



**БЪЛГАРСКО МЕДИЦИНСКО
СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ**

КЛИНИЧНА И ТРАНСФУЗИОННА ХЕМАТОЛОГИЯ



ТОМ XLVIII - БР. 1-2 - 2012

КЛИНИЧНА И ТРАНСФУЗИОННА ХЕМАТОЛОГИЯ CLINICAL AND TRANSFUSION HEMATOLOGY

Списание на Българското медицинско сдружение по хематология

Journal of the Bulgarian Medical Society of Hematology

TOM/VOL. XLVIII

2012

№ 1-2

РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ

Главен редактор

Проф. д-р Стефан Горанов, дмн
тел./факс: 032 602 481

Зам. главен редактор

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

Секретар

Д-р Веселина Горанова-Маринова, дм
тел.: 032 602 596, 032 602 298

Членове

Проф. д-р Георги Михайлов, дм

Проф. д-р Маргарита Генова, дм

Проф. д-р Фани Мартинова, дмн

Доц. д-р Лиана Герчева, дм

Доц. д-р Юлиан Райнов, дм

Доц. д-р Валерия Калева, дм

Доц. д-р Евгений Хаджиев, дм

Доц. д-р Жанет Грудева – Попова, дм

Д-р Лилия Сивчева

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Prof. Stefan Goranov, MD, PhD, DMSc
tel./fax: +359 32 602 481

Associated Editor-in-Chief

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

Secretary

Dr. 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

Ass. Prof. Liana Gercheva, MD PhD

Ass. Prof. Julian Rainov, MD PhD

Ass. Prof. Valeria Kaleva, MD PhD

Ass. Prof. Eugenii Hadjiev, MD PhD

Ass. Prof. Janet Grudeva-Popova MD PhD

Dr. Lilia Sivcheva

СЪДЪРЖАНИЕ

ОБЗОРИ

- И. Мичева. Миелодиспластични синдроми - ново разбиране за патофизиологията, оценка на риска и лечение.....3
- В. Хрисчев, С. Ахмед. Какво ново в желязо-хелатиращата терапия?.....9
- Г. Михайлов, М. Рангелова, Ст. Тошков, М. Генова, Г. Балаценко, В. Хрисчев, С. Ахмед. Миело-пролиферативни неоплазми Миелофиброза – диагностика, лечение, проследяване. Регистър на пациентите с миелофиброза в България.....17
- К. Карлов, С. Константинов. Арсеникът в съвременната противотуморна химиотерапия.....22
- А. Тошев, З. Михнева. Инфекция с човешки Парвовирус v19 / Еритровирус v19: носителство и доказване при имунокомпетентни и имунокомпрометирани лица. Безопасност и приложение на кръвни продукти в трансфузионната медицина.....31
- В. Манолов, Б. Атанасова, Е. Хаджиев, К. Цачев. Хепсидин: нов диагностичен маркер при клинични нарушения в обмяната на желязото.....39

ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ

- Vesna V. Radovic, Zoran V. Mijuskovic, Ljiljana J. Tukic, Predrag M. Djurdjevic, Jelica D. Stojanovic, Milica B. Zlatkovic. Free light chains of immunoglobulin as a prognostic factor in group of patients with Waldenström's macroglobulinemia, light chain deposit disease and multiple myeloma.....46
- В. Горанова-Маринова, А. Недева, Т. Денева, П. Георгиев, И. Христова, Ю. Райнов и Ст. Горанов. Терапевтичен отговор и преживяемост при пациенти с мултиплен миелом, лекувани с BORTEZOMIB съдържащи режими.....54
- В. Върбанова, Г. Михайлов, А. Георгиева, Цв. Луканов, Н. Стоянов, П. Ганева, Г. Арnaudов, С. Тошков, Е. Наумова и А. Михайлова. Влияние на KIR и HLA клас I лигандния генен полиморфизъм на донора и реципиента за изхода от алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки61
- Б. Спасов, П. Ганева, М. Дончев, К. Игнатова, Г. Арnaudов, Г. Балаценко, М. Генова, Св. Ангелова, Ст. Тошков, Г. Михайлов. Приложение на високодозова терапия при пациенти с резистентни остри миелоидни левкемии под 60 г. възраст.....70
- И. Мичева, В. Геров, Р. Рачев, Х. Върбанов, Н. Ставрев, Л. Герчева. Клинична характеристика и преживяемост на пациенти с миелодиспластичен синдром. Преоценка според WHO класификацията, IPSS и WPSS.....76
- Б. Спасов, Г. Балаценко, П. Ганева, М. Генова, Св. Ангелова, Ст. Тошков, Г. Михайлов. Прогностично значение на вътрешните тандемни дупликации на гена FMS- подобна тирозин киназа 3 (FLT3-ITD) при пациенти с остри миелоидни левкемии под 60 г. възраст.....82
- Е. Белева, Ц. Пейчева, В. Попов, Ж. Грудева. Тромбофилна диатеза при пациенти със солидни тумори: VTE score клинични и прогностични корелации.....88
- Т. Бонева и Л. Митев. Хромозомни аберации в 14q32 локуса при мултиплен миелом.....93

КАЗУИСТИКА

- В. Гръкланов, В. Горанова-Маринова, П. Георгиев, К. Сапунарова, М. Димитрова, Ст. Горанов. Интраваскуларен дифузен В-едроцитен лимфом - представяне на случай и литературен обзор97
- В. Гръкланов, В. Горанова-Маринова, К. Сотирова, П. Георгиев, М. Димитрова, Е. Спасов, Ст. Горанов. Миелоиден сарком на главата на панкреаса - представяне на случай и литературен преглед104
- В. Бабачева, В. Горанова-Маринова, П. Георгиев, К. Сотирова, М. Димитрова, Е. Спасов, Ст. Горанов. Остра панмиелоидна с миелофиброза – описание на случай и литературен преглед111

Списанието се обработва в:

- * EMBASE/Excerpta Medica
- * БД - Българска медицинска литература

КЛИНИЧНА И
ТРАНСФУЗИОННА
ХЕМАТОЛОГИЯ бр. 1-2/2012

Клин. трансфуз. хематол.

Klin. transfuz. hematol.

