностика – ензимносвързан имуносорбентен анализ (ELISA), имунопреципитация в гелна среда, имунотурбидиметрия, хемилуминесценция, латексова алглутинация и др. [34]. Имунологичните методи се характеризират с висока диагностична чувствителност (> 99%), бързи и достъпни са и съставляват основата на лабораторната диагноза на ХИТ [22]. Съществен недостатък е ниската специфичност, която се дължи на относително честата продукция на непатогенни анти-ТФ-Х антитела (асимптоматична сероконверсия) [4]. Предложени са няколко стратегии за повишаване специфичността и увеличаване на положителната предсказваща стойност на имунологичните методи. На първо място се препоръчва използване на моноспецифични (IgG) тестове. Друга възможност е количествено изразяване на резултатите като стойност за оптична плътност (optical density – OD). Установена е сигнификатна

положителна връзка между OD и наличието на активиращи тромбоцитите антитела, респ. риска от тромбоза [6]. При използване на по-висока разграничителна стойност (cut off) за оптична плътност (положителен резултат при OD > 0.4), чувствителността на метода достига 99.99% [4]. Пациенти с OD > 2.0 (ELISA) са с над 90% вероятност за положителен функционален тест и висок риск от тромбоза [4].

Интегрирането на клиничните данни с резултатите от имунологичните тестове се утвърждава все повече като надежден диагностичен подход при ХИТ (фиг. 1). Според настоящите препоръки при пациенти с ниска клинична вероятност ($4Ts \leq 3$) лечението с хепарин може да продължи, без да е необходимо извършване на лабораторно изследване [8]. Комбинацията от висока клинична вероятност ($4Ts > 6$) и положителен имунологичен тест изключва необходимостта от извършване на функционален тест [1]. При пациенти с умерена клинична вероятност ($4Ts 4 - 5$ т.), отрицателният резултат от имунологичния метод изключва ХИТ, а положителният резултат изисква потвърждаване на диагнозата с функционален метод [4, 6, 22].

Фиг. 1 Диагностичен алгоритъм при ХИТ, по Greinacher A. [35]. EIA – ензимен имуноанализ; SRA – метод с освобождаване на серотонин



Функционални методи

Функционалните методи идентифицират патогенни IgG антитела, способни да се свържат кръстосано с тромбоцитния FcγRIIIa рецептор и да доведат до активиране на тромбоцитите и клинична изява на ХИТ. Методът с освобождаване на серотонин (SRA) се приема за златен стандарт. Приложение в практиката намират също хепарин-индуцираната тромбоцитна активация (HIPA), импедансната агрегометрия, флоуцитометрията. Аналитичният принцип се базира на инкубиране плазмата (серума) на пациента с донорски тромбоцити в присъствие на хепарин, които се активират и агрегират при наличие на патогенни ХИТ антитела в изследваната проба [35]. Функционалните методи се характеризират с висока специфичност (> 95%) и висока положителна предсказваща стойност (89 – 100%) [22]. Вариациите в чувствителността (56 – 100%) до голяма степен се дължат на крайната точка на отчитане (светлинна трансмисия < флоуцитометрия < радиоактивен сигнал) [1]. Други фактори, които повлияват аналитичната надеждност, включват техническите параметри – разлики в тромбоцитната реактивност, специфични реагенти, опита на оператора. Недостатък на тази група методи е, че са трудни за изпълнение, имат висока цена и са достъпни само в специализирани лаборатории. Най-често намират приложение за потвърждаване на положителен имунологичен тест при пациенти с умерена клинична вероятност за ХИТ, с цел избягване на свръхдиагноза [4]. Положителният резултат от функционалния тест предоставя дефинитивна диагноза на ХИТ.

Предизвикателства при suspectна ХИТ

Пациенти със suspectна ХИТ са тези, при които заболяването се подозира въз основа на клиничните симптоми, но потвърждаващ резултат от лабораторно изследване все още не е на разположение. Две са основните съображения, които повлияват поведението в тези случаи. От една страна съществува риск от неразпознаване на пациенти с ХИТ, което води до забавяне на терапията с алтернативен антикоагулант и висок риск от тромбоза и смърт. Поради това, ако е налице достатъчно съмнение за ХИТ, често е необходимо да започне емпирично лечение, докато се изчакват резултатите от лабораторните тестове [8]. От друга страна риск за пациента съществува и при свръхдиагностициране. Ненужното преустановяване на терапията с хепарин може да доведе до нежелана тромбоза, а емпиричното приложение на алтернативни антикоагуланти е свързано с висока цена и риск от кървене [36]. Поради тези причини е необходим индивидуален подход и използване на добре дефиниран диагностичен алгоритъм.

ЛЕЧЕНИЕ

Лечението на ХИТ започва в момента на подозрение за заболяването. При умерена/висока

клинична вероятност ($4Ts \geq 4$), незабавно се преустановяват всички източници на хепарин, включително НМХ, разтвори за промиване на катетри и др. Необходимо е включване на бързодействащ алтернативен антикоагулант в терапевтична доза, с цел предотвратяване на тромботично усложнение, дори и резултатът от лабораторното изследване да не е готов [22]. Редица фактори повлияват избора на конкретен медикамент – наличност, цена, възможности за лабораторно мониториране на антикоагулантния ефект, полуживот, начин на приложение (табл. 3). По отношение на пациента, факторите, от които зависи изборът на медикамент, включват индивидуалния риск от кървене, бъбречната и чернодробна функция, необходимост от извършване на инвазивни процедури [6].

Индиректни фактор Ха инхибитори

Синтетичният пентазахарид фондапаринукс е антитромбин-зависим селективен фактор Ха инхибитор. Според настоящите препоръки [5, 8], може да бъде използван безопасно при пациенти с ХИТ, поради липсата на кръстосана реактивност с анти ТФ4-Х антителата [1, 4]. Прилага се подкожно един път дневно и не изисква рутинно мониториране. Времето за достигане на терапевтично ниво, по-ниският риск от кървене, са някои от характеристиките, които обуславят предпочитанията към медикамента. В ретроспективно проучване на 239 пациенти със suspectна или потвърдена ХИТ, честотата на тромботично събитие, голямо кървене и смърт в групата с фондапаринукс не се различава значимо от тази при данапароид и аграфробан [37]. Необходимо е повишено внимание и мониториране на терапията при пациенти с бъбречна дисфункция, поради дългия полуживот и липсата на антидот. В Националната кардиологична болница е натрупан богат клиничен опит с приложение на фондапаринукс [38]. Оценката на антикоагулантния ефект е извършвана чрез измерване на ати-Ха активност. Нашият опит показва, че фондапаринукс е сигурен и ефективен антикоагулант като алтернатива на хепарина при пациенти с ХИТ.

Данапароид представлява хепариноподобна смес, състояща се от естествено срещащи се GAG (хепаран сулфат, дерматан сулфат, хондроитин сулфат), и е първият алтернативен медикамент за лечение на ХИТ [1]. Потиска индуцираната от ХИТ антителата тромбоцитна активация посредством изместване на ТФ4-Х комплексите върху повърхността на тромбоцитите. Данапароид е оценен в рандомизирано контролирано проучване спрямо декстран 70 [39]. 56% от пациентите, лекувани с данапароид претърпяват пълно излекуване, в сравнение с 14% в групата, получавала декстран ($P=0.02$). Одобрен е за употреба в редица страни в Европа, Канада, Япония, Австралия, но е изтеглен от пазара в САЩ от 2002 година.

ДОАК

В последните години се публикуват обещаващи резултати за безопасна и ефикасна употреба на ДОАК при ХИТ [40]. Предпоставките за тяхното приложение са няколко. Контролираните рандомизирани клинични проучвания показаха по-ниска честота на голямо кървене при ДОАК в сравнение с ВКА при пациенти с ВТЕ без ХИТ. Характеризират се с бързо начало на действие, приемат се през устата и не изискват рутинно лабораторно мониториране. За разлика от хепарина, не взаимодействат с ТФ4 и не образуват комплекси с него; а в присъствие на анти ТФ4-Х антитела не водят до тромбоцитна активация [11]. Лесната употреба на ДОАК позволява приложение в амбулаторни условия, а съкратеният болничен престой намалява медицинските разходи. Предпочитат се при клинично стабилни пациенти с умерен риск от кървене. Американското дружество по хематология препоръчва приложение на ДОАК пред ВКА при пациенти с ХИТ в подострата фаза, при които тромбоцитният брой е възстановен, но лабораторните (имунологични и функционални) тестове за антитела са все още положителни [8]. При животозастрашаващо тромбемболично събитие или риск от ампутация (масивен БТЕ, респ. венозна гангрена на крайниците), се предпочита парентерален алтернативен антикоагулант, поради недостатъчния клиничен опит с ДОАК при тези пациенти.

По отношение избора на конкретен ДОАК, най-голям клиничен опит има с ривароксабан. В специализираната литература са описани различни дозови режими. При пациенти с остра ХИТ се препоръчва лечение с ривароксабан 15 mg два пъти дневно за първите 3 седмици, последван от 20 mg един път дневно. При остра изолирана ХИТ терапията с ривароксабан в доза 15 mg два пъти дневно продължава до възстановяване на тромбоцитния брой [8].

ВКА

Застъпване с ВКА е противопоказно преди достигане на тромбоцитния брой до стабилно изходно ниво и над $150 \times 10^9/L$ [5, 8]. Тази препоръка е валидна и за пациенти, които приемат ВКА при поставяне на диагнозата. ВКА следва да се преустанови и да се приложи интравенозен витамин К за обратимост на действието, успоредно със започване на алтернативния антикоагулант. Основание за това е намаляване на риска от венозна гангрена на крайниците и ВКА-индуцирана кожна некроза [1].

Трансфузии на тромбоцитни концентрати

При пациенти с умерен риск от кървене, препоръките не подкрепят рутинна трансфузия на тромбоцитни концентрати [8], поради увеличения риск от артериален тромбемболизъм [41]. При тежка тромбоцитопения и кървене, както и при необходимост от инвазивни процедури с висок риск от кървене, субституция с тромбоцитни концентрати би могла да влезе в съображение [5, 8].

Продължителност на лечението с алтернативен антикоагулант

При изолирана ХИТ тромботичният риск е висок в периода на възстановяване на тромбоцитния брой. Американското дружество по хематология препоръчва лечението с алтернативен антикоагулант да продължи най-малко до достигане на брой тромбоцити $150 \times 10^9/L$ с максимален срок до 3 месеца [8]. Според същите препоръки, при пациенти с остра ХИТ, които нямат друга индикация за антикоагулантна терапия, лечението продължава за срок от 3 до 6 месеца.

Табл. 3. Кратка характеристика на някои от използваните антикоагуланти за лечение на ХИТ, по Сукер и сътр. [8]

Медикамент	Механизъм на действие	Начин на приложение	Елиминация (T1/2)	Дозиране	Лабораторно мониториране
Danaparoid	Индиректен FXa инхибитор	IV	Бъбречна (24 ч.)	Болус: < 60 кг.: 1500U 60 – 75 кг.: 2250 U 75 – 90 кг.: 3000 U > 90 кг.: 3750 U Поддържаща инфузия: Нормална бър. ф-я: 200 U/h Бър. дисф-я: 150 U/h	Анти-Ха, калибриран за данапароид: 0.5 – 0.8 U/mL
Fondaparinux	Индиректен FXa инхибитор	SC	Бъбречна (17 – 24 ч.)	<50кг.: 5 mg/d 50 – 100 кг.: 7.5 mg/d > 100 кг.: 10 mg/d Контраиндициран при CrCl < 30 mL/min	Анти –Ха при ХБЗ 0.6 – 1.0 U/mL

Apixaban	Директен FXa инхибитор	PO	Чернодробна (8 – 15 ч.)	ХИТТ: 2x10 mg/d за 1 седмица; след това 2x5 mg/d Изолирана ХИТ: 2x5 mg/d до възстановяване на тромбоцитния брой	He
Dabigatran	Директен тромбин инхибитор	PO	Бъбречна (12 – 17 ч.)	ХИТТ: 2x150 mg/d след ≥ 5 дни лечение с нехепаринов парентерален АК Изолирана ХИТ: 2x150 mg/d до възстановяване на тромбоцитния брой	He
Rivaroxaban	Директен FXa инхибитор	PO	Бъбречна (5 – 9 ч.)	ХИТТ: 2x15 mg/d за 3 седмици, след това 1x20 mg/d Изолирана ХИТ: 2x15 mg/d до възстановяване на тромбоцитния брой	He

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ХИТ е рядко, но тежко ятрогенно усложнение при хоспитализирани пациенти. В последните 5 години бе постигнат съществен напредък по отношение разбирането на причините за антияло-образуване и патофизиологичните механизми на тромботичните събития. Индивидуалният подход при всеки пациент е предпоставка за коректна и своевременно диагноза, която е от първостепенно значение за клиничния изход. Резултатите от проучванията за приложение на фондапаринукс и ДОАК са обещаващи и разширяват терапевтичните възможности.

Адрес за кореспонденция

Д-р Евелина Петрова Дончева, дм
Отделение по лабораторна диагностика
МБАЛ-НКБ, София
гр.София, ул. Коньовица № 65, 1309
e-mail: evadoncheva@yahoo.com
Тел: 02 9211377, GSM: 0887798647

Correspondence address:

Evelina Petrova Doncheva, MD, PhD
Clinical Laboratory Department
National Heart Hospital, Sofia
65 Koniovitza str., Sofia, 1309
e-mail: evadoncheva@yahoo.com
Tel. 02 9211377, GSM: 0887798647

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Arepally GM. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2017 129:2864-2872
2. Greinacher A, Potzsch B, Amiral J, et al. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost.* 1994;71(2):247-251
3. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, et al. Sera from patients with heparin-induced

thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1994;84(11):3691-3699

4. East JM, Cserti-Gasdeewich CM, Granton JT et al. Heparin-Induced Thrombocytopenia in the Critically Ill Patient. *Chest.* 2018;154:678-690.
5. Linkins LA, Dans AL, Moores LK, et al. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis (9th ed). American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2012 Feb;141(2 suppl):e495Se530S.
6. Salter BS, Weiner MM, Trinh MA, et al. Heparin-Induced Thrombocytopenia: a comprehensive clinical review. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(21):2519-2532
7. Warkentin TE, Sheppard JA, Sigouin CS, et al. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2006;108(9):2937-2941
8. Cuker A, Arepally GM, Chong BH, et al. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2018;2(22):3360-92
9. McGowan KE, Makari J, Diamantouras A, et al. Reducing the hospital burden of heparin-induced thrombocytopenia: impact of an avoid heparin program. *Blood.* 2016;127(16):1954-1959
10. Muslimani AA, Ricaurte B, Daw HA. Immune heparin-induced thrombocytopenia resulting from preceding exposure to heparin catheter flushes. *Am J Hematol* 2007;82:652-5
11. Tran PN, Tran MH. Emerging Role of Direct Oral Anticoagulants in the Management of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Clin Appl Thromb Hemost* 2018; 24(2):201-2019.
12. Nagalla S, Sarode R. Recent advances in understanding and management of acquired thrombocytopenia. *F1000Res.* 2018;7:68
13. Cai Z, Yarovi SV, Zhu Z, et al.: Atomic description of the immune complex involved in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun.* 2015; 6: 8277
14. Kreimann M, Brandt S, Krauel K, et al. Binding of anti-platelet factor 4/heparin antibodies depends on the thermodynamics of conformational changes in platelet factor 4. *Blood.* 2014;124(15):2442-2449
15. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2003;121:535-55
16. Juhl D, Eichler P, Lubenow N, et al. Incidence and clinical significance of anti-PF4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA class in 755 consecutive patient samples referred for diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2006;76:420-6
17. Kasthuri RS, Glover SL, Jonas W, et al. PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγgammaRI. *Blood.* 2012;119(22):5285-5293
18. Tutwiler V, Madeeva D, Ahn HS, et al. Platelet transactivation by monocytes promotes thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2016;127(4):464-472
19. Warkentin TE, Sheppard JA, Moore JC, et al. Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2009 May 14;113(20):4963-9.
20. Khandelwal S, Lee GM, Hester CG, et al.: The antigenic complex in HIT binds to B cells via complement and complement receptor 2 (CD21). *Blood.* 2016; 128(14): 1789-99.
21. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med.* 1996;101(5):502-507.
22. Onwuemene O, Arepally GM. Heparin-induced thrombocytopenia: research and clinical updates. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;(1):262-268.