ISSN 0861-7880
УДК 616.15 + 615.38

АДРЕС НА РЕДАКЦИОННАТА КОЛЕГИЯ

Клиника по клинична хематология
към УМБАЛ „Св Георги“ - ЕАД
4002 Пловдив
Бул „Васил Априлов“ 15А
тел./факс: 032 602 481
stefangoranolov@yahoo.com

EDITORIAL BOARD ADDRESS

Clinic of clinical Hematology,
University Hospital „Sv. Georgi“
4002 Plovdiv
15A, Vasil Aprilov blvd.,
Tel./fax: +359 32 602 481
stefangoranolov@yahoo.com

Уредник: Импресив ЕООД, Пловдив
Тел за контакт: 0889 546 506

Медицинска корекция, стил, структура
и статистика:

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

CONTENT

REVIEWS

- I. Micheva. Myelodysplastic syndromes - recent advances in pathophysiology, risk scoring, and treatment.....3
- G. Mihaylov, M. Rangelova, St. Toskov, M. Guenova, G. Balatzenko, V. Chrishev, C. Ahmed. What is new in the iron - chelating therapy.....9
- G. Mihaylov, M. Rangelova, St. Toskov, M. Guenova, G. Balatzenko, V. Chrishev, C. Ahmed. Myeloproliferative neoplasms. Myelofibrosis - diagnostics, management, follow - up. Registry of the patientnts with osteomyelofibrosis in Bulgaria.....17
- K. Karlov, S. Konstantinov. Arsenic in the contemporary antitumour chemotherapy.....22
- A. Toshev, Z. Mihneva. Infection with human parvovirus b19/ erythrovirus b19: carrier and proof in immunocompetent and immunocompromised persons; safety and administration of blood products in transfusion medicine.....31
- V. Manolov, B. Atanassova, E. Hadzhiev, K. Tzachev · Hcpidin: A new marker in diagnosis of iron metabolism disorders.....39

ORIGINAL ARTICLES

- Vesna V. Radovic, Zoran V. Mijuskovic, Ljiljana J. Tukic, Predrag M. Djurdjevic, Jelica D. Stojanovic, Milica B. Zlatkovic. Free light chains of immunoglobulin as a prognostic factor in group of patients with Waldenström's macroglobulinemia, light chain deposit disease and multiple myeloma.....46
- V. Goranova-Marinova, A. Nedeva, T. Deneva, P. Georgiev, I. Hristova, J. Raynov, S. Goranov. Therapeutic response and survival in patients, treated with bortezomib - based regimens.....54
- V. Varbanova, G. Mihaylov, A. Georgieva, Ts. Lukinov, N. Stojanov, P. Ganeva, G. Arnaudov, S. Toshkov, E. Naumova, A. Mihaylova. Influence of donor and recipient KIR and HLA class I ligand gene polymorphism on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome.....61
- B. Spassov, P. Ganeva, M. Donchev, K. Ignatova, G. Arnaudov, G. Balatzenko, M. Guenova, Sv. Angelova, S. Toshkov, G. Michailov. High dose induction therapy in patients with refractory acute myeloid leukemias under 60 years.....70
- I. Micheva, V. Gerov, R. Rachev, H. Varbanov, N. Stavrev, L. Gercheva. Clinical characteristic and overall survival of patients with myelodysplastic syndrome. Reassessment according to who classification, IPSS and WPSS.....76
- B. Spassov, G. Balatzenko, P. Ganeva, M. Guenova, S. Angelova, S. Toshkov, G. Michailov. Prognostic significance of internal tandem duplications of FMS-like tyrosin kinase 3 gene (FLT3-ITD) in patients with acute myeloid leukemias under 60 years of age.....82
- E. Beleva, C. Peicheva, V. Popov, J. Grudeva. Thrombophilic diathesis in patients with solid tumors: VTE score, clinical and prognostic implications.....88
- T. Boneva, L. Mitev. 14q32 rearrangements in multiple myeloma.....93

CASE REPORT

- V. Graklanov, V. Goranova-Marinova, M. Dimitrova, K. Sapunarova, S. Goranov. Intravascular diffuse large B-cell lymphoma case - report and literature review.....97
- V. Graklanov, V. Goranova-Marinova, K. Sotirova, K. Sapunarova, P. Georgiev, M. Dimitrova, E. Spassov, S. Goranov. Myeloid sarcoma of the pancreatic head case report and literature review.....104
- V. Babacheva, V. Goranova-Marinova, P. Georgiev, K. Sotirova, M. Dimitrova, E. Spassov, S. Goranov. Acute panmyelosis with myelofibrosis case report and literature review.....111

МИЕЛОДИСПЛАСТИЧНИ СИНДРОМИ - НОВО РАЗБИРАНЕ ЗА ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, ОЦЕНКА НА РИСКА И ЛЕЧЕНИЕ**И. Мичева**

Клиника по Хематология, УМБАЛ "Света Марина", Варна

MYELODYSPLASTIC SYNDROMES - RECENT ADVANCES IN PATHOPHYSIOLOGY, RISK SCORING, AND TREATMENT.**I. Micheva**

Clinic of Hematology, UMHAT "St. Marina", Varna

Резюме. Миелодиспластичните синдроми (МДС) представляват хетерогенна група от неопластични заболявания на стволовата клетка, характеризиращи се с костномозъчна недостатъчност, дисплазия и повишен риск от трансформация в остра левкемия (ОЛ). През последното десетилетие сме свидетели на революция в познанията за МДС, а последните няколко години наблюдаваме началото на молекулярната дисекция на заболяването. Несъмнено, най-голям успех в разбирането ни за биологията на МДС представляват откритията за най-често срещаната цитогенетична аномалия - *del(5q)*. Редица проучвания разкриват ролята на рекурентни соматични мутации, някои от които с вероятно прогностично значение. Предложени са нови прогностични системи за по-точна преценка на преживяемостта и риска от прогресия с цел прецизиране на терапевтичния избор. Спектърът от терапевтични възможности непрекъснато се разширява, но много от резултатите са противоречиви и изискват задълбочен анализ.

Ключови думи: МДС, патогенеза, прогностичен индекс, лечение

Summary. Myelodysplastic syndromes (MDS) are among the most common hematopoietic malignancies. MDS constitute a group of clonal hematopoietic disorders characterized by bone marrow failure, dysplasia, and an increased likelihood of evolution to acute myeloid leukemia. Over the last decade we have witnessed a revolution in the knowledge of MDS. This has resulted in the development of new morphological classification, prognostic scoring systems, and effective therapies. More recently, we have also witnessed the beginning of the molecular dissection of the disease. Perhaps the greatest understanding of MDS biology has come from the findings in the most common genetic anomaly observed in this disease, *del(5q)*. Several studies have demonstrated the importance of recurrent somatic mutations in MDS; a subset of genes has been associated with poor outcome. New prognostic systems have been proposed aimed at improving the ability to predict survival and progression in MDS patients, as well as to select the accurate therapy. A number of therapies are now widely available; however there are areas of controversy that will need further research.

Keywords: MDS, pathogenesis, prognostic score, treatment options

Въведение

МДС представляват клонални заболявания на хемопоетичната стволова клетка, характеризиращи се с костномозъчна недостатъчност, цитопения в периферната кръв и повишен риск от трансформация в ОЛ. Честотата на МДС нараства с напредване на възрастта, вероятно в резултат на придобиване на ДНК увреди, естествено изчерпване на стволовите клетки и/или на натрупване на различни токсини и стрес

фактори на средата.

МДС е заболяване с разнообразен клиничен фенотип, определящ се от различния брой и тежест на цитопениите, клетъчността и процента бласти в костния мозък, прогресията в ОЛ, общата преживяемост и отговора на лечение. До голяма степен тази фенотипна хетерогенност отразява разнообразието от генетични нарушения, безспорно свързани с патогенезата на заболяването. Разкриването на генетичните основи на МДС е обещаваща

перспектива за изясняване на патофизиологията, усъвършенстване на класификациите и прогностичните скоринг системи, както и за създаването на нови терапевтични мишени.

Разбиране за патофизиологията на МДС

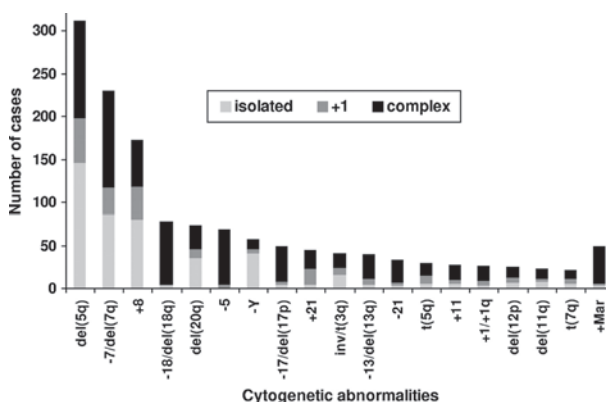
МДС възниква в хемopoетичната стволова клетка с участието на различни механизми (Фиг.1.). Редица проучвания разкриват ролята на имунните нарушения и микросредата в патогенезата на заболяването. Налице са безспорни данни за въвличане на В лимфоцитите, НК клетките, дендритните клетки и дори Т лимфоцитите в патологичния клон, което дава основание да се приеме, че имунните нарушения са по-скоро вторични, отколкото отключващ етиологичен момент (1). Установено е, че различни елементи на стромата като макрофаги и остеокласти, също принадлежат към патологичния клон. Ролята им в патогенезата на заболяването се свежда до секреция на фактори, повлияващи диференциацията на стволовата клетка или ангиогенезата.



Фиг. 1. Биология на МДС.

Друг механизъм, въвличен в патогенезата на МДС, обект на многогодишни проучвания, е апоптозата. В случаите на нисък риск МДС преобладават про-апоптозните фактори с повишена експресия на инхибиторни цитокини, които активират апоптозата (2). Тези цитокини включват TNF- α , IL-6, TGF- β , Interferon gamma и Fas лиганд. В основата на всички описани дефекти на клетъчно ниво стоят различни цитогенетични и молекулярни нарушения. Използвайки базата данни на Германско-Австрийския и на MDACC регистър, Haase et al. провеждат цитогенетичен анализ върху 2072 пациенти с МДС (3). Нарушения в кариотипа са установени у 52,3%. Кариотипни аномалии, включващи делеция на 5q са най-чести, наблюдавани в 30% от случаите (Фиг.2). По-късно тази работа е продължена от Schanz et al. (4). Анализирани са 2902 случая от няколко международни регистъра като нарушенията в кариотипа са разделени в пет прогностични групи: много добър: del(11q), -Y добър: NI, del(20q), del(5q), del(12p), среден: +8,7q-, i(17q), +19,+21, други

единични и двойни, лош: der(3)q21/q26,-7, двойни, включващи 7q-, комплексен (3 нарушения), много лош: комплексен (>3 нарушения). Тези групи залягат и в новата ревизираната IPSS (IPSS-R).



Фиг. 2. Цитогенетични нарушения при пациенти с МДС (Haase D et al. Blood 2007; 110:4385-4395).

5q синдрома като рибозомопатия

5q синдромът е уникален подтип МДС, характеризира се с тежка макроцитна анемия, различна степен на неутропения, висок или нормален тромбоцитен брой с хиполобулирни мегакариоцити. Инициращото събитие е хемизиготна делеция на сегмент от хромозома 5q. Чрез съвременни молекулярни техники е изолиран т.нар. common deleted region (CDR) и са характеризирани ключови за фенотипната изява на заболяването гени.

Хаплоинсуфициенция на гени за рибозомални протеини стои в основата на т.нар. рибозомопатии. През 2008 година, Ebert et al. (5) демонстрират, че хаплоинсуфициенция на RPS14 гена предизвиква рефрактерна анемия аналогична на тази, наблюдавана при 5q синдрома. Понижената експресия на RPS14 в хемopoетични стволови клетки води до нарушения в еритропоезата, докато индуцираната експресия на RPS14 при пациенти с 5q-синдром спасява еритропоезата. Две са водещите хипотези за последиците от рибозомалната хаплоинсуфициенция на клетъчно ниво. Първата е свързана с активиране на p53 в резултат на рибозомална дисфункция (6) с последваща акумулация на p21 и арест на клетъчния цикъл в еритроидните прогенеторни клетки. Другият потенциален механизъм е свързан с дефектна матурация на рибозомата, забавяне на транслацията на глобиновите гени, релативен излишък на свободен хем, апоптоза на еритроидната редица и анемия.

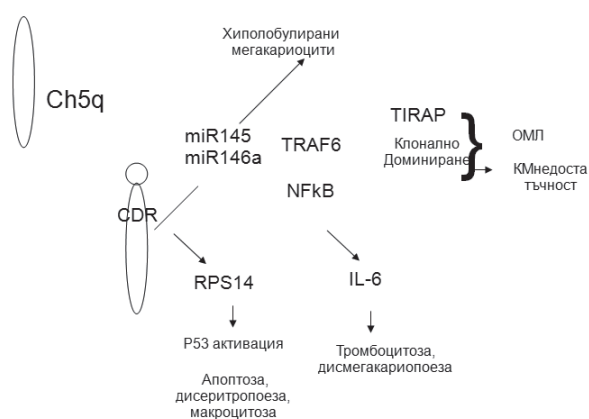
Друго революционно изследване на Starczynowski et al. (7) показва, че делецията на две микро РНК-и-miR145 и miR146a, намиращи се в CDR, може да предизвика мегакариоцитна

дисплазия с нарастване броя на тромбоцитите или костномозъчна недостатъчност и ОМЛ. Тези ефекти са опосредствани от два таргетни гена на miR145 и miR146a, тумор некрозис фактор асоцииран фактор-6 (TRAF6) и Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein (TIRAP). Едновременно инхибиране на miR-145 и miR-146a, или увеличената експресия на TRAF6 в миши хемopoетични стволови клетки води до тромбоцитоза, дискретна неутропения и мегакариоцитна дисплазия. Мишки, трансплантирани с TRAF6 експресиращи клетки от костен мозък, прогресират или до костномозъчна недостатъчност, или до остра левкемия. TRAF6 регулира положително експресията на IL6. IL6 се оказва медиатор на TRAF6 ефектите върху мегакариоцитите и тромбоцитите, докато TRAF6 сам по себе си предизвиква клонално доминиране и прогресия в ОМЛ.

Дали пълзълът на 5q-синдрома е разрешен, остава да бъде изяснявано, но тези изследвания прекрасно се допълват, разкривайки, че хаплоинсуфициентията на RPS14 и на miR145 и miR146a води до всички известни фенотипни прояви на 5q-синдрома (Фиг.3).