23. Warkentin TE, Kelton JG. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med.* 2001;135(7):502-506
24. Warkentin TE. Clinical picture of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) and its differentiation from non-HIT thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2016;116:813-22.
25. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost* 2015;41:49-60.
26. Bito S, Miyata S, Migita K, et al. Mechanical prophylaxis is a heparin-independent risk for anti-platelet factor 4/heparin antibody formation after orthopedic surgery. *Blood.* 2016;127(8):1036-1043
27. Warkentin TE, Greinacher A. Management of heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(5):462-470
28. Kowalska MA, Krishnaswamy S, Rauova L, et al. Antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) inhibit activated protein C generation: new insights into the prothrombotic nature of HIT. *Blood.* 2011;118(10):2882-2888
29. Carlsson LE, Lubenow N, Blumentritt C, et al. Platelet receptor and clotting factor polymorphisms as genetic risk factors for thromboembolic complications in heparin-induced thrombocytopenia. *Pharmacogenetics.* 2003;13(5):253-258
30. Rollin J, Pouplard C, Sung HC, et al. Increased risk of thrombosis in FcγRIIIA 131RR patients with HIT due to defective control of platelet activation by plasma IgG2. *Blood.* 2015;125(15):2397-2404
31. Greinacher A, Farmer B, Kroll H, et al. P. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost.* 2005;94(1):132-135
32. Cuker A, Gimotty PA, Crowther MA, Warkentin TE. Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood.* 2012;120(20):4160-4167
33. Willamson DR, Albert M, Heels-Ansdell D, et al. Thrombocytopenia in critically ill patients receiving thromboprophylaxis: frequency, risk factors, and outcomes. *Chest* 2013;144:1207-15.
34. Nagler M, Bachmann LM, Ten Cate H, et al. Diagnostic value of immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood.* 2016;127(5):546-557
35. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009;7(Suppl.1):9-12
36. Minet V, Dogné JM, Mullier F. Functional Assays in the Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Review. *Molecules.* 2017;22(4). pii: E617.
37. Kang M, Alahmadi M, Sawh S, et al. Fondaparinux for the treatment of suspected heparin-induced thrombocytopenia: a propensity score-matched study. *Blood.* 2015;125(6):924-929
38. Паскалева И., Дончева Е., Нешева А., и сътр. Приложение на Fondaparinux при пациенти с хепарин-индуцирана тромбоцитопения. *Българска кардиология,* 2010.
39. Chong BH, Gallus AS, Cade JF, et al. Prospective randomised open-label comparison of danaparoid with dextran 70 in the treatment of heparin-induced thrombocytopenia with thrombosis: a clinical outcome study. *Thromb Haemost.* 2001;86(5):1170-1175
40. Warkentin TE, Pai M, Linkins LA. Direct oral anticoagulants for treatment of HIT: update of Hamilton experience and literature review. *Blood.* 2017; 130(9):1104-1113
41. Goel R, Ness PM, Takemoto CM, et al. Platelet transfusions in platelet consumptive disorders are associated with arterial thrombosis and in-hospital mortality. *Blood.* 2015;125(9):1470-1476

ИЗТОЧНИЦИ, ПОЛУЧАВАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА СТВОЛОВИ ХЕМОПОЕТИЧНИ КЛЕТКИ

Тонев И., Минчев М.

Отделение за трансплантация на хемопоеитични стволови клетки,
Национална специализирана болница за активно лечение на
хематологични заболявания ЕАД – София

SOURCES, HARVESTING AND STORAGE OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Tonev I., Mincheff M.

Department for Transplantation of Hematopoietic Stem Cells,
National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Резюме. Трансплантацията на хемопоеитични стволови клетки (ХСК) става все по-често използван метод за лечение на злокачествени и доброкачествени хематологични и нехематологични заболявания. Като източници на ХСК се използват костен мозък, периферна кръв и венозна кръв от пълна връв. Костният мозък, макар и по-рядко, е първи избор като източник на ХСК при определени диагнози като апластична анемия или за избягване на риска от по-голяма несъвместимост между донор и реципиент, която може да доведе до болест на присадката срещу приемателя. Стволовите клетки от периферна кръв ускоряват прихващането на присадката, поради което са все по-често използвани. Основни проблеми при получаването им са неуспешната мобилизация на пациентите, особено при претретиранни пациенти и неадекватният съдов достъп. Един от подходите за преодоляване на проблема с лошата мобилизация е CXCR4 антагонистът плериксафор, чиято употреба намалява броя на аферезите за постигане на желаната клетъчна доза. ХСК от кръв от пълна връв са лесно достъпни след раждането на плода и получаването им не носи рискове за дарителя, но малкото им количество все още е сериозна пречка за по-честата им употреба.

Дълготрайно ХСК се съхраняват в течен азот или в свръх-нискотемпературни фризери след замразяване с криопротективен разтвор. Най-често използваният криопротектор диметилсулфоксид (ДМСО) е токсичен за клетките при температура над нула градуса и предизвиква редица нежелани реакции по време на преливането им. За да се намалят тези ефекти, все по-често се замразява с по-ниска концентрация на ДМСО, с добавяне на извънклетъчни криопротектори, за да се запази клетъчната жизненост при криогенно съхранение.

Ключови думи: хемопоеитични стволови клетки, афереза, костен мозък, съхранение, диметилсулфоксид, мобилизация

Abstract. Hematopoietic stem cell (HSC) transplantation has become one of the most used methods for treatment of benign and malignant hematological and non-hematological diseases. Bone marrow, peripheral blood stem cells and cord blood are used as sources of HSC. Bone marrow, despite less often, still remains first choice for some diagnoses as aplastic anemia, or to prevent the risks of graft versus host disease that results from HLA mismatch between donor and recipient. Peripheral blood stem cells accelerate the engraftment and thus are used more often. The major problems are poor harvest due to bad mobilizers, especially in over treated patients and inadequate vascular access. One of the approaches to overcome the bad mobilization is the use of the CXCR4-antagonist plerixafor, which reduces the number of apheresis procedures necessary to achieve the required cell dose. Cord blood HSCs are easily harvested after delivery and their collection does not pose risks to the donor, but the low number is still a major obstacle for their widespread use.

HSC are stored for a long time in liquid nitrogen or in ultra low temperature freezers after freezing with cryoprotective solution. The most often used cryoprotectant dimethylsulfoxide (DMSO) is toxic for the cells above zero C and induces adverse reactions during infusion. To reduce these effects, lower concentrations of DMSO are used with the addition of extracellular cryoprotectants to keep the cellular viability during cryogenic storage.

Key words: hematopoietic stem cells, apheresis, bone marrow, storage, dimethylsulfoxide, mobilization

Хемопоеитичните стволови клетки се дефинират като недиференцирани клетки, способни да се делят за неопределен период като се самообновяват и създават потомство от високо специализирани клетки [1]. Трансплантацията на хемопоеитични стволови клетки (ХСК) е утвърден метод за лечение на доброкачествени и злокачествени хематологични заболявания, който разширява показанията си и се прилага при все повече заболявания и припо-възрастни пациенти. Ежегодно броят на автоложните и алогенните трансплантации на стволови хемопоеитични клетки в Европа и в света нараства [2-4], като до момента в света са извършени над 1 000 000 трансплантации [5], а в Европа годишният им брой е над 37 000 [6].

ПОЛУЧАВАНЕ НА ХЕМОПОЕИТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Като източници на стволови хемопоеитични клетки се използват костен мозък, периферна кръв или венозна кръв от пълна връв [7]. Когато стволовите клетки се получават от самия пациент, те се наричат автоложни, а когато се ползват клетки от здрав дарител (родствен или неродствен), се наричат алогенни.

Стволови клетки от костен мозък

Първоначално за трансплантация на хемопоеитични стволови клетки е използван костен мозък. Все още при определени заболявания (напр. апластична анемия заради стромалните клетки в аспирата), както и при по-малка съвместимост между донор и реципиент, костният мозък е предпочитан източник на стволови клетки, тъй като в костния мозък има около десет пъти по-малко Т – лимфоцити, които са пряко свързани с едно от най-честите и най-тежки усложнения на алогенната трансплантация – болест на присадката срещу приемателя (GvHD). [8]. При възрастните пациенти в тръбестите кости костният мозък почти напълно е изместен от мастна тъкан, като хемопоезата се извършва предимно в плоските кости [9]. Поради тази причина при такива пациенти за целите на трансплантацията най-често се добива костен мозък от тазовите кости [7]. Получаването му се извършва в операционна под анестезия, при строго спазване на правилата за асептика и антисептика.

Пациентът (донорът) се поставя най-често по корем или на една страна, обезболява се посредством обща или спинална анестезия. След това с многократни убощдания на *Crista iliaca* и *Spina iliaca posterior superior* с игла за получаване на костен мозък с 1, 3 или 5 отвора се аспирира костен мозък, примесен с кръв. При всяко убощдане трябва да се аспирира от различно място или чрез промяна на ъгъла на иглата, или чрез промяна на дълбочината на проникване в костта. Еднократната аспирация не трябва да надвишава 5 мл, тъй

като при по-големи аспирационни обеми се увеличава относителното количество на периферна кръв [7, 10]. Аспирираният костен мозък се смесва с антикоагулант (цитратен разтвор или хепаринов разтвор, който може да съдържа и антибиотици). Обичайно се аспирират 10-15 мл/кг, но не повече от 20 мл/кг дарителско тегло костен мозък [7].

Даряването на костен мозък като цяло е безопасно за донора с много рядко съобщавани усложнения, основно свързани с анестезията, както и слабост и болка в областта на убощданията няколко дни след даряването [11]. При надвишаване на 500 мл кръвозагуба се извършва преливане на предварително приготвен еритроцитен концентрат (при здрави донори се предпочита автоложна кръв, която с взема предварително поне 10 дни преди получаването на костен мозък и се съхранява до деня на операцията) или плазма (за предпочитане автоложна, получена предварително чрез плазмафереза около седмица преди даряването на костния мозък).

По време на получаването на костномозъчния аспират, от клетъчната суспензия се вземат проби, за да се контролира броят на нуклеарните клетки в получения продукт. При автоложна трансплантация на ХСК минималната доза, за която е прието че осигурява успешно прихващане на присадката, е 1,5 x 10⁸/кг.т. ядреносни клетки [2]. При алогенна трансплантация по повод левкемия, хемоглобинопатии и вродени дефекти на метаболизма минималната доза, за която е прието че осигурява надеждно прихващане на присадката, е 2 x 10⁸/кг.т. [2] ядреносни клетки, а при трансплантация от HLA- съвместим неродствен донор или при родствен донор и реципиент с апластична анемия е 3 x 10⁸/кг.т. [2, 12]. След получаването на необходимата доза костномозъчни клетки, донорът остава за наблюдение около 24 часа [2].

Получената клетъчна суспензия от костен мозък се филтрира за отстраняване на костни фрагменти и мазнини. За намаляване на обемното натоварване на реципиента и при АВ0 несъвместимост между донор и реципиент, плазмата и еритроцитите се отстраняват чрез мануално центрофугиране и/или високомолекулни седиментационни разтвори, или чрез използване на клетъчен сепаратор. Полученият продукт с или без допълнителна обработка (виж по-долу) се прелива на пациента възможно най-бързо, като съхранението между + 4°C и +8°C запазва добра жизнеността на ХСК до 72 часа [13]. Ако не могат да се прелеят в рамките на 72 часа, клетките се замразяват и се съхраняват до деня на трансплантацията.

След въвеждането на употребата на G-CSF, все по-често се използва „подготвен“ или мобилизиран 2-4 дни костен мозък, което води до получаване на по-високи дози моноклеарни и CD34+ стволови клетки [14]. Това ускорява прихващането на присадката при автоложните и алогенните тк-

рансплантации. [15] Някои центрове при хаплоидентични трансплантации използват комбинация от костен мозък и стволови клетки от периферна кръв, добити в два последователни дни. [16]

Стволови клетки от периферна кръв

Най-често като източник на хемопоеични стволови клетки за автоложни и алогенни трансплантации се използва периферна кръв – според данните на европейската група за трансплантации на кръв и костен мозък (EBMT) източник на стволови клетки в 88% от случаите е периферна кръв, при 9,7% костен мозък и малко над 2 % кордална кръв. [3, 6, 17]. Причините за това са по-малката инвазивност на процедурата и липсата на анестезия, правещи я по-поносима [17, 18], както и по-бързото прихващане на присадката [18, 19], а в някои случаи (при алогенни трансплантации) поради желание на самия донор [17].

Получаването на стволови клетки от периферна кръв става след предварителното стимулиране (мобилизация) на пациента чрез самостоятелно прилагане в продължение на 5 дни на гранулоцитен колонио-стимулиращ фактор (G-CSF) в доза 10-15µg/kg/т. Често за мобилизация при автоложни трансплантации за злокачествени хемопатии се използва комбиниране на растежния фактор в доза от 5-10µg/kg/т. през възстановителния период след прилагане на химиотерапия – Ендоксан или след високо дозови режими (DHAP, ICE, VINA и др.), които са част от лечението на пациентите и позволяват *purging in vivo* на остатъчни туморни клетки. Важно е провеждането на високодозова химиотерапия да се синхронизира с получаването на стволовите клетки, тъй като провеждането на повече химиотерапевтични курсове влошава възможностите на пациента за мобилизация.

Растежните фактори засилват пролиферацията на хемопоеичните стволови клетки и намаляват експресията на адхезионните молекули, като по този начин улесняват излизането им от костномозъчните ниши в периферната кръв. Нивото на циркулиращите в кръвта CD 34+ стволови клетки се проверява посредством поточна цитометрия. Ако броят им е достатъчен се преминава към левкафереза, при която чрез клетъчен сепаратор от донора се отделя суспензия, богата на стволови хемопоеични клетки. За прагово ниво на работа е прието CD34+ клетки да са над 10/µL [2, 20], като при тази стойност очакваният добив е около 0,5 x106/kg.т. на пациента [20]. За да се намали броят на цитаферези с цел по-малко излагане на пациента на рисковете от процедурата (виж по-долу) и за да се намалят разходите за получаване, обработка, замразяване и съхранение на ХСК, обичайно се работи при по-високи изходни нива на стволовите клетки (над 20x106/µl).

За осигуряването на надежден кръвоток с необ-

ходимата за цитаферезата скорост се канюлират две периферни вени с фистулни игли с широк лумен (16G), а когато това е невъзможно, се поставя двупътен централен венозен катетър. Кръвта на пациента постъпва в апарата, центрофугира се, като част отполучената при центрофугирането левкоцитна пеленка се отделя като краен продукт. Останалите кръвни компоненти се връщат обратно към пациента.

Има клетъчни сепаратори, работещи циклично и такива с постоянен поток на кръвта. В зависимост от концентрацията на стволови клетки в периферната кръв, желаната за целите на трансплантацията доза клетки и вида на клетъчния сепаратор, крайният продукт от една цитафереза е с обем между 100 и 600 мл. За минималната прагова доза CD 34+хемопоеични стволови клетки, осигуряваща стабилно прихващане на присадката при автоложна трансплантация е приета стойност от 2x106/kg реципиентско тегло [2, 9]. За успешна процедура на получаване е необходим венозен достъп, който може да поддържа висока скорост на кръвотока между 50 и 100 mL/min [21, 22]. Ако венозният достъп на пациента не осигурява достатъчно стабилен дебит, надвишаващ 30 mL/min, препоръчан от производителите на сепаратори, [23] се стига до промени в работните налягания на входа и изхода на машината, като кръвта на дарителя се подлага на допълнително механично въздействие, увеличаващо риска от хемолиза. Работата на апарата по-често прекъсва и това води до допълнително постъпване на физиологичен разтвор към пациента и машината. В резултат, хематокритът и вискозитетът на обработваната кръв намаляват и се нарушава разслагането на формените елементи и плазмата. Резултатът е по-лош добив на клетки, който се определя като получаване на по-малко от 10x106 CD34+ клетки от литър обработена кръв по време на първата афереза. Женският пол, напредналата възраст и високата скорост на кръвта, несъобразена с теглото на дарителя, са свързани с по-висок риск от лош добив. [23]

Обичайно при една цитафереза се обработват два обема дарителска кръв, а в случай на лоша мобилизация, се извършва афереза на по-голям обем кръв и/или повече от една процедура в два или три последователни дни.

Приблизително 10–20% от пациентите са лоши мобилизатори, т.е. не могат да отделят достатъчно CD 34+клетки в периферията. Лоши мобилизатори са пациенти:

- 1) с голям брой предхождащи курсове химиотерапия (високата кумулативна доза на цитостатиците води до по-лоши регенеративни възможности на костния мозък)
- 2) получили облъчване, особено на тазовата област
- 3) в по-напреднала възраст

4) с миелом.

При тях се използва антагонистът на рецептора CXCR4 плериксафор [18], който намалява свързването на стволовите клетки със стромата в костномозъчната ниша и улеснява излизането им в периферната кръв. Препаратът се прилага в доза 160 до 240 µg/kg венозно или мускулно 6 до 12 часа преди аферезата [2] или 240 µg/kg подкожно вечерта преди аферезата. Ако не се достигне желания добив след първата афереза, прилагането на препарата продължава по същия начин. [18] Ранното включване на плериксафор в мобилизацията на пациенти, при които след преброяване на четвъртия ден от стимулацията с растежен фактор се установяват ниски стойности на CD 34+ клетки, води до по-добри добиви с по-малко аферези и по-малък обем клетъчна суспензия за трансплантация. [24]

Ние сме установили, че добивът на стволови клетки при лоши мобилизатори може да бъде подобрен след допълнително прилагане на растежен фактор в доза 5 µg/kg 1 час след началото на афереза.

Полученият продукт от афереза може да се подложи на допълнителна обработка за редукция на обема, като след това се прелива на реципиента или се замразява.

В сравнение с костния мозък, приложението на ХСК от периферна кръв води до по-бързо възстановяване на хемопоезата [25]. В случаите, когато мобилизацията е неуспешна, стволовите клетки се получават чрез аспирация на костен мозък след приложение на растежен фактор [11, 26].

При лоши мобилизатори се налага обработването на по-големи обеми кръв, като продуктът съдържа по-голямо количество гранулоцити, които са чувствителни към замразяване и могат да предизвикат с цитолизата си нежелани реакции по време на инфузията [27]. Освен това се получават по-големи обеми клетъчна суспензия за замразяване. Това води до повишен риск от обемно натоварване на пациента и нежелани реакции от преливането на гранулоцитите или консерванта диметилсулфоксид (ДМСО).

Най-честите странични явления, свързани с цитаферезата за получаване на ХСК са:

1. рискове от поставянето на периферни игли за достъп (хематом) или централния венозен катетър – хематом, пневмоторакс, хемоторакс, инфекция
2. загуба на еритроцити (по-голяма е загубата при по-нисък брой левкоцити в периферната кръв на пациента) и тромбоцити (приблизително 35% от тромбоцитите от циркулацията на донора остават в аферезния продукт)
3. цитратна токсичност- хипокалциемия (с прояви на парестезии, крампи, удължен QRS комплекс,

аритмии, хипотензия), метаболитни ефекти от излишъка на цитрат в организма.

4. вегетативни реакции като хипотензия, вазогадно гадене/повръщане, бледост, диафореза, втрисане, тахикардия

Стволови клетки от плацентарна кръв

Плацентарната кръв (cord blood) се утвърждава като алтернативен източник на хемопоеични стволови клетки след 1988 година, когато е проведена и първата трансплантация с използването на кордални стволови клетки.

След раждане плацентата, заедно с клампираната пъпна връв, се поставят в специален съд с отвор на дъното, през който пъпната връв увисва. Пъпната връв се почиства с антисептик и се пробожда с иглата към специален сак за получаване, съдържащ антикоагулант, като кръвта се размесва с него. Получената кръв (100-190мл) се подлага на последваща обработка за отстраняване на плазма и еритроцити, изследва се за количество ХСК и стерилност и се замразява. Минималната доза за алогенна трансплантация е 2,5 x 10⁷ ядроносни клетка на килограм телесна маса на реципиента [7] или 1.7 x 10⁵ /кг.т. CD34+ ХСК [7, 28]. Поради малкото количество клетки в единица пъпна връв, ниското ниво на стволови клетки и лимфоцити, периода на прихващане на присадката е по-продължителен, съществува по-голям риск от неуспешно прихващане, развитие на инфекции или рецидив на левкемията. За преодоляване на тези проблеми се използват две или три единици плацентарна кръв с близка съвместимост, осигуряващи по-висока доза на CD34+ и CD3+ клетки. Друг подход е ex vivo култивиране на ХСК от пъпна връв, но на този етап тези клетки са с по-лош потенциал за поселване в костния мозък и за пролиферация [28, 29].

СПЕЦИФИЧНА ОБРАБОТКА НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ ОТ КОСТЕН МОЗЪК И ПЕРИФЕРНА КРЪВ

За предотвратяване на реакция на присадката срещу приемателя (GvHD), особено при непълна съвместимост или хаплоидентични трансплантации, се извършва Т-клетъчна деплеция или положителна селекция на CD34+ стволови клетки. Такава обработка се извършва както на костен мозък, така и на получения чрез афереза на периферна кръв продукт.

В сравнение с костния мозък, периферните стволочетъчни продукти съдържат 1 log повече Т клетки, поради което приложението им при алогенните трансплантации е свързано с по-висока честота и тежест на GvHD [25]. Поради това, при по-малка съвместимост между донор и реципиент,

се налага допълнително извършване на Т-клетъчна деплеция, като минималното прагово ниво за развитие на GvHD, е 1-3x10⁵/kg преляти Т клетки. Има три основни подхода за Т-клетъчна деплеция в трансплантата [30]:

- Негативна Т-клетъчна селекция *in vitro* (прилагане на цитостатици, моноклонални антитела с различна специфичност, лектини, аглутинация чрез образуване на розетки с овчи еритроцити, противопоточна елутация)
- Позитивна CD34⁺ селекция
- *In vivo* Т-клетъчна деплеция в перитрансплантационния период (ATG, Campath)

Поради по-високия риск от неуспешно прихващане или отхвърляне на присадката [31, 32], рецидив на болестта [33, 34] и повишен брой на инфекции в посттрансплантационния период [35], Т-клетъчната деплеция не намалява значително смъртността след алогенните трансплантации независимо от понижената честота от GvHD.

Тъй като в патогенезата на GvHD основна роля играят наивните, CD45RA⁺ Т лимфоцити [36], възможен изход е селективното им отстраняване при запазване на паметовите CD45RO⁺ Т лимфоцити, които не причиняват GvHD, но осигуряват защита към инфекциозни патогени [36, 37].

СЪХРАНЕНИЕ НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Хемopoетичните стволови клетки са с интензивен метаболизъм, поради което срокът за съхранение им при хладилни условия е кратък. В момента няма стандартизирано време за продължителност на съхранение в хладилни условия, а температурния диапазон е сравнително широк (2-24°C) [38, 39]. Различни проучвания показват, че при температури между +4°C и +8°C хемopoетични стволови клетки могат да се съхраняват до 5 дни, като след това жизнеността им намалява [13, 40, 41].

Продължителното съхранение на хемopoетичните стволови клетки е възможно само ако те се замразят. Това се налага при почти всички автоложни трансплантации и при част от алогенните. При някои алогенни трансплантации чрез замразяване се съхраняват и лимфоцити за донорни инфузии за поддържаща или адювантна имунотерапия след трансплантация. Замразените клетки се съхраняват в механични фризери при температура -80°C или в парите и/или течната фаза на течен азот при температури между -135°C и -196°C. Продължителността на съхранение при -80°C може да бъде поне 3 години [42], а при -196°C – с десетилетия [43, 44]. Преди замразяването клетъчния продукт от костен мозък или периферна кръв се концентрира и се смесва с криопротективен разтвор, най-често съдържащ диметилсулфоксид

(ДМСО), в различни комбинации с плазма, получена заедно с ХСК от донора, есенциална среда, човешки албумин или други извънклетъчни криопротектори. Често използван разтвор е 20% ДМСО с автоложна плазма или разтвор на човешки албумин, хепарин или минимална есенциална среда. Смесват се равни обеми криопротективен разтвор и клетъчна суспензия. При тази методика смесването трябва да става много бавно, капково, при температура близка до 0°C. Крайната концентрация на ДМСО в разтвора е 10 %. Има тенденция за намаляване на крайната концентрация на ДМСО в замразяваната клетъчна суспензия [45], с цел намаляване на токсичните ефекти върху замразяваните клетки и на нежеланите реакции при инфузията на ХСК след размразяване. След смесване с криопротективния разтвор, клетъчната суспензия се поставя в пластмасови криосакове и се замразява с програмен замразител или неконтролирано (престой на клетките около 24 ч на температура -80°C между стиропорови плоскости, последвано от прехвърляне в контейнер в течен азот) [46].

Основавайки се на протоколи за замразяване с по-ниска концентрация на ДМСО [48, 54, 55], ние подлагаме клетките на неконтролирано замразяване и съхранение във фризер при температура -80°C в криопротективен разтвор с 5% ДМСО, хидроксиетилскорбяла и хуман албумин.

Преди да се извърши кондиционирането на пациента, подлежащо на трансплантация, е необходимо да се провери жизнеността на замразените стволови клетки. Обикновено се използват предварително отделени сателитни проби от клетъчната суспензия, които са замразени и съхранявани заедно с нея.

Жизнеността на клетките се проверява с различни методи – оцветяване с трипаново синьо, колониообразуващи тестове върху метилцелулоза, при които се броят образуваните гранулоцитни, макрофажни или еритробластни колонии след добавяне на подходящи растежни фактори и култивиране за 10-15 дни.

Според броя на получените колонии може да се изчисли броят на колониообразуващи клетки в замразения материал. За успешна трансплантация е прието, че са необходими 10 000 до 20 000 CFU-GMs (гранулоцит – макрофажни колонии) на килограм тегло [10].

Бърз и лесен метод за определяне на виталност, е оцветяването с трипаново синьо. Този метод се основава на способността на живите клетки да изхвърлят боята от цитоплазмата си. Изброяват се 100 клетки в отдалечени зрителни полета, като броят на неочетените дава процента на живи клетки [47].

Когато се установи, че съхраняваните клетки са с добра жизненост, се пристъпва към подготовката (кондиционирането) на пациента. След провежда-

нето на химиотерапията и/или целотелесното облъчване, в определен ден замразените стволови клетки се размразяват на водна баня 37°C и се преливат венозно. Тъй като ДМСО е токсичен за клетките при стайна температура [48], те трябва да се прелеят незабавно след размразяването със скорост 10-16 мл/мин през система без филтър или с максимално голям размер на порите на филтъра. В случай на странични реакции от пациента по време на преливането на клетките, инфузията се прекъсва или се забавя, а следващите сакове с клетки не се размразяват докато не се овладее състоянието на пациента. Най-честите реакции към ДМСО са: зачервяване, тахикардия, аритмии хипо- или хипертония, алергични реакции, задух, дразнеща кашлица, намален дихателен капацитет, хемолиза, а в редки случаи гърчове и кома [49-53]. С нарастване на концентрацията на консерванта нараства честотата и тежестта на тези реакции. [45] За избягването им, на пациента се прилага премедикация с кортикостероиди, антихистамини и парацетамол 1 час преди инфузията. Ако това не е достатъчно и настъпи реакция, инфузията се забавя или прекъсва, прилагат се допълнително антихистамини, кортикостероиди или други симптоматични средства, след което остатъкът от размразената суспензия се влива. Ако има следващ сак с клетки за преливане, размразяването и вливането му се отлага до овладяване на симптоматиката.

ОБОБЩЕНИЕ

Като източници на хемопоеични стволови клетки се използват костен мозък, периферна кръв и пъпна връв. Макар, че се използва значително по-рядко, костният мозък все още е предпочитан източник на ХСК при определени ситуации (апластична анемия, по-малка съвместимост между донор и реципиент), като за осигуряване на по-високи добиви и по-бързо прихващане на присадката се използва стимулация с растежни фактори. Все повече като основен източник се налага периферната кръв след мобилизация с G-CSF – самостоятелно или през възстановителния период след високо дозова химиотерапия. Един от основните проблеми за получаването на ХСК от периферна кръв – лошата мобилизация, може да бъде преодолян с употребата на антагониста на рецептора CXCR4 плериксафор. Нашият опит показва, че допълнителната апликация на G-CSF до 2 часа от началото на цитаферезата при лоши мобилизатори, подобрява крайния клетъчен добив. Пъпната връв е лесно достъпен източник, който не носи риск за донора, но ниските дози нуклеарни и CD34+ клетки затрудняват и забавят прихващането на присадката. За ускоряване на прихващането се използват няколко единици кордални клетки от различни донори.

При лоши мобилизатори, повишеният обем стволови клетки от афереза, които трябва да се замразят, води до нарастване на общата доза диметилсулфоксид която се влива на пациента, а с това и рискът от нежелани реакции. За намаляване на нежеланите реакции във все повече трансплантационни центрове се използва криопротективен разтвор, в който се използва по-ниска концентрация на ДМСО. За да се запази клетъчната жизнестойност на ХСК при замразяване с по-малко ДМСО, се използват извънклетъчни криопротектори. Основавайки се на протоколи за замразяване с по-ниска концентрация на ДМСО [48, 54, 55], ние подлагаме клетките на неконтролирано замразяване и съхранение във фризер при температура -80°C в криопротективен разтвор с 5% ДМСО, хидроксипетилкорбяла и хуман албумин. Нежеланите реакции по време на преливането им, когато се наблюдават такива, се свеждат най-често до, сухота в гърлото, кашлица и гадене.

Адрес за кореспонденция

д-р Иван Тонев,

Отделение за трансплантация на стволови хемопоеични клетки, НСБАЛХЗ - ЕАД,
ул. Пловдивско поле 6, София – 1756,
тел. : +3592 970 12 27; +359 879 104 947;

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

ХСК -хемопоеични стволови клетки

GvHD- graft versus host disease; болест на присадката срещу приемателя

ДМСО – диметилсулфоксид

G-CSF – Granulocyte colony stimulating factor (гранулоцитен колония – стимулиращ фактор)

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Wodnar-Filipowicz, Biological properties of haematopoietic stem cells. 6 ed. The 2012 revised edition of the EBMT-ESH Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation. 2012.
2. Munker, R., The BMT Data Book Including Cellular Therapy. 3 ed. Vol. 1. 2013: Cambridge University Press. 1-6.
3. H Baldomero, M.G., A Gratwohl, A Tichelli, D Niederwieser, A Madrigal and and K. Frauentorfer, The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. Bone Marrow Transplantation, 2011. 46: p. 485-501.
4. Appelbaum, F.R., Hematopoietic-Cell Transplantation at 50
doi:10.1056/NEJMp078166. New England Journal of Medicine, 2007. 357(15): p. 1472-1475.
5. WBMT. 1 millionth blood stem cell transplant marks major medical milestone. Jan. 30, 2013; Available from: <http://www.wbmt.org/en/general-information-by-laws-presentations/one-million-transplants/>.
6. Passweg, J.R., et al., Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. Bone Marrow Transplant, 2014. 49(6): p. 744-750.
7. Gluckman, E., Choice of the donor according to HLA typing and stem cell source in The 2012 revised edition of the EBMT-ESH Handbook on Haematopoietic Stem Cell Transplantation, E.C. J. Apperley, E. Gluckman, T. Masszi, Editor. 2012. p. 90-107.
8. Anasetti, C., et al., Peripheral-Blood Stem Cells versus Bone Marrow from Unrelated Donors. New England Journal of Medicine, 2012. 367(16): p. 1487-1496.