Въпреки, че 5q-синдромът се приема за подтип МДС с нисък риск, едно изследване на Jädersten et al (8) показва, че при част от пациентите се наблюдават мутации на TP53. Тези пациенти показват незадоволителен клиничен и цитогенетичен отговор към леналидомид и по-висок риск от трансформация в ОМЛ. Нивото на p53 нараства в хода на прогресия на заболяването.

Тези данни са още едно доказателство за голямата хетерогенност на МДС, дори в отделните подтипове.

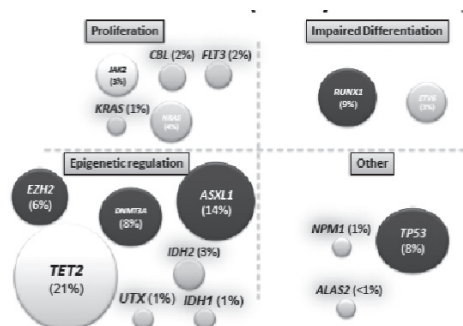


Фиг. 3. Патогенеза на 5q- синдрома.

Генни мутации при МДС

Различни молекулярни дефекти вече се използват като маркери за диагноза, прогноза и лечение на МДС (9). Установени са множество мутации на гени от различни нива на регулация на вътреклетъчни

пътища: TET2, ASXL1, RUNX1, TP53, CBL, JAK2, RAS (Фиг.4). Тяхната честота варира и явно зависи от типа МДС. SF3B1 е установена в 20% от изследваните случаи с МДС, но с особено висока честота сред пациентите с ринг сидеробласти (53-82 {65%}) (10). SF3B1 мутациите са асоциирани с подтискане на ключови гени, включително от митохондриални пътища. Клинично, пациентите с SF3B1 мутации се характеризират с дискретна цитопения и по-продължителна свободна от събития преживяемост, в сравнение със случаите без мутации.



Фиг. 4. Молекулярни нарушения при МДС.

Друга мутация, среща се по-често при пациенти с МДС е TET2 мутацията (19%-26%), която стига до 58% в случаите на МДС/МПН (11). Клиничното значение на тази мутация е тема на дебати. Наскоро Френската МДС група докладва, че TET2 мутациите са свързани с по-добър отговор на лечение с азацитидин, но без това да е свързано със значима разлика в продължителността на отговора или общата преживяемост (12).

Спектърът на соматичните генни мутации при МДС продължава да се разширява, но до момента остава неясно значението им за прогнозата. Bejar et al (13) анализират 439 проби от пациенти с МДС и търси асоциация на мутационния статус с различни клинични параметри, включващи цитопении, процента бласти и общата преживяемост. Установяват, че мутации в EZH2, ASXL1, TP53, RUNX1 имат независима от IPSS лоша прогноза по отношение на общата преживяемост. DNMT3A мутациите са също асоциирани с лоша, независима от IPSS и кариотипа прогноза както при МДС, така и при ОМЛ (14).

Предстои инкорпорирането на тези и други нови прогностични маркери в системите за определяне на риска при МДС.

Прогностични модели

Прогностичните системи са ключ към точната диагноза и избор на терапия при МДС. Последното десетилетие се наблюдава значителен напредък в усъвършенстването на схемите за класификация

и стадиране, което отразява нарастващите ни познания и разбиране за това заболяване. Най-широко използваната в клиничната практика прогностична скоринг система е IPSS (15). Прилагането и през годините обаче, разкри редица ограничения: неприложимост при клинични ситуации, като вторичен или вече лекуван МДС; неотчитане на степента на периферна цитопения, особено тромбоцитопения; по-голяма тежест на процента бласти в сравнение с високия цитогенетичен риск; ограничения брой кариотипи; неотчитане на коморбидностите както и на някои биомаркери с прогностично значение, като фиброзата в костния мозък или високия серумен феритин. Всички тези недостатъци се оказаха стимул за редица изследователи да предложат нови стратификационни системи.

Malcovati et al (16) предлагат базирана на СЗО класификацията - "прогностична скоринг система (WPSS)." Тя представлява динамичен прогностичен модел, основан на три рискови фактора: кариотип, тип МДС, според СЗО класификацията и трансфузионни нужди. Този модел осигурява прогностична информация в хода на заболяването, отчитайки връзката между често оценявани показатели при проследяването на пациентите с МДС. WPSS стратифицира пациентите в пет категории със значима разлика в преживяемостта и трансформацията в ОМЛ.

През 2008 година Kantarjian et. al. от MDACC (17) предлагат генерализиран модел за оценка на риска за пациенти с МДС. В резултат на мултивариационен анализ са определени рисковите фактори с прогностично значение: лош перформанс статус, напреднала възраст, тромбоцитопения, анемия, повишен брой бласти в костния мозък, левкоцитоза, аномалии на хромозома 7 или комплексен кариотип, трансфузионна зависимост. Пациентите са разделени в четири прогностични групи. Прилагането на новия модел при пациенти вече стадиран по IPSS, разкрива високо прогностичната стойност

на модела във всяка подгрупа.

През 2012 година бе публикувано ново предложение за ревизирана IPSS (R-IPSS) (18). Обработена е богата база данни от няколко международни институции като броят на пациентите, включени в този анализ е 7012, в сравнение с 816 при създаването на IPSS. В новия прогностичен модел са използвани различни клинични параметри със статистическа тежест. Цитогенетичните нарушения, процента бласти в костния мозък и цитопениите остават базата на новата система. Новите компоненти на системата включват: 5 вместо 3 цитогенетични прогностични групи (Schanz et al (4)), разделяне на ниския процент бласти и тежестта на цитопениите. Пациентите са разделени в 5, вместо в 4 прогностични категории, определящи прогнозата на пациентите с МДС много по-точно от IPSS (Табл.1.).

Терапевтични възможности

Пациентите с МДС представляват особено терапевтично предизвикателство поради сложността на заболяването, съпътстващите коморбидности и ниския толеранс към интензивни форми на лечение. Затова, изборът на лечение трябва да е съобразен с типа МДС, очакванията за преживяемост и трансформация в ОЛ, специфичните молекулярни нарушения, физическото състояние и възрастта на пациента. През последното десетилетие се наблюдава значително разширяване на терапевтичните възможности за пациентите с МДС, много от тях обаче все още са обект на противоречиви оценки.

Хелираща терапия при МДС

Използването на желязо хелираща терапия при таласемия майор води до подобряване на преживяемостта, но ползата и при пациенти с МДС остава несигурна. Доказано е, че трансфузионно зависимите пациенти имат значимо по-кратка

Таблица. 1. Ревизирана международна прогностична скоринг система

	0	1	1.5	1.5	2.5	3.5	5
Цитогенетичен риск	Много добър		Добър		Среден	Лош	Много лош
Бласти	<5%			5-10%	11-30%		
Hb	≥10						
Plt	≥100		<100				
ANC	≥0.8	<0.8					

Прогностичен индекс (за възрастни до 70 години)

Много нисък: 0 – 2, Добър: >2 – 3.5, Среден: >3.5 – 5, Висок: >5 – 6, Много висок: >6

За отчитане на възрастта: (Възрастта в години - 70)х0.04 като резултатът се добавя към другите параметри.