9. Marshall A. Lichtman, T.J.K., Uri Seligsohn, Kenneth Kaushansky, Josef T. Prchal, Williams Hematology, Eighth Edition. 2010. Ch. 75.
10. Минчев, М., Вземане, обработка и съхранение на човешки хемопоеитични стволови клетки. Трансфузионна хематология, ed. Т. Лисичков. 2003, София.
11. D. Longo A. Fauci, D.K., S. Hauser, J. Jameson, J. Loscalzo, Hematopoietic Cell Transplantation, in Harrison's PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE. 2012.
12. Storb R, P.R., and Thomas ED, Marrow transplantation for treatment of aplastic anemia. An analysis of factors associated with graft rejection. *N Engl J Med*, 1977. 296: p. 61-66.
13. V Antonenas, F.G., M Webb, M Sartor, KF Bradstock and D Gottlieb, Fresh PBSC harvests, but not BM, show temperature-related loss of CD34 viability during storage and transport. *Cytotherapy*, 2006. 8: p. 158-165.
14. Grupp, S.A., et al., Use of G-CSF in matched sibling donor pediatric allogeneic transplantation: a consensus statement from the Children's Oncology Group (COG) Transplant Discipline Committee and Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium (PBMTTC) Executive Committee. *Pediatr Blood Cancer*, 2006. 46(4): p. 414-21.
15. Effenbein, G.J. and R. Sackstein, Primed marrow for autologous and allogeneic transplantation: a review comparing primed marrow to mobilized blood and steady-state marrow. *Exp Hematol*, 2004. 32(4): p. 327-39.
16. Huang, X.J., et al., Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. 15(2): p. 257-65.
17. GE Switzer, J.G., MA Dew, EC Graeff and J Hegland, Donating stimulated peripheral blood stem cells vs bone marrow: do donors experience the procedures differently? *Bone Marrow Transplantation*, 2001. 27: p. 917-923.
18. To L.B., J.-P.L., Jean-Pierre Levesque, Kirsten E. Herbert, How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood*, 2011. 118(17): p. 4530-4540.
19. Ringden, O., Faster engraftment of neutrophils and platelets with peripheral blood stem cells from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2000. 25, Suppl. 2: p. S6-S8.
20. Schots, R., et al., The absolute number of circulating CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. *Bone Marrow Transplant*, 1996. 17(4): p. 509-15.
21. O'Leary, M.F., et al., Venous access for hematopoietic progenitor cell collection: An international survey by the ASFA HPC donor subcommittee. *Journal of Clinical Apheresis*, 2016. 31(6): p. 529-534.
22. Minniti, S.C.a.F., Vascular Access, in *The EBMT Handbook Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies. EBMT and the Author(s)* 2019.
23. Wang, T.-F., et al., Factors Associated with Peripheral Blood Stem Cell Yield in Volunteer Donors Mobilized with Granulocyte Colony-Stimulating Factors: The Impact of Donor Characteristics and Procedural Settings. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2008. 14(11): p. 1305-1311.
24. Sánchez-Ortega, I., et al., Plerixafor in patients with lymphoma and multiple myeloma: effectiveness in cases with very low circulating CD34+ cell levels and preemptive intervention vs remobilization. *Bone Marrow Transplantation*, 2014. 50: p. 34.
25. D. Longo A. Fauci, D.K., S. Hauser, J. Jameson, J. Loscalzo, Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th ed. 2012.
26. A. Victor Hoffbrand (Editor), D.C.E., Edward G. D. Tuddenham (Editor), *Postgraduate Haematology*. 5 ed. 2008: Wiley-Blackwell. p 4.
27. Zambelli, A., et al., Clinical toxicity of cryopreserved circulating progenitor cells infusion. *Anticancer Res*, 1998. 18(6b): p. 4705-8.
28. Broxmeyer, H.E., *Cord Blood: Biology, Immunology, And Clinical Transplantation*. 1st ed. 2004: American Association of Blood Banks (AABB). 455.
29. MN Ferná'ndez, A.G.e., I Milla'n, C Regidor, R Cabrera, S Querol and J Garcí'a, Evaluation of engraftment of ex vivo expanded cord blood cells in humans. *Bone Marrow Transplantation*, 2000. Suppl. 2: p. S61-S67.
30. Frederick R. Appelbaum, S.J.F., Robert S. Negrin, Karl G. Blume, Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation: Stem Cell Transplantation. 4 ed. 2009.
31. Delain M, C.J., Racadot E, et al., Graft failure after T cell depleted HLA identical allogeneic bone marrow transplantation: risk factors in leukemic patients. *Leuk Lymphoma*, 1993. 11: p. 359-368.
32. Martin PJ, H.J., Torok-Storb B, et al. Bone Marrow Transplant., Graft failure in patients receiving T cell-depleted HLA identical allogeneic marrow transplants. 1988. 3: p. 445-56.
33. Goldman JM, G.R., Horowitz MM, et al., Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*, 1988. 108: p. 806-814.
34. Martin P, C.R., Fisher LD, et al., HLA-identical marrow transplantation during accelerated-phase chronic myelogenous leukemia: analysis of survival and remission duration. *Blood*, 1988. 72: p. 1978-1984.
35. Ho, V.T. and R.J. Soiffer, The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2001. 98(12): p. 3192-204.
36. Teschner, D., et al., Depletion of naive T cells using clinical grade magnetic CD45RA beads: a new approach for GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant*, 2014. 49(1): p. 138-144.
37. Bleakley, M., et al., Engineering Human Peripheral Blood Stem Cell Grafts that Are Depleted of Naive T Cells and Retain Functional Pathogen-Specific Memory T Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplant*, 2014. 20(5): p. 705-716.
38. FACT-JACIE. FACT-JACIE International Standards for Cellular Therapy Product Collection, Processing, and Administration Accreditation Manual. 2012[cited 2013; 5:].
39. Hutchins, D.C., R. Fisher, and S. Gordon. World Marrow Donor Association (WMDA) Guidelines for couriers and the transportation of hematopoietic progenitor cells (HPC-BM, apheresis and therapeutic cells- T Cells). 2011; 5:5:].
40. Hechler G, W.R., Heymanns J, Koppler H, Havemann K., Storage of noncryopreserved peripheral blood stem cells for transplantation. *Ann Hematol*, 1996. 72([PubMed: 8645742]): p. 303-306.
41. Ruiz-Arguelles GJ, R.-A.A., Perez-Romano B, Marin-Lopez A, Larregina-Diez A, Apreza-Molina MG, and L.C.d.P. Source Centro de Hematología y Medicina Interna de Puebla, Mexico., Filgrastim-mobilized peripheral-blood stem cells can be stored at 4 degrees and used in autografts to rescue high-dose chemotherapy. *Am J Hematol*, 1995 Feb. 48(2): p. 100-3.
42. Ayello, J., et al., Effects of long-term storage at -90 degrees C of bone marrow and PBPC on cell recovery, viability, and clonogenic potential. *J Hematother*, 1998. 7(4): p. 385-90.
43. Aird, W., et al., Long-term cryopreservation of human stem cells. *Bone Marrow Transplant*, 1992. 9(6): p. 487-90.
44. Fernyhough, L.J., et al., Relative recovery of haematopoietic stem cell products after cryogenic storage of up to 19 years. *Bone Marrow Transplant*, 2013. 48(1): p. 32-35.
45. Windrum, P., et al., Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant*, 2005. 36(7): p. 601-3.
46. Минчев, М., Консервиране на хемопоеитични стволови клетки, in Трансфузионна хематология, Т. Лисичков, Editor. 2003: София. p. 235-249.
47. Louis, K.S., Andre C, Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods, in *Mammalian Cell Viability*, M.J. Stoddart, Editor. 2011, Humana Press. p. 7-12.
48. Katayama, Y., et al., The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*, 1997. 19(3): p. 283-7.
49. Burger, J., et al., Acute haemoglobinaemia associated with the reinfusion of bone marrow buffy coat for autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1991. 7(4): p. 322-4.
50. Hoyt, R., J. Szer, and A. Grigg, Neurological events associated with the infusion of cryopreserved bone marrow and/or peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplantation*, 2000. 25: p. 1285.
51. Takeda, K., et al., Respiratory Toxicity of Dimethyl Sulfoxide, in *Respirology*, M. Pokorski, Editor. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 89-96.
52. Windrum, P. and T.C.M. Morris, Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 2003. 31: p. 315.
53. Hequet, O., et al., Epileptic seizures after autologous peripheral blood progenitor infusion in a patient treated with high-dose chemotherapy for myeloma. *Bone Marrow Transplantation*, 2002. 29: p. 544.
54. Stiff, P.J., et al., Unfractionated human marrow cell cryopreservation using dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch. *Cryobiology*, 1983. 20(1): p. 17-24.
55. Makino, S., et al., A simplified method for cryopreservation of peripheral blood stem cells at -80 degrees C without rate-controlled freezing. *Bone marrow transplantation*, 1991. 8(4): p. 239-244.

ПСИХОАНАЛИЗА И ХЕМАТОЛОГИЯ

Донкина В.¹, Милчева К., Ганева П., Арnaudов Г.², Спасов Бр.³

1 – Център за психологична и немедицинска грижа,
Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

2 – Отделение за трансплантация на хемопоеетични стволови клетки,
Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

3 – Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

PSYCHOANALYSIS AND HAEMATOLOGY

Donkina V.¹, Milcheva K., Ganeva P., Arnaudov G.², Spassov Br.³,

1 – Non-medical care department, National Hematology Hospital, Sofia

2 – Bone marrow transplantation Unit, National Hematology Hospital, Sofia

3 – National Hematology Hospital, Sofia

Резюме. Текстът представя едно психологизирано разбиране за травматичните и трудни преживявания при сблъсък със злокачествено заболяване на кръвта, преминаването през процеса на лечение и опита за завръщане към нормалния ритъм на живот през призмата на практиката на немедицинската грижа в Отделението за костно – мозъчни трансплантации в Специализираната болница за активно лечение на хематологични заболявания. Подчертава се значението и мястото на този тип подкрепа, както за пациента, така и за екипите, които се грижат за него, предлагайки един различен начин на „мислене“ на пациента, страданието и болестта. Описват се процедурите на създадения за пръв път в болнична среда в България, с изцяло болничен ресурс, Център за психологична и немедицинска грижа.

Ключови думи: психоанализа, психологична грижа, немедицинска грижа, психологичен регрес, криза, травматизъм, център за психологична грижа, костно-мозъчни трансплантации, хематологично заболяване, злокачествено заболяване, немедицинска грижа, психологично консултиране, психоанализа

Abstract. The article presents a psychological approach to the problems of traumatic and difficult emotional experiences in the process of treatment of a malignant disease, the importance of consultation and psychological support in patient's attempt to readapt and go back to standard way of living. It's also presented the practice of non medical care in the Department of bone marrow transplantation in the National Haematology Hospital in Sofia, Bulgaria. Procedures and practices, established in the hospital centre for psychological and non-medical care are described.

Key words: bone marrow transplantations, haematology malignant diseases, non medical care, psychological consultation, psychoanalysis

Пациентите със злокачествени хематологични заболявания, особено онези от тях, които са в терминален стадий, страдат от хронично и смъртоносно заболяване, при което вследствие на потиснатото функциониране на организма поради едно неконтролируемо разрастване на туморните клетки, метафорично сякаш тялото се „лишава“ от неговата способност да „регенерира“, да остава живо. Така пациентите, които срещаме в болницата, често не са там, за да бъдат излекувани, а защото медицината, с нейните непрекъснати достижения, предлага да се отложи смъртта посредством възможностите на научния и технически напредък. Това от една страна прави възможно да бъдат преодолявани медицински състояния, невъзможни за копиране в миналото. От друга обаче, онова, което се случва с личността на човека-пациент е, че той или тя често се оказват в специфичното положение да бъдат „оцеляващи“, „живи-мъртви“, като това е съпътствано от отключването на екстремни травматични психични състояния. Независимо дали са епизодични или хронифицират, особено в боксовете на отделението за транс-

плантации, тези състояния са белязани от тежък регрес, често са делироподобни и много пъти създават в самите пациенти и в персонала усещането за налудност, като в случаите на ремисия на заболяването те се интензифицират, стигайки понякога до деперсонализации, амнестични синдроми, конфабулации и др.

Личността на пациента в хематология се разкрива в пълната си многостранност, уязвимост и стратификация. Тялото много бързо, често в рамките на една хоспитализация, се превръща пред очите на всички – близки, лекари и сестри, психолози, самия пациент – в нещо мимолетно, смътно, изплъзващо се в капана на болестта и лечението, нещо, което трябва да бъде отречено и от което да се разграничим, защото то заплашва да “разруши” илюзията за ненакърнимата човешка идентичност. От латентна, иманентна част на личността, то става, внезапно, подмолно, враг, от когото пациентът трябва да се защитава. От част от личността, то внезапно става “ничие”, един обект на грижа, който вече не принадлежи никому. Това най-ясно се вижда в случаите на exitus – тялото губи своята символична стойност и сякаш “пречи”, “тежи” на всички, “разочарова” всички.

Трансплантацията, когато е показана, дава надежда... или химера?... за пълно възстановяване, за *restitutio ad integrum*, което е опосредствано от човечността и желанието на трети човек. Актът на даряване много често не е едноличен. Т.е. често човек дори не познава донора на клетките, които приема. Освен това в модерната медицина става въпрос за “колективност на драмата”. Това означава, че в действието са включени цяла плеяда хора – лекарите, близките, донора, понякога дори близките на донора. Това действие, подобно на една метафорична старогръцка театрална драма, е координирано от множество различни звена. Между всички тях се споделят, като на сцена, живота и смъртта.

Трансплантацията – едно обещание за биологично възкресение, което ще оздрави тялото и ще премахне зависимостта, всъщност крие в себе си заплахата от неуспех. И това поражда страх, съизмерим по интензивност единствено с тоталната идеализация. В психологичен план, това е един изключително сложен и предизвикателен процес, който продуцира интензивен емоционален и психичен регрес. На пациента винаги се казва, че опасността от рискове, е различна. Но тя, т.е. смъртта, е налична. Винаги. И е там, в изолирания стерил бокс на пациента, всеки ден. И всеки ден всички – пациентът, лекарите, сестрите, санитарите, често и психолозите, се опитват да не я виждат.

На този фон, психологичната работа често представлява нещо между присъствие и разговор, обособяване на едно пространство някъде там – между аспектите на силен афект и откъслечна реч. Нейният опит е да “удържи” интензивни-

те емоционални преживявания и да подпомогне превръщането им в думи. Думите имат смисъл и вербализирането на афективния опит е свързано винаги с един първичен процес на мисловна преработка. По този начин връщането към думите всъщност представлява интегрирането на този опит.

Откъде се поражда афектът? Усещането за “живот” е налично у човешкото същество дори при тежък травматизъм, свързан с ограничаване на моториката или загуба на част от тялото. Изслушванията на наративите, на думите на пациенти, говорят, че те страдат, но категорично се усещат живи. В човешкия психичен механизъм, казва Долто / Dolto, Fr., 1998 /, не съществува представна схема, свързана със смъртта. Това налага продуцирането на множество фантазми. Така да се озовеш между живота и смъртта е винаги особено преживяване, което не оставя безразличен никого. Смъртта като потенциален изход е нещо трудно за мислене, провокиращо тревожност, нетърпимост или гняв. Изглежда най-голямата криза по време на лечението в бокса в Отделението за трансплантации, е свързана с реалната заплахата и присъствието на свидетелства от реалността за нещо, което човешката психика не е в състояние да обработи. Затова, на практика, всички психологични подходи за работа с терминално болни пациенти, с пациенти със злокачествени заболявания, с хронично боледуващи хора, с пациенти с КМТ и изобщо – хора, при които съществува висок риск за живота или цялостта на тялото и неговото благосъстояние, са свързани по един или друг начин с опита да бъде асистиран този процес на тежък психологичен регрес и да се предостави удържане, посредством което това ужасяващо и неназовимо страдание да бъде преработено и сублимирано.

Всички тези компоненти правят прилагането на психологичната грижа и въпросът за нейното структуриране, многопластов и труден. От една страна, тя е насочена към пациента и неговите близки. От друга, тя би трябвало да подкрепи медицинските екипи, работещи под непрекъснатия натиск на неизвестност, неимоверно непосилните проецирани очаквания за магични решения и съпътстващи идеализации / много пъти дори лични, на самите лекари, не само идващи от страна на пациента /. Понякога те се проявяват особено силно към конкретен член на екипа. При евентуален неуспех той ще трябва да понесе тоталния негативизъм и отрицания, обвинения и дисквалификация. Пациентите се “вкопчват” в своя лекар, във водещата сестра, когато разпознават като “своя човек” и покровител в хаоса на редуваща се омраза и любов – винаги тотални, на директно провокираните от тях жестокост и желание за живот.