преживяемост (19). Пациенти с високо ниво на феритин имат не само по-кратка преживяемост, но и по-висока степен на трансформация в ОМЛ (Sanz et al, ASH, 2008). Експерименти върху животински модел (Chan et al на ASH 2010) показват, че желязното натрупване, водейки до освобождаване на реактивни кислородни радикали, активира вътреклетъчни пътища свързани с ОМЛ трансформация. Обсъжда се също ролята на желязото в активиране на имуносупресивни механизми. Все още липсват данни от рандомизирани проучвания за ефекта на хелиращата терапия при пациенти с МДС. Най-голям брой пациенти са набрани в EPIC проучването (341) (20), което демонстрира подобра преживяемост на пациентите, получаващи хелираща терапия. Очаква се резултатите от фаза III рандомизирано клинично проучване - TELESTO да дадат отговор на въпроса за ползата от хелиращата терапия при пациенти с нисък и интермедиерен риск МДС.

Леналидомид в лечението на МДС

Lenalidomide е утвърден за лечение на пациенти с анемия и нисък риск МДС, характеризиращи се с делеция 5q. Последните години се поставя въпроса за използването на lenalidomide и при други форми на МДС. При пациенти с нисък риск МДС без делеция 5q Lenalidomide води до трансфузионна независимост при 26% от пациентите (21). Нов подход за подобряване ефективността на lenalidomide е комбинирането му с други медикаменти. Комбинирането на lenalidomide и azacitidine при висок риск МДС води до отговор на лечението при 67% от пациентите (22). Тромбоцитопения (ТРО)

Тромбоцитопенията е сериозен клиничен проблем при МДС. С навлизането на ТРО миметиците - romiplostim и eltrombopag, се откриват нови терапевтични възможности за тези пациенти. Безопасността и ефикасността на romiplostim са изследвани при 41 пациента с нисък риск МДС и тромбоцитопения (23). Продължителен отговор е наблюдаван у 19 пациента (46%). По време на проучването двама от пациентите трансформират в ОЛ. Несъмнено, рискът от прогресия в ОЛ налага провеждане на рандомизирано, плацебо контролирано проучване с по-продължително проследяване. Пациентите с висок риск МДС са също потенциални кандидати за лечение с ТРО миметици. Вече протичат проучвания, оценяващи ефекта на romiplostim и подобни агенти в комбинация с lenalidomide и хипометилиращи агенти.

Хипометилиращи агенти - нови възможности

Днес хипометилиращите агенти са стандарт в лечението на висок риск МДС. Този вид терапия бе наложена след удобряването на 5-azacitidine в САЩ, въз основа на резултатите от CALGB проучването (24). По-късно редица други проучвания демонстрират предимството на 5-azacitidine по отношение на общата преживяемост. Приложението на decitabine, в сравнение с поддържаща терапия, води до отговор в 17% срещу 0%, тенденция за удължаване на времето до трансформация в ОМЛ, но без значим ефект върху общата преживяемост (25).

По-голям интерес представлява използването на азануклеотиди при нисък риск МДС. В редица клинични проучвания са изпробвани различни схеми и дози: петдневен режим на 5-azacitidine, седемдневно приложение на орален 5-azacitidine. Мултицентрово фаза две проучване на decitabine при пациенти с нисък риск МДС (Garcia-Manero et al) показва общ отговор в 22% и трансфузионна независимост в 60% от пациентите.

С цел подобряване на резултатите от лечението с азануклеотиди са проведени редица проучвания с комбинация на азацитидин с други агенти. Такива комбинации са: хипометилиращи агенти с хистон деацетилазния (HDAC) инхибитор валпроева киселина, 5-azacitidine с карбаматен HDAC инхибитор MS-275 (entinostat), 5-azacitidine и vorinostat, 5-azacitidine и suberoylanilidehydroxamic acid (SAHA), азануклеотиди и clofarabine.

МДС е група заболявания, характеризираща се с голяма биологична и клинична хетерогенност, представляваща сериозен терапевтичен проблем. Терапевтичните възможности непрекъснато се разширяват, давайки основание за надежда и оптимизъм.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Panoskaltsis N. Dendritic cells in MDS and AML--cause, effect or solution to the immune pathogenesis of disease? *Leukemia*. 2005 Mar;19(3):354-7.
2. Allampallam K, Shetty V, Mundle S, et al. Biological significance of proliferation, apoptosis, cytokines, and monocyte/macrophage cells in bone marrow biopsies of 145 patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol*. 2002;75:289-297.
3. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4385-95.
4. Schanz J, Tschöbner H, Sole F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 30:820-829, 2012

5. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008;451(7176):335-339.7.
6. Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2567-76.
7. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):49-58.
8. Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15):1971-9.
9. Bejar R, Levine R, Ebert BL .Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes.*J Clin Oncol*.2011 Feb 10;29(5):504-15.
10. Papaemmanuil E, Cazola M, Boulwood J, et. al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*, 2011 Oct 13;365(15):1384-95.
11. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation of TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*, 2009;360(22):2289-2301.
12. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias.*Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1147-52.
13. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. *N Engl J Med*. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes.2011 Jun 30;364(26):2496-506.
14. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes.*Leukemia*. 2011 Jul;25(7):1153-8
15. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079-2088.
16. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2007;25(23):3503-3510.
17. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer*.2008 Sep 15;113(6):1351-61.
18. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes.*Blood*. 2012 Sep 20;120(12):2454-65.
19. Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7594-603.
20. Gattermann N, Finelli C, Porta MD, et al; EPIC study investigators. Deferasirox in iron-overloaded patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes: Results from the large 1-year EPIC study. *Leuk Res*. 2010 Sep;34(9):1143-50.
21. Raza A, Reeves JA, Feldman EJ, et al. Phase 2 study of lenalidomide in transfusion-dependent, low-risk, and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes with karyotypes other than deletion 5q.*Blood*. 2008 Jan 1;111(1):86-93.
22. Sekeres MA, O'Keefe C, List AF, et al. Demonstration of additional benefit in adding lenalidomide to azacitidine in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 2011 Jan;86(1):102-3.
23. Kantarjian H, Fenaux P, Sekeres MA, et al. Safety and efficacy of romiplostim in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome and thrombocytopenia. *J Clin Oncol*. 2010;28:437-44.
24. Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, et al; Cancer and Leukemia Group B. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B.*J Clin Oncol*. 2006 Aug 20;24(24):3895-903.
25. Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer*. 2006 Apr 15;106(8):1794-803.

Адрес за кореспонденция:

Илина Мичева
УМБАЛ "Света Марина"
Клиника по Хематология
Ул. "Христо Смирненски" 1
Варна, 9010
ilinamicheva@gmail.com
Тел: 0896 262300

КАКВО НОВО В ЖЕЛЯЗО-ХЕЛАТИРАЩАТА ТЕРАПИЯ?

Г. Михайлов, М. Рангелова, Ст. Тошков, М. Генова, Г. Балаценко,
В. Хрисчев, С. Ахмед

Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания (НСБАЛХЗ),
София

WHAT IS NEW IN THE IRON - CHELATING THERAPY

G. Mihaylov, M. Rangelova, St. Toskov, M. Guenova, G. Balatzenko,
V. Chrishev, C. Ahmed

National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Резюме. Натрупването на желязо е неизбежно следствие на трансфузионната терапия, която се прилага при различни анемии. Желязното свръхобременяване без ефективна желязо-хелатираща терапия (ЖХТ) при тези заболявания би довело до значителна болестност и смъртност. Въпреки че отстраняването на желязото от организма е водещ ефект на ЖХТ, някои публикации представят данни, че ЖХТ може да доведе до хематологичен отговор при някои пациенти с различни анемии. Друг цялостен анализ проучва ефикасността на ЖХТ върху чернодробната фиброза при пациентите с бета-таласемия. Настоящият доклад има за цел да обобщи някои от последните данни за ЖХТ при различни анемии.

Ключови думи: натрупване на желязо, желязо-хелатираща терапия (ЖХТ), анемия, хематологичен отговор, чернодробна фиброза, бета-таласемия

Summary. Iron overload is an inevitable consequence of transfusion therapy for a variety of underlying anemia. Iron overload, without effective chelation will lead to significant morbidity and mortality. Despite removing the iron from the body some reports suggested that iron chelation can go further - there is data which indicated that iron chelation therapy could lead to hematological responses in some patients with different anemia as well as a comprehensive analysis was published meaning to investigate efficacy of chelation therapy on liver fibrosis in B-thalassemia patients. Current report aimed to summarize some of the latest data on iron chelation in a variety of underlying anemia.

Key words: iron overload, chelation, anemia, hematological response, liver fibrosis, B-thalassemia

Въведение

Трансфузионната терапия за лечение на различни анемии неизбежно води до натрупване на желязо (хемосидероза), тъй като тялото не е в състояние да отделя излишното желязо. Излишъкът на желязо (което може да се открие в кръвообращението като несвързано с трансфери на желязо или под формата на свободно плазмено желязо, LPI) причинява увреждане на жизненоважни органи като черен дроб и сърце [1,2].

Желязното свръхобременяване и произтичащите от това усложнения могат да се проявят при много различни анемии, като таласемия майор, сърповидно-клетъчна анемия (СКА), миелодиспластичен синдром (МДС) и др. Причина за желязното свръх-товар са както хемотрансфузиите, така и увеличената стомашно-чревна абсорбция на желязо в резултат на неефективната еритропоеза [1,3,4]. Неблагоприятните последици от натрупването на желязо са разнообразни

и варират от забавяне на растежа при децата до сърдечна дисфункция, която може да бъде животозастрашаващо усложнение, ако не се лекува правилно [5-8]. При таласемия майор повече от 50% от всички смъртни случаи при тази група пациенти се дължат на сърдечни усложнения [5,7,9]. Освен това, без адекватно отстраняване на излишното желязо, значително намалява продължителността на живота при пациентите с това заболяване [9]. Натрупването на желязо води до сериозно увреждане на органите, което при липса на ефективна ЖХТ, неминуемо води до повишена болестност и смъртност.

Преглед на наличните хелатори на желязото

Кратко обобщение на характеристиките и установени показатели за проследяване при наличните хелатори на желязото са представени в табл.1.

Таблица 1. Характеристики на наличните хелатори на желязото.

	Deferoxamine (DFO)	Deferiprone (DFP)	Deferasirox (DFX)
Дозировка	20-60 mg/kg/ден	50-100 mg/kg/ден	20-40 mg/kg/ден
Полуживот	20 мин.	2-3 часа	8-16 часа
Приложение	Подкожно или венозно	Перорално, три пъти дневно	Перорално, веднъж дневно
Елиминиране на желязото	Урина/фецес	Урина	Фецес
Препоръки за мониториране на терапията	Тримесечно: нива на серумен феритин Годишно: изследване на слух/зрение, оценка на желязото в черен дроб и сърце при пациенти на възраст ≥ 10 години	Седмично: ПКК с диференциално броене Тримесечно: нива на серумен феритин Годишно: оценка на желязото в черен дроб и сърце при пациенти на възраст ≥ 10 години Други: ALT нива месечно за 3-6 мес., след което на 6 мес.	Проследяване: брой хемотрансфузии Месечно: нива на серумен феритин, серумен креатинин и ALT; протеинурия Годишно: оценка на желязото в черен дроб и сърце при пациенти на възраст ≥ 10 години, изследване на слух/зрение, растеж при децата
Предимства	Продължителен опит Обратимост на сърдечната патология Комбиниране с DFP	Перорален прием Комбиниране с DFO	Перорален прием Приложение веднъж дневно Еквивалентна ефективност с DFO при доза ≥ 20 mg/kg/ден Данни от продължително проследяване на ефективност при отстраняване на желязо от сърце и черен дроб
Недостатъци	Изисква непрекъсната инфузия Лошо придържане към терапията Потенциална токсичност по отношение на слух, зрение, кости	Може да не постигне отрицателен желязен баланс при доза 75 mg/kg/дн. Риск от агранулоцитоза Нужда от проследяване на ПКК	Нужда от мониториране на бъбречна функция Може да не постигне отрицателен желязен баланс при ниските дози

Deferoxamine (DFO)

Deferoxamine (DFO) е на разположение в клиничната практика повече от 40 години. Многобройни проучвания са показали, че при пациенти с желязно свръхобременяване, които получават редовно хелатираща терапия с DFO, се получават значими клинични ползи, дължащи се на намаляване на желязния товар, в това число и значително подобрене в общата преживяемост [10, 11].

Въпреки това, ефективността на ЖХТ е силно зависима от придържането към нея. В едно проучване е установено, че пациенти с бета-таласемия, които са получавали 225-300 инфузии DFO годишно, имат 95% шанс за преживяемост до 20-годишна възраст и 90% шанс до 30-годишна възраст. За разлика от тях, тези с по-малък брой на годишните инфузии с DFO (0-75) имат отчетена преживяемост от 20% на 20-годишна възраст и

0% на 30-годишна възраст [10]. Лечението с DFO изисква големи усилия и е неудобно, тъй като има нужда от редовни подкожни инфузии в рамките на 8-12 часа, 5-7 дни в седмицата, което често води до незадоволително придържане към терапията [12], особено при деца и юноши. Недостатъците на хелатиращата терапия с DFO са довели до търсене на ефективни перорални хелатори с добър профил на поносимост.

Deferiprone (DFP)

Deferiprone (DFP) е желязен хелатор с трикратен прием, който навлиза на фармацевтичния пазар в Европа през 1999 г., а получава одобрение от FDA в САЩ през 2011 г. DFP е показан за лечение на желязно свръхобременяване при пациенти с таласемия майор, когато лечението с DFO е противопоказано или недостатъчно [13]. Въпреки това,

използването на DFP е ограничено, което отчасти се дължи на появата на сериозни нежелани събития по време на лечение, като неутропения и по-рядко, агранулоцитоза [14,15]. DFP се използва най-често в комбинация с DFO за пациенти с желязно свръхобременяване и свързани с това сериозни сърдечни усложнения. Въпреки наличието на DFO и DFP, някои пациенти с голям брой хемотрансфузии не са в състояние да постигнат успешно желязо-хелатиране, което най-вероятно се дължи на лошо придържане към монотерапията с DFO или комбинираната терапия с DFO и DFP.