Освен неимоверната тежест на този натиск, медицинските екипи са натоварени и с личното бреме

на усещането за безпомощност и неуспех пред болест, която понякога не се лекува... Болест, която разколебава вярата, че медицината е една чудесна наука, която владее живота и спасява от всичко.

При толкова тежка психосоматика вече става въпрос не за символична, метафорична смърт, а за реално премахване, за реална смърт. Всичко е директно, всичко е буквално. Тук, в отделението за трансплантации, невротичното "Ох, идва ми да умра", което психоаналитиците често чуват в кабинетите си, се случва директно. Наистина. Без да има нещо, което да се сложи между хората и него като параван. Това поставя в непрекъснат и несъзнат ужас всички – близките, пациентите, лекарите, психолозите, представителите на фармацевтичната индустрия и провокира динайл, като единственият възможен начин да оцелееш.

Оставяйки се известно време да наблюдаваме и мислим всичко това, опитвайки различни начини да приложим съвместно своята професионална експертиза, идваща от две различни научни сфери, с общ обект – човека, но с радикално различен позход към него, в крайна сметка начина, по който организирахме психоаналитичната работа в отделението за трансплантации, беше опит да се върнем към смисъла на думите, говоренето и езика. Език, в който се срещаме между медицината и психоанализата, някъде в наративите на човешките истории и да се опитаем "даването на смисъл" да се превърне в "правило", в стандарт.

Тук става дума за едно непрекъснато придружаване – от постъпването в отделение-то, през срещата в бокса, този преходен дом, лекарите, сестрите, санитарите, първите процедури, посещението на психолога. Обикновено то се случва последно, въведено през думите на лекаря, който е представил случая на психолога и е споменал за психолога на пациента. Понякога това посещение се случва дори на следващия ден, като така даваме възможност чувствата да имат време и място и да бъдат първо преживяни, а след това, в едно скринигово първо интервю, адаптирани, осмислени, доколкото е възможно, интегрирани.

Тази първа среща е опит да се "очовечава" изпълненото със зловещи очаквания постъпване в болницата и да се асистира прехода към идващият нелек месец – както за тялото и съзнанието на пациента, така и за всички останали. В тези моменти ние знаем, че започваме връзка, чиито развой за всички все още е неясен.

Скриниговото начално интервю, конструирано в принципите на клиничните полуструктурирани интервюта, всъщност прави оценка на психологичното функциониране на пациента, проследявайки базисни клинични маркери, в контекста на една човешка история. За психолога още тук е ясно каква вероятност от кризи и какви по интензивност

и качество ще бъдат те, кои биха могли да бъдат опорните репери на личността и какъв подход би позволил на пациента да бъде най-успешно асистирани. Често тук става ясна цялата фамилна анамнеза, наред която се случва болестта.

Всеки пациент преминава след това освен през едно проследяващо консултиране, което се съставя от срещи, инициирани от него или психолога, а понякога и от лекарите и сестрите и през още едно проследяващо интервю. Тази организация в протокол позволява на всички въвлечени да имат структура и граници – в близостта, в отношения и подпомага възможността да продължим да мислим. Документацията остава към историята на заболяването на пациента, в неговото медицинско досие, при всички негови документи и изследвания.

В последващите разговори с лекаря, психолога "превежда" своите наблюдения в разказа за една човешка история – тази, от която пациентът идва, защото там можем да се срещнем в човешката точка на пресичане между медицината и психоанализата и да продължим да мислим пациента в контекста на смисъла му за болестта и живота.

Тежките, драматични заболявания, осакатяванията във функционален и двигателен смисъл, предизвикват в нетравматично и „нормално“ функциониращата личност свръхкомпенсации, които в символично отношение обогатяват индивида. Ние просто се нуждаем от цялостта на тялото си и от неговото благосъстояние, то е нашият медиатор в символичната ни връзка с другите и света. Когато тази цялост или това благосъстояние е нарушено, ние се нуждаем от нечие присъствие и нечий думи, които да подпомогнат различното преживяване за нашата изгубила безупречното си функциониране, за известен период от време или...завинаги, телесна схема. Т.е. ние се нуждаем от това да можем да изживяваме своя образ на тялото по символичен и различен начин. Защото, когато става въпрос за личността, за нейния символичен живот и за отношенията ѝ с другите, нито едно осакатяване, нито една загуба и нито една отделимост на частите на тялото, които на другите се струват от първостепенно значение, не са в състояние да попречат на познатите ни нагони да претърпят промяна, достигания до ново равнище, което наричаме „сублимация“. В процеса на общуване и съзидание те биват използвани по различен начин.

Ние се страхуваме не от самата смърт, защото за несъзнаваното тя не съществува, а от страданието и от раздялата ни с любимите ни същества. Но ние винаги сме били в състояние да преодолеем загубата на част от тялото си, независимо от тежестта ѝ, като я приемем, а също и като придадем допълнителна стойност на тази загуба. Като открием нови възможности за общуване по начин, съвършено различен от този, от който сме били

лишени.

Докато сме живи, надеждата да общуваме с другите няма да умре. „Докато съм жив, ще се надявам“ гласи поговорката. На какво се надяваме? На общуването с другите. Затова когато някой ви говори за своята евентуална смърт, ние трябва да го изслушаме, независимо дали смятаме, че той има основания да мисли/иска да умре или се заблуждава. Вероятно можем да му кажем, че със сигурност всички ще умрем – така, както казваме на децата. Вероятно можем да прибавим, че лекарите не смятат, че това ще се случи толкова скоро или че всъщност никой не би могъл да предвиди. Да бъдат казани или чути такива думи никога не е просто. И никога не е лесно. Това е въпрос на едно човешко осмеляване и съпричастност. Да се асистира процесът всички чувства и преживявания да бъдат „метаболизирани“, интегрирани, осмислени и преживяни, за да се стигне до тези думи, е всъщност същината на психоаналитичната работа и единственият начин на психоанализата и немедицинската грижа да бъде в подкрепа на лекарите, пациентите и екипите, които настояват на възможността да има живот в онези точки, отвъд чиито предел резултатът все още не е ясен.

Адрес за кореспонденция

Д-р Велислава Донкина,
Център за психологична и немедицинска грижа
СБАЛХЗ – ЕАД, София
Ул. Пловдивско поле 6, п.к. 1756
v.donkina@hematology.bg

Correspondence address:

Velislava Donkina, PhD
Centre for psychological and non- medical care
National haematology hospital, Sofia
Plovdivsko pole, Str, 6 – 1756
v.donkina@hematology.bg

БИБЛИОГРАФИЯ

- 1.Богданова, М., /2019/, „От феталната болка до страданието на възрастния“, Дни на психологичната помощ в болнична среда, ISBN 987-619-7196-50-4
- 2.Донкина, В.,/2017/, „Психологична подкрепа в посттрансплантационния период“, VI Национален симпозиум „Млад хематолог“, Хасково
- 3.Долто, Фр.,/2006/, „Всичко е език“, София, Колибри
- 4.Долто, Фр.,/2019/, „Да говорим за смъртта“, София, Колибри
- 5.Aragno, A., Transforming Mourning: A New Psychoanalytic Perspective on the Bereavement Process. Psychoanal. Contemp. Thought, 26:427-462, 2003
- 6.Balint, M., Psycho-analysis and medical practice. Int. J. Psycho-Anal., 47, 54-62, 1966
- 7.Barracough, J., Cancer and Emotion: A Practical Guide to Psycho-oncology, John Wiley & Sons, 26.01.1999
- 8.Böhmer, M.W., „Communication by impact“ and other forms of non-verbal communication: A review of transference, countertransference and projective identification, Afr J Psychiatry 2010; 13:179-183
- 9.Bromberg, P.M., The Difficult Patient or the Difficult Dyad? Some Basic Issues. Con-temp. Psychoanal., 28:495-502, 1999
- 10.Bukberg J, Penman D, Holland JC. Depression in hospitalized cancer patients. Psychosom Med 1984; 46: 199–211

- 11.Cupa, D., Gourdon, M.L., Riazuelo, H., /2004/ Aging process on dialysed patients, Journal of the American Geriatric Society, 52.12
- 12.Ed. Kissane D. et al., Communication in Oncology and Palliative Care, Oxford University Press, 2017
- 13.Hughes, P., Kerr, I., Transference and countertransference in communication between doctor and patient, Advances in Psychiatric Treatment (2000), vol.6, pp. 57-64
- 14.Kathol, R., Gatteau, S.,/2007/ Healing body and mind : a critical issue for health care reform, Praeger 2007 Liegner, L.M., Humanizing the Physician, Mod. Psychoanal., 2:209-215, 1977-78
- 15.McDouall, J. /1989/, Theatres of the body. A psychoanalytic approach to psychosomatic illness, New York, Norton
- 16.Nunberg, H., Psychological Interrelations between Physician and Patient, Psychoanalytic Review, 1938, Vol. XXV., No. 3, pp. 297-308
- 17.Sandler, J., Countertransference and Role-Responsiveness. Int. R. Psycho-Anal., 3:43- 47, 1976

ЗАЩО ДОРИ ФЛОУЦИТОМЕТРИЯТА И МОЛЕКУЛЯРНИЯТ АНАЛИЗ МОГАТ ДА СА НЕДОСТАТЪЧНИ?

Давидкова Я., Балаценко Г., Генова М.

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

WHY EVEN FLOW CYTOMETRY AND MOLECULAR ANALYSIS MIGHT BE INSUFFICIENT?

Davidkova Y., Balatzenko G., Guenova M.

National Hospital of Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Резюме. Трихоловкемията (HCL) е рядко срещана зряла В-клетъчна неоплазия със специфични клинични, морфологични, хистопатологични и имунофенотипни критерии. Протича с индолентен ход и прилагането на лечение с пуринови аналози води до трайни ремисии и обща 10-годишна преживяемост >90%. Въпреки това честотата на вторични неоплазии при трихоловкемии варира между 2-31%. Представяме клиничен случай с едновременно ангажиране на костния мозък от трихоловкемия и метастаза с неясен първичен произход.

Ключови думи: трихоловкемия, BRAF V600E мутация, карцином с неизвестно първично огнище

Abstract. Hairy cell leukemia (HCL) is a rare mature B-cell neoplasm, which is characterized by specific clinical, morphological and immunophenotypic features. Due to the indolent course of the disease and the treatment with purine analogues, patients achieve durable remissions and the 10-year overall survival is beyond 90%. Nevertheless, the incidence of secondary malignancies in hairy cell leukemia varies between 2-31%. We present a clinical case of a simultaneous bone marrow presentation of HCL and carcinoma of unknown primary origin.

Key words: hairy cell leukemia, BRAF V600E mutation, carcinoma of unknown primary origin

ВЪВЕДЕНИЕ

Диференциалната диагноза на цитопениите е много широка – от хипердеструкция на зрелите клетъчни елементи до хипопродукция на хемопетични клетки в костния мозък, поради увреда в прогениторите или потискане в резултат на инфилтрация от патологичен процес. Изисква се богат набор от клинични оценки и лабораторни подходи. Съчетанието със спленомегалия насочва диагностичното мислене със значима вероятност към наличие на хематологично заболяване – лимфопролиферативна или миелополиферативна неоплазия. В настоящия момент съществуват специализирани изследвания с висока чувствителност и специфичност, които са в състояние да идентифицират имунофенотипни или молекулярногенетични биомаркери на конкретни нозологични единици в материал от периферна кръв и дават основание да се обсъждат минимално инвазивни подходи за диагностика без необходимост от изследване на костния мозък. Така напр. доказването на мутации в JAK2, MPL, CALR гените допълват

панела от диагностични критерии за установяване на миелополиферативни неоплазии по типа на първична миелофиброза. Идентифицирането на специфичен В-клетъчен имунофенотип с ко-експресия на CD103/CD25/CD11c на практика доказва трихоловкемия, а мутацията BRAF1 V600E лесно може да се установи в проба от кръв и се асоциира с класическата трихоловкемия в около 100% от случаите.

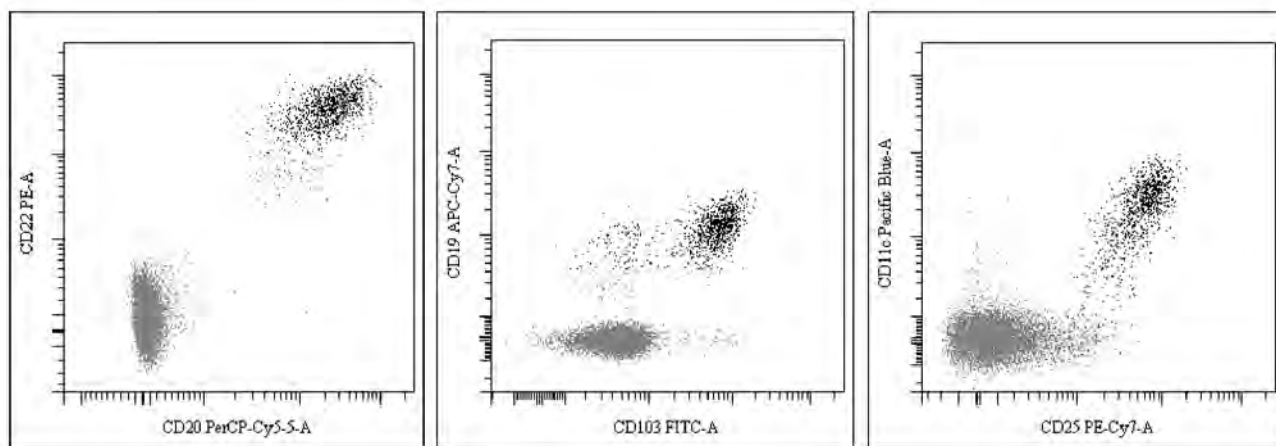
Независимо от това, цитопениите и спленомегалията остават в списъка от индикации за изследване на аспирационен и/или биопсичен материал от костен мозък, което може да предостави незаменна информация за подлежащите патологични процеси. Представяме рядък клиничен случай на пациент с панцитопения, спленомегалия и едновременно ангажиране на костния мозък от две съпътстващи неоплазии.

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ

Представяме пациент от мъжки пол на 48 години,

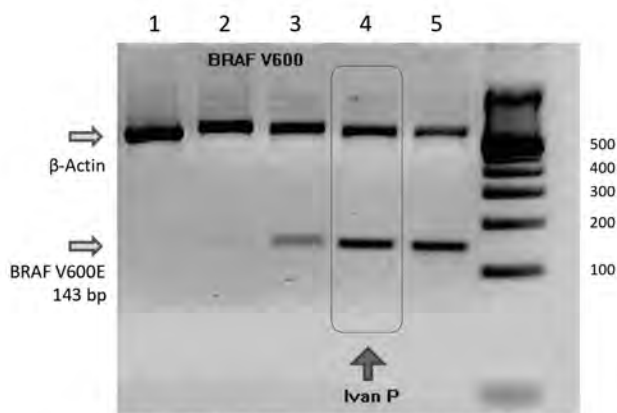
който беше насочен за хематологична консултация с оплаквания от нощни изпотявания, субфебрилитет, редуция на телло и обща слабост. При физикалното изследване беше установена обща бледост и наличие на сигнификантна спленомегалия. Лабораторните изследвания установиха анемия (хемоглобин 90 g/l), тромбоцитопения ($62 \times 10^9/l$), неутропения (абсолютен неутрофилен брой $0,9 \times 10^9/l$), моноцитопения ($0,02 \times 10^9/l$). Лактатдехидрогеназата бе повишена 285 U/l (норма < 220 U/l), като останалите биохимични показатели бяха в референтни граници. Хемограмата се характеризираше с левко-еритробластна картина: еритробласти – 3/100 левкоцита, сегментоядрени неутрофили 44% с олевяване до 1% бласт и 1% миелоцити, 1% моноцити, 53% лимфоцити без особености в морфологията. Проведена беше имунофенотипизация чрез флоуцитометрия на периферна кръв с лимфоидно-насочен панел, която доказа наличие на минимална клонална В-клетъчна популация ($0,08 \times 10^9/l$) с ярка експресия на основните В-клетъчни маркери CD20/CD22 и ко-експресия на CD103, CD25 и CD11c (Фигура 1).