Deferasirox (DFX)

Deferasirox (DFX) е разработен в отговор на значимата клинична необходимост от хелатор, който е удобен, ефективен и се понася добре от пациентите. DFX е модерен перорален хелатор с висок афинитет и селективност за желязо. Активната молекула на DFX (N-substituted bis-hydroxyphenyl-triazole) е силно липофилна и 99% е протеин-свързвана [16]. Той е тризъб лиганд, който свързва желязото с висок афинитет в отношение 2:1. Две молекули DFX са необходими за формиране на стабилен комплекс с всеки атом желязо (Fe 3+). DFX има елиминационен полуживот от 8-16 часа, поради което плазмените нива се поддържат в терапевтичните граници за период от 24 часа. DFX предоставя 24 часово покритие с еднократен дневен прием [17,18], осигурявайки по този начин стабилна защита от токсичното свободно желязо [19].

Ефективността на ЖХТ върху чернодробната фиброза

При трансфузионно зависимите пациенти желязото се натрупва основно в черния дроб. Натрупването на излишното желязо в черния дроб може да доведе до увреждане на тъканите, образуване на колаген и портална фиброза в рамките на 2 години от началото на трансфузионната терапия. В крайна сметка това води до цироза и множество други органични увреди [20,21]. В допълнение към задълбочаващите се последици от желязното свръхотвар върху чернодробната фиброза, натрупването на желязо, придружено с хепатит С вирусната (HCV) инфекция, има синергичен ефект върху чернодробната фиброгенеза. [22,23] Наскоро бяха публикувани данни, показващи, че лечението с deferasirox за период от поне 3 години се свързва със стабилизиране или подобрене на чернодробна фиброза и хистологично потвърденото некротично възпаление, както и намаление в нивата на ALT при пациенти с бета-таласемия с желязно свръхобременяване. Това подобрене се наблюдава както при пациенти, които отговарят на критериите за отговор въз основа оценка концентрацията на желязо в черния дроб (LIC),

така и при тези, които не отговарят на тези критерии. Нещо повече, подобренето се наблюдава независимо от доказателства за предишна експозиция на HCV (оценено въз основа на наличието на анти-HCV антитела). Това е първият анализ, който показва регресия на фиброзата при пациенти с бета-таласемия по време на ЖХТ. [24]

219 пациенти са били включени в този анализ като изходните резултати за фиброзата, оценени по Ishak варират от 0 до 6. От всички пациенти в този субанализ, 55.7% (n = 122) постигат стабилизиране (промяна от -1, 0 или +1), а 26.9% (n = 59) постигат подобрене (намаление от 2 или повече) по отношение развитието на фиброза, оценено по Ishak. От друга страна, изходните резултати, оценяващи некротично възпаление по Ishak, варират от 0 до 8. В края на проучването, некротичното възпаление, оценено по Ishak отбелязва подобрене със средна стойност от -1.3 (95% доверителен интервал: -1.5 до -1.0, p<0.001) при всички пациенти като средната абсолютна промяна е -1.5 (95% доверителен интервал: -1.8 до -1.1, p<0.001) при пациентите с терапевтичен успех (оценен въз основа на промяната в LIC) и -0.8 (95% доверителен интервал: -1.2 до -0.4, p<0.001) при пациентите с терапевтичен неуспех (оценен отново въз основа на промяната в LIC). Некротичното възпаление, оценено по Ishak отбелязва подобрене както при HCV-позитивните (средна абсолютна промяна -1.9 ± 2.2; p<0.001), така и при HCV-негативните пациенти (средна абсолютна промяна -1.1 ± 1.7; p<0.001). Освен това се наблюдава намаление в средните серумни нива на ALT (показател за хепатоцелуларна увреда) от 40.9 ± 37.8 IU/L до 29.6 ± 31.2 IU/L (средна абсолютна промяна -11.3 ± 34.6 IU/L, p<0.001; средна относителна промяна -7.4%, p=0.148). Промените в серумния ALT отразяват промените в LIC със статистически значимо намаление на серумните нива на ALT, наблюдавано само при пациентите с терапевтичен успех, оценен въз основа на промяната в LIC (средно абсолютното изменение 21.5 ± 35.0 IU / L, p<0.001). Значимо увеличение от 6.8 ± 25.2 IU/L (p<0.022) е наблюдавано в групата на пациентите с терапевтичен неуспех, оценен отново въз основа на промяната в LIC.

Цялостното подобрене на чернодробната фиброза и некротичното възпаление при лечение с deferasirox, отразено в това проучване е наистина впечатляващо сравнено с други публикации в литературата. Наистина, има ограничени данни в подкрепа на способността на някое терапевтично средство активно да обърне хода на чернодробната фиброза. [25,26,27,28,29] В проучване при 36 пациенти с генетична хемохроматоза, регресия на фиброзата (определена по система за оценка METAVIR) се наблюдава в почти половината от пациентите след флеботомия след средно 9.7 ±

5.2 години. [30,31] Регресия на цирозата също се наблюдава при пациенти с бета-таласемия след трансплантация на костномозъчни стволови клетки. [32] Малки проучвания с deferiprone (N = 17-56) не са показали значима промяна във фиброзата при пациенти с бета-таласемия, лекувани в продължение на около 3 години. [33,34] Други проучвания показват, че лечението с deferiprone е свързано с прогресията на фиброзата при пациенти с бета-таласемия. [35] Ранно проучване с deferoxamine при девет пациенти с бета-таласемия показва стабилизиране на чернодробна фиброза по време на лечение, продължило над 7 години. [36] По-скорошно проучване в по-голяма кохорта от пациенти (n=32, предимно с таласемия майор), лекувани с deferoxamine в продължение на поне 2 години, показва стабилизиране на фиброзата с годишен темп на прогресия от 0.13 ± 0.50 . [37] Тези наблюдения повдигат нови въпроси за механизмите, по които deferasirox води до подобрение на чернодробна фиброза. Резултатите от анализа, описан по-горе показват, че в основата на този механизъм не може да стои вторичен ефект от намаляване тежестта на чернодробното желязно натоварване. Този ефект може да се дължи на факта, че deferasirox се концентрира и се екскретира чрез жлъчната система [38], с потенциала на интрахепаталния пренос, който може би улеснява този специфичен фармакологичен ефект на deferasirox или на неговите метаболити върху патофизиологичните механизми, които модулират фиброзата. Освен това, последните проучвания показват инхибиторен ефект на deferasirox върху транскрипционен нуклеарен фактор αB [39] - протеин, който също е доказано, че участва в развитието на фиброза в белите дробове. [40] Необходимо са допълнителни молекулярнобиологични проучвания, за да се изследват тези хипотези.