Фигура 1. Флоуцитометрично изследване на периферна кръв (трихोलимфоцитите са оцветени в черно)



Диагностичната хипотеза за класическа трихолекемия беше потвърдена с молекулярно-биологичен анализ, който доказва наличие на BRAF V600E мутация (Фигура 2). Успоредно проведените молекулярни изследвания за изключване на миелопролиферативна неоплазия по типа на първична миелофиброза в диференциално диагностичен план поради наличието на цитопения и спленомегалия показаха липса на JAK V617F, CALR, MPL мутации

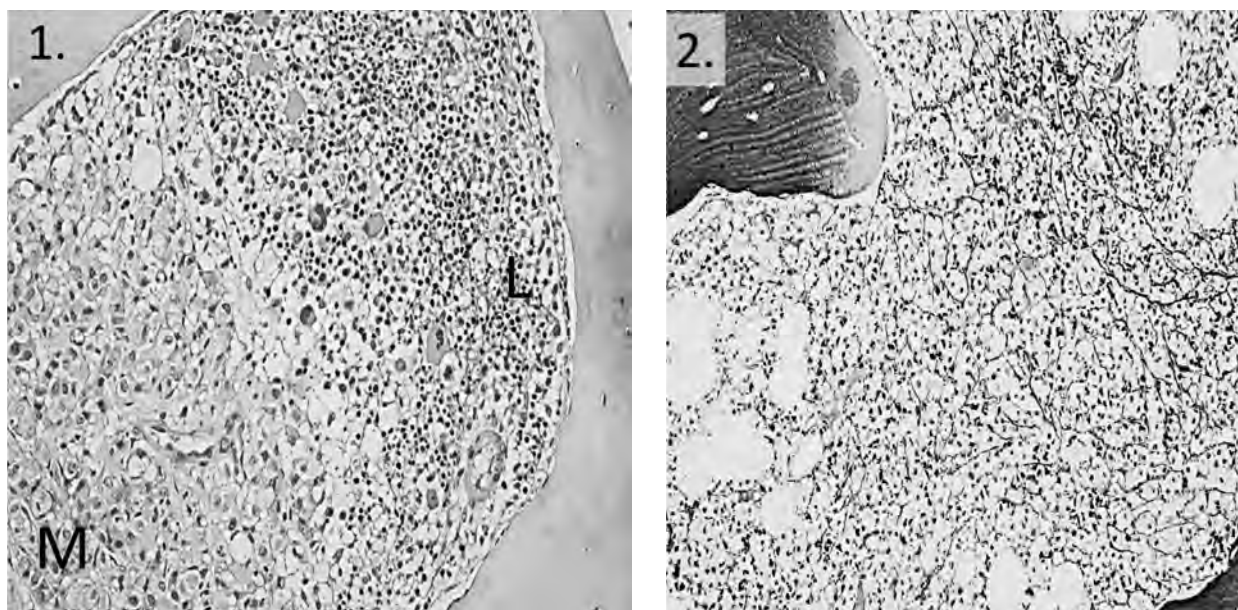
Фигура 2. Доказване на мутация BRAF V600E чрез алел-специфична полимеразно-верижна реакция.



Легенда: [1] Отрицателна контрола [2-3] Други пациенти; [4] Пациент ИЛП; [5] Положителна контрола

Следвайки диагностичния алгоритъм при цитопении и спленомегалия беше предприето костномозъчно изследване. Както се очакваше, миелограмата беше неуспешна. Хистологичното изследване на биопсичен материал от костен мозък показва хиперцелуларитет и потвърди наличието на дифузна инфилтрация от морфологично зрели лимфоиди с В-клетъчен фенотип – CD20(+) CD19(+) CD22(+), с характерен „килийчест“ начин на разположение всред умножена ретикулна мрежа (MF=1-2 по скала 0-3), но само в част от лакуните. Останалите лакуни бяха засегнати от обширни инфилтрати от атипични епителни клетки с гнезден и солиден начин на растеж, на места формиращи тубуларни структури и атипични жлези, които при имунохистохимичното изследване демонстрираха отчетливо положително маркиране за Cytokeratin AE1/AE3, тиреоиден транскрипционен фактор – 1 (TTF-1) и неврон специфична енолаза (NSE), при негативно имуномаркиране на туморните клетки за меланоцитния маркер HMB45. Колатералната костномозъчна биопсия потвърди находката – едновременно ангажиране от В-клетъчен лимфом по типа на трихолекемия и метастаза от умерено диференциран аденокарцином с неясен първичен произход (Фигура 3).

Фигура 3. Трепанобиопсия с (1) едновременно ангажиране от космато-клетъчна левкемия (L) и метастаза от аденокарцином (M); (2) на фона на умножена ретикулна мрежа



Изследванията продължиха за доказване на произхода на метастатичния процес. Изследването на туморни маркери установи повишени нива на карцино-ембрионален антиген (CEA – 185.73ng/ml). За съжаление, проведените детайлни конвенционални и хибридни образни изследвания не насочиха към първичното огнище на карцинома. Сцинтиграфските и СПЕКТ/КТ предоставиха данни за смесен тип генерализиран метапластичен процес в костите.

След консултация с екип по медицинска онкология беше взето решение за палиативно лечение – приложение на α -интерферон, симптоматично и заместително лечение. След месец панцитопенията се задълбочи, появиха се оплаквания от болка по хода на гръбначния стълб и крайниците, по повод на които беше проведена палиативна лъчетерапия. Състоянието на пациента прогресивно се влошаваше, установи се хеморагична диатеза и белодробен застой. Два месеца след поставяне на диагнозата беше регистриран летален изход.

ОБСЪЖДАНЕ

Космато-клетъчната левкемия е рядко срещана В-клетъчна неоплазия, която се извява с периферни цитопении и спленомегалия и се характеризира с индолентен ход. Диагнозата се основава на комплексна оценка от морфологично изследване, флуоцитометрична имунофенотипизация на В-клетъчната популация в периферна кръв или костномозъчен аспират, трепанобиопсия с имунохистохимия, молекулярно изследване на мутации на BRAF гена, данни от физикални и образни изследвания за спленомегалия и изключително рядко – лимфаденомегалия. Изглежда примам-

ливо да се постави диагнозата трихолевкемия възможно най-неинвазивно. Трихолимфоцитите могат да бъдат установени микроскопски, както и да се идентифицират имунофенотипно в 92% от случаите, дори когато клетките са по-малко от 1% от циркулиращите лимфоцити. Новите молекулярни и фенотипни подходи ни предоставят възможност за надеждна диференциална диагноза с други хематологични заболявания с припокриващи морфологични и имунофенотипни белези като спленален маргиналнозонов лимфом и трихолевкемия-вариант. Трихолимфоцитите се характеризират с експресия на В-клетъчни маркери и CD103, CD25, CD11c, докато В-клетките при HCLv обикновено не експресират CD25, а CD103 е негативен при маргиналнозонови лимфоми. Въпреки че BRAF V600E мутацията се среща при някои солидни неоплазии, в сферата на хематологичните малигнени заболявания мутацията се смята за високо специфична за класическа HCL и се използва за диференцирането ѝ от други В-клетъчни лимфопролиферативни неоплазии със сходна конституция. Правилната диагноза е от съществено значение за прилагане на ефективно лечение с пуринови аналози, в резултат на което се постигат трайни ремисии и обща 10-годишна преживяемост >90%.

Независимо от отличната прогноза при класическата HCL по отношение на постигането на пълен терапевтичен отговор и дългогодишна обща преживяемост, заболяването е свързано с повишен риск от развитие на вторични неоплазии, които могат да променят съществено прогнозата към неблагоприятна. Честотата на вторични неоплазии при трихолевкемия варира според литературните данни между 2-31%¹⁻³, като се включват както солидни тумори, така и хематологични неоплазии.

Рискът може да се свърже с генетична предиспозиция, инфекциозни агенти, имунни дефекти и имуносупресия, свързана с лимфоидната неоплазия. Пробладават проучванията, които показват развитие на втора неоплазия вторично след диагностициране и провеждано лечение на HCL. Маккар и по-малко, налице са съобщения за синхронно диагностицирани неоплазии, в т.ч. синхронна поява в костния мозък на класическа HCL и метастатичен Меркел-клетъчен карцином (Prakash et al, 2018 ⁴), метастаза от стомашен signet ring-клетъчен карцином (Jovanovic et al, 2011 ⁵), метастатичен BRAF V600E позитивен белодробен аденокарцином (Mitsogianni et al ⁶), папиларен тироиден карцином също позитивен за BRAF V600E мутация (Mohamed et al ⁷).

Описаният от нас клиничен случай представя синхронното диагностициране на класическа HCL и метастази от карцином с неизвестно първично огнище. Карциномите от неизвестно първично огнище (НПО) са хетерогенна група от неоплазии, които се определят от присъствието на метастази без да е възможна локализация на първичния тумор, въпреки проведените специализирани диагностични изследвания. Обхващат около 3-5% от всички малигнени заболявания. Дори при съчетаването на конвенционални и иновативни диагностични подходи, първичното огнище може да бъде открито само в около 40% от случаите ⁸. Карциномите с неустановен първичен произход имат лоша клинична прогноза и ограничена преживяемост.

Случаят подкрепя тезата, че в определени случаи, независимо от високоспецифичните специализирани неинвазивни тестове за диагноза, пълният диагностичен панел, включващ костномозъчно изследване, е оправдан и ни дава не само сигурна диагноза на подозираното хематологично заболяване, но може да ни предостави информация и за сериозни съпътстващи процеси, които на практика да решат клиничния изход.

Адрес за кореспонденция

Яница Давидкова

гр. София, СБАЛХЗ

Ул. Пловдивско поле 6

Phone: +3598 886 189 263

E-mail: yani.tihomirova@gmail.com

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Wing Y. Au, Klasa R, Gallagher R. et al. Second malignancies in patients with hairy cell leukemia in British Columbia: A 20-year experience. *Blood* (1998); 92(4): 1160-1164.
2. Flinn IW, Kopecky KJ, Foucar MK et al. Long-term follow-up of remission duration, mortality and second malignancies in hairy cell leukemia patients treated with pentostatin. *Blood* (2000). 96(9): 2981-86.
3. Cornet E, Tomowiak C, Tanguy-Schmidt A et al. Long-term follow-up and second malignancies in 487 patients with hairy cell leukemia. *Br J Haematol.* (2014); 166(3):390-400.
4. Prakash A, Khalafallah AA Concurrent Hairy Cell Leukemia and Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *Case Rep Oncol Med.* (2018) Vol 2018:1736854
5. Perunicic-Jovanovic M, Djunic I, Tomin D et al. Simultaneous presentation of hairy cell leukemia and metastatic signet ring carcinoma of the stomach diagnosed by bone marrow biopsy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* (2011) May;19(3):279-82.
6. Mitsogianni M, Mitsimponas N, Crespo F et al. Concomitant Non-Small Cell Lung Cancer and Hairy Cell Leukemia in a Patient Harboring BRAF-V600E Mutation in Both Tissues: A Case Report. *Case Rep Oncol.* (2018);11(1):109-113
7. Shehab M, Yassin M, Omri H et al. Concomitant BRAF Mutation in Hairy Cell Leukemia and Papillary Thyroid Cancer. *Blood* 132, no Suppl 1 (2018):5140
8. Zaun G, Schuler M, Hermann K et al. CUP – syndrome – metastatic malignancy with unknown primary tumor. *Dtsch Arztebl Int* (2018); 115: 157-62

ТРОМБОЦИТИ – ФИЗИОЛОГИЯ И ФУНКЦИЯ. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА ТРОМБОЦИТНАТА ФУНКЦИЯ.

Динева Д.

Отделение по лабораторна диагностика
МБАЛ-Национална Кардиологична Болница, София

PLATELETS – PHYSIOLOGY AND FUNCTION. PLATELET FUNCTION TESTS.

Dineva D.

Department of clinical laboratory
National Heart Hospital, Sofia

Резюме. Последните 40 години представляват златна ера в изучаването на тромбоцитната физиология и функция и в приложението на разработените за тази цел тромбоцитни функционални тестове в клиничната практика. Първоначално прилагани за диагностициране на нарушения на кръвосъсирването, тези тестове днес се използват все по-често за мониториране на антитромбоцитната терапия в клиничната практика с цел прогнозиране на тромботичния риск и риска от кървене. Тестовете предоставят възможност за изследване в различни условия – от високо-специализирани лаборатории до point-of-care тестове при леглото на пациента. За разлика от тестовете, които изследват определено количество биомаркер, изследването на функцията оценява динамика на живи клетки, което обуславя специфични проблеми за всяка лаборатория. Тази статия представя най-често използваните тромбоцитни функционални тестове, приложението им в клиничната практика и интерпретацията на получените резултати.

Ключови думи: тромбоцити, тромбоцитна функция, тромбоцитни функционални тестове

Abstract. The past 40 years have been a golden era for the study of platelet physiology and function and the application of platelet function tests developed for this purpose in clinical practice. Initially developed for diagnosis of bleeding disorders, platelet function assays are now increasingly used for monitoring of antiplatelet therapy to predict thrombotic and bleeding risk. Tests provide the opportunity to study the level of platelet activity under different conditions: from a specialized laboratories to point-of-care tests at the patient bedside. Unlike tests that examine a certain amount of a biomarker, function testing evaluates the dynamics of cells, which immediately presents a specific problems for each laboratory. This article presents most commonly used platelet function assays, their application in clinical practice and an interpretation of test results.

Key words: platelets, platelet function, platelets function tests

УВОД

Тромбоцитите са най-малките клетки в кръвообращението с изключително важно участие в редица патофизиологични процеси като тромбоза, хеморагия, възпаление. Описани са за първи път от Osler през 1873 година като дисковидни, самостоятелно циркулиращи в кръвта телца, формиращи агрегати веднага след излизането им от кръвната циркулация. През следващите 140 години фундаменталните характеристики на тромбоцитната физиология са изучени подробно¹, особено през последните 50 години. С развитието на молекулярната биология, протеомиката и геномиката са изучени процесите на сигналната трансдукция, гранулната секреция, цито-скелетната структура.

Публикуват се и първите съобщения за генна терапия при нарушения в тромбоцитната функция^{2,3}.

РЕГУЛАЦИЯ НА ТРОМБОПОЕЗАТА

Основният регулатор на тромбopoезата е тромбopoетина (ТРО) – линейно-специфичен растежен фактор⁴. Синтезира се основно в черния дроб – в хепатоцитите и хепаталните ендотелни клетки, малка част се синтезира и в костномозъчната строма. Стимулира всички етапи на съзряване на клетките-предшественици и диференциацията им в мегакариоцити. Ускорява матurationта на мегакариоцитите и по този начин повишава броя на об-

разувалите се тромбоцити. Други растежни фактори, участващи в тромбопоезата са: SCF, IL-3, IL-6 и IL-11. IL-3 стимулира ранните етапи на съзряване преди полиплоидизацията, а IL-6, IL-11 и SCF регулират тромбопоезата, но само в присъствието на TPO или IL-3.

ОБРАЗУВАНЕ

Тромбоцитите са малки безядрени клетки, произхождащи от цитоплазмата на мегакариоцитите и съдържащи остатъчни количества транспортна РНК и митохондрии. При разпадането на един мегакариоцит се образуват около 2000 тромбоцита. Описани са 3 механизма на тромбоцитно формиране: цитоплазматична фрагментация на демаркационната мембранна система (DMS), пъпкуване на мегакариоцитната повърхност, образуване на протромбоцити

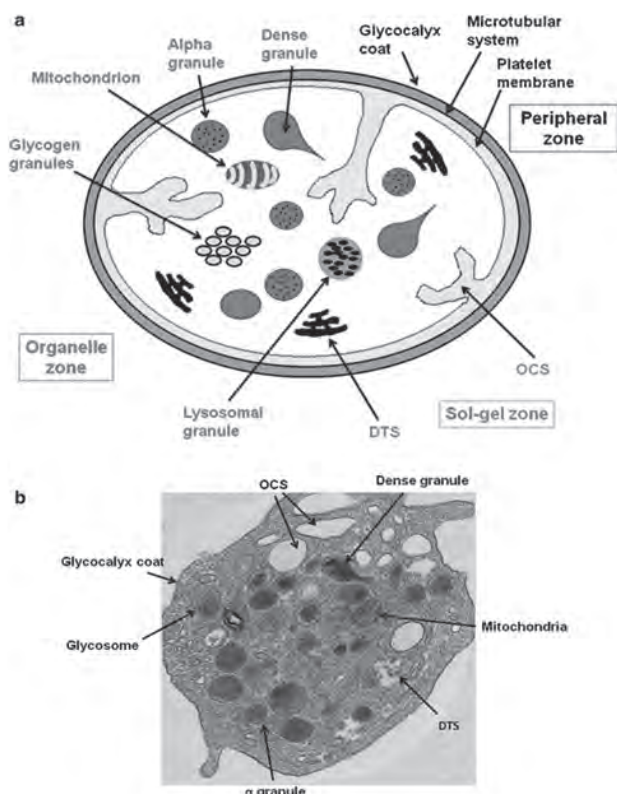
Мястото на формиране е основно в костния мозък. Малка част се формират в кръвообръщението и белите дробове.

СТРУКТУРА

Клетъчната структура се състои от две части – цитоплазма и тромбоцитна мембрана (фиг. 1). В цитоплазмата се разграничават две зони – периферна и централна.

Фиг. 1..Структура на тромбоцита, Emerson M. ,Hydrogen Sulfide and Platelets: A Possible Role in Thrombosis, Handbook of Experimental Pharmacology, book series (HEP, volume 230) 2015.

а. Схематично представяне
в. Електронно-микроскопски изглед



ЦИТОПЛАЗМА – ПЕРИФЕРНА ЗОНА

Съставена е от:

- кръгова микротубуларна система от туболин и тромбоцитен актомиозин, изграждаща опорната структура на тромбоцитите.
- отворена каналикуларна система – многобройни инвагинации на повърхността на тромбоцитите от по-тесни канали.
- плътна тубуларна система – основното място за съхранение на Ca^{2+} .

ЦИТОПЛАЗМА – ЦЕНТРАЛНА ЗОНА

Включва различни органели:

- α – гранули – най-многобройни. Съдържат β -тромбоглобулин, тромбоспондин, фибронектин, тромбоцитен растежен фактор, P-селектин, F V, F VIII:vWF, фибриноген, високомолекулен кининоген, цитокини, плазмени протеазни инхибитори, растежни фактори – тромбоцитен фактор 4, тромбоцит-произведен растежен фактор и други протеини.
- δ – плътни гранули – богати на адреналин, серотонин, епинефрин, Ca^{++} , ADP, ATP
- Енергетични гранули – богати на гликоген.
- Лизозоми – съдържат кисели хидролази, кисели протеази, мембранни протеини.
- Митохондрии – осигуряват енергийния метаболизъм.

ТРОМБОЦИТНА МЕМБРАНА

Мембраната има трипластов строеж- състои се от два белтъчни слоя и един липиден. Фосфолипидите от липидния слой служат за изходен материал за синтез на фактор 3 – тъканен тромбопластин и TxA2, активиращ тромбоцитната агрегация. Гликопротеините от белтъчния слой функционират като рецептори. При неактивните тромбоцити те са разположени във вътрешността на мембраната, при активирането им излизат на повърхността и осъществяват своята дейност .

ТРОМБОЦИТНИ РЕЦЕПТОРИ

Най-важна роля имат следните рецептори:

CD41 (GPIIb/IIIa) –рецептори за фибриноген, фибронектин. Играят централна роля в тромбоцитната агрегация

CD42 (GPIb) – мембранен рецептор за фактора на фон Вилебранд, участващ в адхезията на тромбоцитите към субендотела.

CD51 (GP IIIa) –рецептор за витронектин

CD49b/CD29 (GP Ia/IIa) – рецептор за колаген

CD 49e/CD29 (GP Ic/IIa) – рецептор за фибронектин

CD 36 (GP IV) – рецептор за тромбоспондин

GP V – рецептор за тромбин

Пуринергични рецептори – P2Y1, P2Y12

Активират се от аденинови нуклеотиди, активират фосфолипаза C и регулират активността на аденлат-циклазата. **P2Y1** рецепторът играе важна роля във формирането на тромба, **P2Y12** играе основна роля в стабилизацията на тромбоцитните агрегати, индуцирани от тромбин и тромбоксан A2⁵.

При нормална циркулация фактора на Вилебранд не се свързва с тромбоцитния рецептор. In vitro е необходим антибиотика ристоцетин, за да настъпи свързване на F VIII:vWF към рецептора.

ФУНКЦИИ НА ТРОМБОЦИТИТЕ

I. УЧАСТИЕ В ХЕМОСТАЗАТА

Основната функция на тромбоцитите е участие в хемостазата с четирите основни физиологични отговора при активирането им (от колаген, тромбин, ADP, имунни комплекси):⁶

1. Адхезия

Адхезията е процес на залавяне, прилепване на тромбоцитите към базалната мембрана и колагена на увредения съдов ендотел или чужда повърхност.

2. Контрахирание и промяна във формата

Колагеновите влакна стимулират фосфолипаза A2 в тромбоцитите и увеличават количеството на TxA2. В резултат настъпват промени в клетъчната форма – стават издути, вретеновидни или сферични с дълги псевдоподи, съдържащи новоформиран актинови филаменти.

3. Реакция на освобождаване

Тромбоцитите освобождават извънклетъчно съдържимото на плътните гранули (АДФ, Са йони, сертонин), както и вещества от а-гранулите през отворената навън каналикуларна система. Настъпва повишена експресия на рецепторите за адхезивните протеини – фибриноген, фибронектин, витронектин и фVIII:vWF.

4. Агрегация

При активиране на тромбоцитите се експресират и техните GP IIb/IIIa рецептори на повърхността. Тези рецептори променят формата си и образуват джобове, които контролират свързването на разтворимия фибриноген (Fib) с рецептора и отключват фазата на агрегацията. Агрегацията е процес на коадхезия между два тромбоцита, при който чрез фибриногенови мостове и участието на калциеви йони се образуват микроагрегати. Когато

тромбоцитите са стимулирани, те експресират отрицателно натоварени мембранни фосфолипиди на повърхността си, което, позволява асоцииране на факторите на съсирване и образуване на каталитични ензимни комплекси върху активираната мембранна повърхност.

Променените тромбоцити полепват към вече прилепналите тромбоцити към увреденото място и формират рехавя тромбоцитна запушалка.

II. УЧАСТИЕ В КОАГУЛАЦИЯТА

Втората основна функция на тромбоцитите е участие в коагулацията при:

1. Формиране на съсирека

Тромбоцитен фактор 3, намиращ се интрацелуларно, се отлага по мембраната на тромбоцитите и функционира като повърхност, върху която полепват плазмените фактори на кръвосъсирване. С активиране на коагулационната каскада образуваният се фибрин стабилизира тромба, увлечените еритроцити довеждат до образуването на червен тромб – плътен съсирек, състоящ се от тромбоцити, еритроцити и левкоцити, включени във фибриновата мрежа.

2. Ретракция и лизиране

Вследствие на контрахиране на тромбастенина настъпва ретракция на фибриновия съсирек. Лизирането на съсирека се осъществява от плазмин и от протеолитични ензими, освободени от левкоцитите, включени в съсирека.

3. Възстановяване на увредената съдова стена

Пролиферацията на фибробласти и гладкомускулни влакна, стимулирано от тромбоцитен растежен фактор (PDGF), епидермален растежен фактор (EGF) и фибробластен растежен фактор (FGF) довежда до пълно възстановяване на увредената стена.

НАРУШЕНИЯ В ТРОМБОЦИТНАТА ФУНКЦИЯ

Нарушената тромбоцитна функция може да се изяви като заболяване, свързано с кървене или заболяване, свързано с тромбоза. Кървенето е свързано с нефункциониращи тромбоцити или с наличие на тромбоцитни инхибитори. Нарушенията могат да бъдат вродени или придобити, срещат се по-рядко и се проявяват с “minor bleeding”. Тромбоцитната активация обаче е честа и съпътства разпространени сърдечно-съдови заболявания с ендотелна увреда като МИ, нестабилна ангина, ИМИ⁷.

ТРОМБОЦИТНИ ФУНКЦИОНАЛНИ ТЕСТОВЕ

Тромбоцитните функционални тестове стават част от клинично-лабораторните изследвания още в началото на 20 век. Приложението на тестовите в клиничната практика обхваща четири основни направления:

- I. Доказване на вродени заболявания на функцията на тромбоцитите.
- II. Доказване на придобити нарушения на тромбоцитната функция.
- III. Потвърждаване на адекватна хемостаза след спиране на лечението с цел предотвратяване на риск от периперативно кървене при хирургични интервенции и оценка на нуждата от заместителна трансфузия с тромбоцити. Тестовите намират приложение и в трансфузионната хематология при оценка на функцията на донорски тромбоцити и в тромбоцитни концентрати.
- IV. Контрол на адекватен отговор на лечението с антиагреганти – откриване на оптимална доза или “недостатъчен отговор” / “лекарствена резистентност” или увеличен отговор при пациенти след перкутанна коронарна ангиопластика /ПКА/. Контрол на кървоточивостта или последваща оценка на неуспешна терапия.

I. ВРОДЕНИ ДЕФЕКТИ В ТРОМБОЦИТНАТА ФУНКЦИЯ

Вродените дефекти в тромбоцитната функция (табл. 1) се класифицират в 6 категории заболявания на базата на функцията или отговора, който е нарушен⁹.

Табл. 1. Вродени дефекти в тромбоцитната функция

1. Дефекти в адхезията – нарушения в рецепторите за адхезивни протеини	– Болест на von Willebrand (GPIb-vWF) – Синдром на Bernard-Soulier (GP Ib/IX/V)
2. Дефекти в агрегацията	– Тромбастения на Glanzmann GPIIb-IIIa (αIIbβ3)
3. Дефекти в активацията – нарушения в рецепторите за разтворими агонисти	- Циклооксигеназни дефекти (ASA)-- ТвХА2 рецептор – Дефекти в P2Y12 рецепторите – α2 адренергични рецепторни дефекти
4. Нарушения, свързани с екзоцитоза на гранулите и сигнално-трансдукционния път	- нарушения в δ-гранулите -δ- дефекти в съхранението (SPD): синдром на Hermanski-Pudlak, синдром на Chediak-Higashi, синдром на Wiskott – Aldrich, тромбоцитопения с липса на радиална кост – нарушения в α-гранулите: синдром на сиви тромбоцити, синдром на бели тромбоцити, Quebec синдром, Medich синдром. – нарушения в δ- и α-гранулите - дефекти в образуването на ASA/TBXA2 – дефект на фосфолипаза A2, циклооксигеназата, тромбоксан-синтазата – дефекти в GTP-свързващи протеини -дефект в активацията на фосфолипаза C
5. Нарушения на мембранните фосфолипиди	- Scott syndrome – Stormorken синдром
6. Други нарушения	-нарушения в първичната секреция – Montreal-тромбоцитен синдром, остеогенезис имперфекта, Ehlers-Danlos синдром, синдром на Marfan, дефицит на хексокиназа, дефицит на глюкозо-6-фосфат

II. ПРИДОБИТИ НАРУШЕНИЯ В ТРОМБОЦИТНАТА ФУНКЦИЯ

Придобитите нарушения на функцията са чести, срещат се при съпътстващи заболявания (табл. 2),

употреба на медикаменти и храни (табл. 3) и могат да причинят значително кървене. Употребата на медикаменти е най-честата причина, която може да доведе до кървене или тромбоза.

Табл. 2. Придобити нарушения на тромбоцитната функция

Системни заболявания	Уремия Автоимунни – антитромбоцитни антитела Чернодробни заболявания
Хематологични заболявания	Тромбастения на Glanzmann GPIIb-IIIa (α IIb β 3)
Сърдечни оперативни интервенции	Екстракорпорално кръвообръщение
Придобити нарушения в съхранението	Трансфузия на тромбоцити
Антитромбоцитни медикаменти	Аспирин, Тиенопиридини, GPIIb/IIIa инхибитори

Табл. 3. Вещества, повлияващи тромбоцитната функция, Arch Pathol Lab Med. 2002;126:133-146

COX-1 инхибитори – аспирин	Антималарийни препарати
COX-1 и COX-2 инхибитори (нестероидни противовъзпалителни)	Химиотерапевтици
COX-2 инхибитори – Celecoxib	Психотропни
Инхибитори на тромб. рецептори – тиенопиридини, IIb/IIIa инхибитори	Трициклически антидепресанти
Фосфодиестеразни инхибитори – дипиридамол, силостазол	Фенотиазини
Директни тромбинови инхибитори (лепирудин, аргатробан, бивалирудин)	Локални и общи анестетици
Антикоагуланти – хепарин, варфарин	Рентгенови контрастни материали
Сърдечно-съдови медикаменти – бетаблокери, вазодилататори, диуретици, калциеви антагонисти	Други – клофибрат, декстран, експекторанти
Антимикробни средства	Храни – чесън, лук, джинджифил, кофеин, алкохол
В-лактами – пеницилин, цефалоспорин	Рибено масло, ленено семе, витамин С и Е

III. КОНТРОЛ НА ДААТ

Перкутанната коронарна ангиопластика (ПКА) днес е основен метод за лечение и превенция на острия коронарен синдром. При имплантирането на коронарни стентове настъпва взаимодействие между кръвните съставки и тромбогенната повърхност на стента¹⁰, което довежда до активиране на тромбоцитите и може да предизвика артериална тромбоза¹¹. Потискането на тромбоцитната функция с прилагането на антитромбоцитните медикаменти е ключов фармакологичен механизъм в нейната профилактика. Намерените различия в тромбоцитното инхибиране доведоха до използването на тромбоцитните функционални тестове за мониториране на антитромбоцитната терапия с цел идентифициране на пациентите с повишен риск от тромбемболични събития или кървене.

IV. ХИРУРГИЧНИ ИНТЕРВЕНЦИИ

Използването на тромбоцитните функционални тестове при хирургични интервенции фигурира в препоръките при оперативни на Дружеството по гръдна хирургия¹²:

1. Препоръки при спешна оперативна интервенция

2012 Society of Thoracic Surgeons Guideline

Препоръка клас IIa: При пациентите на ДААТ е разумно да се отложи провеждането на оперативната интервенция в зависимост от резултатите от тестовете за тромбоцитно инхибиране, а не прилагането на специфичния период на изчакване.

2. Мониториране на тромбоцитната функция

Препоръка клас IIb: Поради тяхната висока отрицателна предиктивна стойност, предоперативните point-of-care тестове за оценка на риска от кървене са полезни за идентифициране на пациентите с остаточно тромбоцитно инхибиране и тези които могат да бъдат подложени на операция без увеличен риск от кървене.

КОГА ДА ПОДОЗИРАМЕ ДЕФЕКТ В ТРОМБОЦИТНАТА ФУНКЦИЯ

При наличие на:

1. Клинично изявено кървене при нормални коагулационни тестове
2. Анамнеза за необичайно кожно-лигавично кървене, кървене при зъбна екстракция, епистаксис, менорагия, посттравматично или постоперативно кървене – от значение е дали кървенето е скорошно или се наблюдава от детска възраст; при фамилен анамнез за масивно кървене; при прием на медикаменти, повлияващи тромбоцитната

функция¹³.

АВТОМАТИЗИРАНИ ТРОМБОЦИТНИ ФУНКЦИОНАЛНИ ТЕСТОВЕ

Класифицират се в три групи¹⁴:

1. Рутинни тромбоцитни тестове – светлинна абсорбционна агрегометрия (LTA)
2. Point-of-care тромбоцитни тестове: PFA-100, VERIFY NOW, MULTIPATE
3. Специфични – флоуцитрометрия

LTA и флоуцитрометрията са тестове, които се извършват в специализирани лаборатории към хематологични отделения, в големи болнични заведения с квалифициран персонал, докато point-of-care тромбоцитните тестове дават възможност за бързо и лесно извършване на анализите близо до самия пациент.

Светлинна трансмисионна агрегометрия

Турбидиметричен метод, разработен през 1962 година от Born – остава златен стандарт в изследването на тромбоцитната функция. Тромбоцитната агрегация се измерва спектрофотометрично в богата на тромбоцити плазма (PRP). Образоването на агрегати след прибавяне на агрегиращи агенти довежда до увеличение на светлинната трансмисия и промяна в сигнала.

Интерпретация на резултатите -представена на фигура 2:

Фиг. 2. Интерпретация на резултатите, Christopher M. Platelet function testing, ISTH 2017

	ADP 5 µmol	Coll 2 µg/L	AA 1 mM	Ristocetin 1.5 mg/mL	Risto (low) 0.5 mg/mL
vWD	N	N	N	-	-
2B vWD	N	N	N	N	Agglutin
Thrombasthenia	-	-	-	N	-
Storage pool	1° wave	Abn	N	N	-
Release defect	1° wave	Abn	Abn	N	-
Aspirin	1° wave	Abn	Abn	N	-

Диагностична стойност на LTA – методът служи основно за разграничаване на нарушена от нормална тромбоцитна функция. LTA самостоятелно не идентифицира всички пациенти с нарушена функция. Липсва стандартизация по отношение на панела от агонистите и техните концентрации, както и дефиниция на референтните интервали от здрави контроли и патологичните резултати. Най-полезният допълнителен тест е измерване на секрецията от гранулите, но честотата на абнормалните резултати при дефекти в секрецията варира в различните проучвания между 14.3% – 56%. Тестът не се препоръчва за мониториране на антитромбоцитната терапия.

Platelet Function Analyser (PFA -100)

Глобален тест за тромбоцитна адхезия и агрегация в условия на висок "shear stress". Отчита намалението на скоростния поток при преминаване на тромбоцити в цитратна пълна кръв през апертура, натоварена с колаген при скорост от 5000 – 6000 sec-1. Измерва се времето на затваряне на апертурата от агрегиралите тромбоцити (Closure time – CT).

Диагностична стойност на PFA -100 – замества времето на кървене, чувствителен към дефекти в тромбоцитните рецептори – GPIIb/IIIa, GPIb, дефекти на VWF. PFI-100 като глобален тест за тромбоцитна адхезия и агрегация е подложен на голям брой вариации, повлияващи тромбоцитната функция: тромбоцитен брой, хематокрит, медикаменти.

VerifyNow

Основава се на принципа на светлинно-трасмисионна оптична детекция от пълна кръв. Измерва се светлинната трансмисия в картридж, съдържащ тромбоцитен активатор и фибриноген-натоварени частици. Определя се степента на агрегация на тромбоцитите върху полистиреновите гранули, покрити с фибриноген. Предимствата са бързината на изследване, лесното изпълнение, използването на малко количество кръв. Недостатъците са ограничението само с 3 вида картриджи (Aspirin Assay, IIb/IIa Assay и P2Y12 Assay) и високата цена на изследването.

MULTIPLATE – агрегометрия

Multipate (multiple platelet function analyzer) е апарат за изследване на агрегацията в пълна кръв спрямо различни агонисти. Принципът на измерване е импедансна агрегометрия. Предимствата на Multipate са бързината на изследването (времето за анализ е 10 минути) директно от пълна кръв с антикоагулант хирудин, стандартизация на накупванията, осигурена от електронна пипета.

Методът служи за разграничаване на вродени нарушения (фиг.3)

Фиг. 3. Резултати при вродени нарушения, Andreas Calatzis, Round table meeting – haematology 2010, Munich

ЗАБОЛЯВАНЕ	ТЕСТ					
	TRAP	ASPI	ADP	COL	RISTO	HIGH
ADP рецепторни дефекти	NORMAL*	NORMAL*	LOW	NORMAL*	NORMAL*	NORMAL (=low)
VON WILLEBRAND (Type I, II, III)	NORMAL*	NORMAL*	NORMAL*	NORMAL*	LOW	NORMAL (=low)
VON WILLEBRAND IIb	NORMAL*/LOW	NORMAL*/LOW	NORMAL*/LOW	NORMAL*/LOW	NORMAL*/LOW	HIGH
BERNARD SOULIER	NORMAL*	NORMAL*	NORMAL*	NORMAL*	LOW	NORMAL (=low)
GLANZMANN	LOW	LOW	LOW	LOW	LOW	NORMAL (=low)
THROMBASTHENIA						

С MULTIPLATE може да се разграничи vWD и Bernard Soulier Syndrome – прибавянето на vWF коригира агрегацията с ристоцетин при vWD, но не и при синдрома на Bernard Soulier.

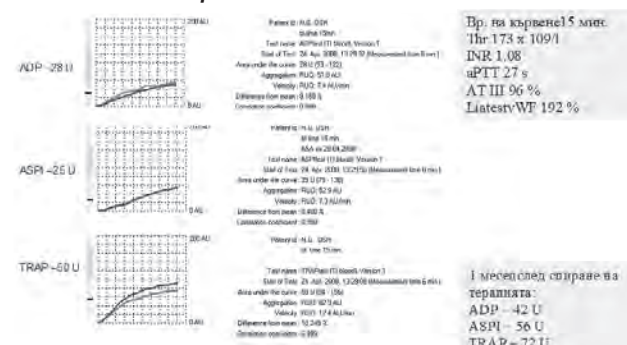
Лабораторията на НКБ има десет годишен, изключително богат опит при мониториране на антиагрегантната терапия и в периперативното приложение на Multipate тестовете. Представям два клинични случая на нарушена тромбоцитна функция:

Клиничен случай №1 – инхибирана агрегация от Zoloft

Мъж на 52 г., с ИБС, планиран за аорто-коронарен байпас.

Проведените предоперативни изследвания показваха изключително удължено време на кървене – 15 мин. при нормални коагулационни тестове, нормален тромбоцитен брой и vWF. Агрегационните тестове показваха инхибирана агрегация (фиг. 4): ADP – 28 U; ASPI – 25 U; TRAP – 50 U. Установи се прием на Zoloft – селективен инхибитор на серотонина, потискащ тромбоцитната агрегация. Пациентът беше преценен като високорисков за периперативно кървене и оперативната интервенция беше отложена. Един месец след спиране на терапията агрегационните тестове показваха възстановяване на тромбоцитната функция: ADP – 42 U; ASPI – 56 U; TRAP – 72 U.

Фиг. 4. Инхибирана агрегация от Zoloft, I. Paskaleva, National Heart Hospital – Sofia

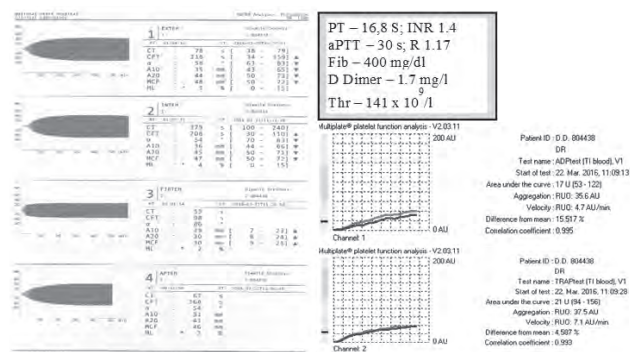


Клиничен случай №2 – масивно кървене след ЕКК

Дете на 17 г. с тетралогия на Фало от клиниката по детска кардиология, постъпващо за поредна оперативна корекция (фиг.5). На 5-ти постоперативен ден започна кървене от трахеостомата, хемоптоие, кървене от местата на убождане, хематурия при нормален тромбоцитен брой и коагулационни тестове¹⁵. Тромбеластограмата показва намалена здравина на съсирека – ниски амплитуди в INTEM и EXTEM тестовете при високи амплитуди във FIBTEM теста. ADP и TRAP теста показваха нарушение на агрегация. Вливането на тромбоцитни концен-

трати доведе до бързо овладяване на кървенето.

Фиг. 5. Масивно кървене след ЕКК, Национална кардиологична болница, София



Флуцитометрия

Разредена антикоагулирана кръв се инкубира с различни антитела и багрила, които се свързват специфично с индивидуални тромбоцитни белтъци, гранули и липидни мембрани. Изисква скъпа апаратура и високо квалифициран персонал. Предоставя широки възможности за оценка на тромбоцитите и тяхната агрегация (табл. 4).

Табл. 4. Флуцитометрия – видове тестове

Тестове, свързани с екзоцитоза на гранулите	CD62P (P-селектин)- а-гранули CD63 – лизозоми Merocrine uptake/release – плътни гранули
Тестове, свързани с тромбоцитните рецептори	GPIIb-IIIa (CD41/CD61) – Glanzmann GPIb-IX (CD42a/CD42b) – Bernard-Soulier GPVI (CD36) – колаген GPIb-IIa (CD33/CD49b) – колаген
Маркери за активация	PAC-1 (fibrinogen mimetic) – GPIIb-IIIa Annexin V – анионни фосфолипиди

Мониторинг на терапия – VASP тест

Измерва се специфичен интрацелуларен маркер на остатъчна P2Y12 активност. Резултатите се изразяват като PRI – отношение между фосфорилираните и дефосфорилираните VASP.

ХАРАКТЕРИСТИКА НА МЕТОДИТЕ

Предимствата и недостатъците на тромбоцитните функционални тестове са представени на табл. 5.

Табл. 5. Характеристика на автоматизираните функционални тестове

Апарат	Тест	Предимства	Недостатъци
	LTA – светлинна трансмисия агрегометрия	“златен стандарт”	Изисква време, квалифициран персонал, ниска възпроизводимост
	Флуцитометрично измерване на VASP-PRI	P2Y ₁₂ специфичен бърз, пълна кръв	Изисква флуцитометър скъп
	PFA-100 COL-ADP, COL-EPI, P2Y ₁₂ “shear stress”	Глобален функционален тест и при дефекти на vWF	Слаба възпр. и сравнимост с LTA, Veriflow, MTP-L
	Veriflow Aspirin, P2Y ₁₂ , TRAP	P2Y ₁₂ специфичен бърз, касетъчен, пълна кръв, томен	Висока цена на касетите
	Multiplate ADP-test, COL-test, TRAPtest, RISTOtest	P2Y ₁₂ специфичен бърз, пълна кръв	Зависим от брой тромбоцити

РАЗГРАНИЧИТЕЛНИ ГРАНИЦИ ПРИ ТЕРАПИЯ

През 2010 година методите за агрегация от пълна кръв са възприети като стандарти при изследване на тромбоцитната функция при мониториране на антиагрегантна терапия 16. На базата на мета-анализ от 17 рандомизирани проучвания, включващи 20 839 пациенти трите теста са изведени разграничителни граници¹⁷, свързани с исхемични събития и с кървене (табл. 6).

Табл. 6. Разграничителни граници при терапия, Rev. Esp. Cardiol. 2014 67:480-7 Personalized Antiplatelet Therapy, Paul A. Gurbel all.

Тест, единици	Cutoff-граница, свързана с Исхемични събития	Cutoff-граница, свързана с кървене
Veriflow PRU Assay, PRU	> 208	< 85
Multiplate analyzer ADP-induced aggregation, U	> 46	< 19
VASP-PRI	≥ 50	< 16

При мониторирането на терапия интерпретацията на резултатите е ясна: методите са стандартизирани, изведени са терапевтични граници. Не е така обаче, когато тестовете се използват за диагностициране на нарушена тромбоцитна функция – изследванията, обхващащи тромбоцитната функция са вариабилни в същността си, тъй като се изследва клетъчна функция и динамика на живи клетки, а не отделен показател. Тестовете не се провеждат при физиологични условия, не отчитат участието на съдовите стени. Корелацията между отделните тестове е слаба, което затруднява

сравнението на резултатите с различните методи. Само малък брой редки вродени заболявания (GT, BSS) могат да бъдат диагностицирани само с оптична агрегометрия, достъпът до специализирани тестове е ограничен.

Какво показват резултатите от едно проучване, проведено в 202 лаборатории в 37 страни¹⁸: от включени 14 000 изследвани пациенти диагностицираните пациенти с нарушения на тромбоцитната функция са едва 40 %. Надея се за увеличения на този процент дават генетичните тестове, които характеризират дефектите на молекулярно ниво.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Нарушенията в тромбоцитната функция са често и диагностичното им уточняване е предизвикателство.
2. Анамнезата, клиничната оценка и обсъждане на интерфериращи фактори (медицианти и храна) са от съществено значение.
3. Светлинната агрегометрия и тестовете за оценка на секрецията (флуцитометрия) са най-използваните методи в клиничната лаборатория, изискват квалифициран персонал, опит, време, скъпа апаратура.
4. Голяма част от пациентите остават без уточнен диагноза.
5. При съмнение за вроден дефект във функцията – генотипизирането е по-ефективен метод в сравнение с фенотипизирането.
6. При оценка на антиагрегативната терапия и периперативен риск от кървене агрегометрията от пълна кръв с point of care апарати е препоръчвания метод за мониториране на тромбоцитната функция.

Адрес за кореспонденция

Д-р Добринка Динева Савова, д.м.
Отделение по лабораторни диагностика
МБАЛ-НКБ, София
ул. Конювица № 65, гр. София, 1309
e-mail: dobdineva@yahoo.com
тел. 029211377 GSM 0888330899

Correspondence address:

Dobrinka Dineva Savova, MD, PhD
Clinical Laboratory Department
National Heart Hospital, Sofia
65 Koniovitza str., Sofia 1309
e-mail: dobdineva@yahoo.com
Tel. 029211377 GSM 0888330899

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Collier B. A brief history of ideas about platelets and health and disease. *Platelets* 2008, 2nd ed.: Elsevier/Academic Press
2. Fang and all. Therapeutic expression of the platelet-specific integrin, $\alpha\text{IIb}\beta_3$, in a murine model for Glanzmann thrombasthenia, *Blood* 2005 106:2671-2679
3. Wilcox, D, Whitte G., Gene therapy for platelet disorders: studies with Glanzmann's thrombasthenia, *ISTHVI*, Issue 11, November 2003P 2300-2311
4. J.E. Italiano, H. Hartwig, Megakaryocyte development and platelet formation, *Platelets* 2008, 2nd ed.: Elsevier/Academic Press
5. Lawrence F. Brass and Timothy J. Stalker, Mechanisms of platelets activation, *Platelet Immunology* 2008, Cambridge University Press
6. Цветкова Т., Клиничнолабораторни резултати. Част 1. Подходи и избор на анализа, оценка и корелации на резултатите. Ред. Т. Пловдив, ИК "БАП", 1998. 273 с.
7. Lordkipanidzé M. Platelet Function Tests, *Semin Thromb Hemost* 2016;42:258-267.
8. Cattaneo M. Congenital disorders of platelet function, *Platelet in hematological and cardiovascular disorders* p. 203
9. Nurden A., Nurden P., Inherited disorders of platelet function. *Platelets* 2008, 2nd ed.: Elsevier/Academic Press
10. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart* 1996;76(2):166-72.
11. Massberg S, Schulz C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. *Semin Vasc Med* 2003;3(2):147-62.
12. Ferraris VA1, Saha SP, Oestreich JH, et al; Society of Thoracic Surgeons. 2012 update to the Society of Thoracic Surgeons guideline on use of antiplatelet drugs in patients having cardiac and noncardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 2012 Nov;94(5):1761-81. doi: 10.1016/j.athoracsur.2012.07.086
13. Israels, McNicol, Laboratory investigation of platelet function disorders, *ISTH* 2015
14. Panizza et al., *Vascular Health and Risk Management* 2015: doi: 10.2147/vhrm.s44469
15. Власовска М., Орбецова М., Георгиев Б. и сътр., Профилактика, диагностика, терапия, Актуални проблеми 2018, Хавитис
16. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, et al., for the Working Group on High On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:919-33. 5.
17. Aradi D, Kirtane A., Bonello L et al., Bleeding and stent thrombosis on P2Y12-inhibitors: collaborative analysis on the role of platelet reactivity risk stratification after PCI, *European Heart Journal* 2015 doi: 10.1093/eurheartj/ehv104
18. Gesele et al. *J Thromb Haemost* 2014;12:1562

[illegible]

This image shows a full page of white paper with horizontal dotted lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page, providing a guide for handwriting practice. There are no margins, text, or other markings on the page.

This image shows a full page of white paper with horizontal dotted lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page, providing a guide for handwriting practice. There are no margins, text, or other markings on the page.

[illegible]

[illegible]

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”, наименованиенаписание то 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 форграфии.

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**



www.bulgarian-hematology.com