Хематологичен отговор при ЖХТ

Има някои данни, които показват, че ЖХТ може да има и други ефекти освен извличане на желязо от организма. Намаление в необходимостта от кръвопреливане/ подобрение в хематологичните параметри, свързано с ЖХТ при трансфузионно зависими пациенти, включително и такива с миелодиспластичен синдром (МДС).

Тези данни са ограничени до доклади за отделни случаи и малки проучвания. Подробното проучване на тези наблюдения е направено при голяма група пациенти, при които се оценява хематологичен отговор към deferasirox в кохорта от пациенти с желязно свръхобременяване и МДС, включени в проучването EPIC (проспективно, 1-годишно, мултицентрово, отворено, фаза IIIb проучване), като се използват критериите от 2006 г. на Международната работна група. Този ана-

лиз показва, че лечението с deferasirox за период до 1 година може да доведе до подобряване на хематологичните параметри при някои пациенти с МДС. 247, 100 и 50 пациенти без друго съпътстващо лечение на миелодиспластичния синдром са допуснати за оценка и анализ на еритроиден, тромбоцитен и неутрофилен отговор. Съответно еритроиден, тромбоцитен и неутрофилен отговор е наблюдаван при 21.5% (53/247), 13.0% (13/100) и 22.0% (11/50) от пациентите с медиана, отчетена на 109, 169 и 226 дни. [41]

Deferasirox се препоръчва в начална доза от 20 mg/kg/ден за пациенти, лекувани с 2-4 единици/месец (7-14 ml/kg/месец) еритроцитна маса. Начални дози от 10 или 30 mg/kg/ден се прилагат при пациенти с по-малко или повече хемотрансфузии. Корекция на дозата от 5 или 10 mg/kg/ден (в диапазона 0-40 mg/kg/ден) се разрешава въз основа на 3-месечно отчитане на серумния феритин и маркери за оценка на безопасността. Дозата на deferasirox е подобна във всяка група, както и при пациентите с хематологичен отговор и тези без такъв. Средната експозиция на deferasirox е сходна във всяка група, с изключение на групата на пациентите, получили тромбоцитен отговор, които са имали значително по-кратка медиана на експозицията в сравнение с пациентите без тромбоцитен отговор (191 спрямо 362 дни, $p=0.016$). Средното намаление на серумния феритин е по-голямо в групата на пациентите с хематологичен отговор в сравнение с тези без хематологичен отговор в края на проучването, въпреки че тези разлики не са статистически значими.

Резултатите са в съответствие с няколко доклада в литературата случаи, както и малки проучвания, описващи хематологични подобрения, включително прекъсване на хемотрансфузиите при пациенти с МДС, лекувани с deferasirox. [42-47] Интересното е, че в един от случаите наблюдаваните подобрения в трансфузионните изисквания и нивата на хемоглобина след 3 месеца на лечение с deferasirox изчезват след прекъсване на терапията и се получават отново след подновяване приложението на deferasirox. [47]

Механизмът, който стои в основата на подобренията в хематологичния отговор с deferasirox все още предстои да бъде изяснен. Намаляването на оксидативния стрес, състояние, което води до инхибиращ ефект върху еритроидната и хемопоетичната функция, [56] може да бъде възможно обяснение за наблюдаваното хематологично подобрение. [45,47,57,58] Тази хипотеза е подкрепена от способността на deferasirox да осигури 24-часово трайно потискане на LPI [59] и значимо да намали свободните радикали. [60] In vitro и in vivo данни в левкемични клетъчни линии и периферните мононуклеарни клетки, събрани от пациенти с МДС са показали инхибиторните ефекти

на deferasirox върху активността на нуклеарен фактор кВ (NF-кВ). [39] Този протеин е доказано, че е активиран конституционално в проби от костен мозък на пациенти с МДС [61] и е ангажиран в няколко клетъчни процеси, включително клетъчната пролиферация и диференциация, както и потискане на апоптозата. [62] Това потискане не се наблюдава нито при deferohamine, нито при deferiprone, което насочва към предположението, че наблюдаваният инхибиторен ефект може да бъде независим от ефекта на хелаторите за извличане на желязото. [39] Предвид факта, че хематологични отговори са наблюдавани с deferohamine и deferiprone, макар и при ограничени групи пациенти, [63,64] значението на NF-кВ по отношение на хематологичния отговор е несигурно. Нивата на NF-кВ не са оценени в това проучване, но по-голямо намаление на серумните нива на феритин, наблюдавани при пациентите с хематологичен отговор в това проучване подкрепят в по-голяма степен ролята на намаляването на желязото като възможен механизъм. Алтернативни механизми могат да включват други фармакологични ефекти на deferasirox върху хемопоезата, преразпределение на желязо от депата в посока хемопоетична тъкан [65] или ефект на неопластичен клон или на микросредата в костния мозък. [66]

Въпреки че deferasirox е одобрен за лечение на хронично свръхобременяване с желязо, поради кръвопреливане при пациенти с таласемия майор над 2 годишна възраст (когато лечението с deferohamine е противопоказано или недостатъчно) [53], наблюдаваните хематологични ефекти при пациентите с МДС остава да бъдат допълнително изяснени в бъдещи проучвания. Това е особено важно, като се има предвид, че трансфузионната зависимост се свързва с негативен ефект върху общата преживяемост [54], което вероятно се дължи на факта, че трансфузионната зависимост отразява тежко заболяване на костния мозък и води до свръхобременяване с желязо. Следователно, способността на лекарство като deferasirox да намалява необходимостта от хемотрансфузии може да има потенциално въздействие върху общата преживяемост на пациентите. Все пак, това може да бъде потвърдено само в проспективни рандомизирани проучвания.

Има ограничени данни за хематологично подобрене при пациенти с МДС, лекувани с deferohamine. Едно проучване при 11 пациенти показва намаление на трансфузионните нужди $\geq 50\%$ в 7/11 пациенти (64%), като пет пациенти (46%) стават трансфузионно независими. [48] Броят на тромбоцитите и неутрофилите се е увеличил съответно при 7/11 (64%) и 7/9 (78%) от оценените пациенти. Има публикувани дори още по-ограничени данни за хематологични подобрения с deferiprone – докладван случай на един пациент с ми-

елофиброза, който отбелязва увеличение нивата на хемоглобина след лечение с deferiprone. [49] Хематологично подобрене при ЖХТ е доказано и при други заболявания, включително миелофиброза [42,49,50,51] и апластична анемия. [46,52] Последното наблюдение показва, че ефектът от ЖХТ върху хематопоезата може да не бъде феномен, свързан със заболяването МДС.

Италианско ретроспективно мултицентрово проучване на Daniela Cilloni и колектив [55] ретроспективно дава оценка на хематологичния отговор в кохорта пациенти с хронични анемии с желязно свръхобременяване, които получават ЖХТ с deferasirox (DFX) или deferohamine (DFO) в 6 италиански хематологични центрове от 1993 до 2011. За да бъдат включени в проучването, 105 пациенти са получавали ЖХТ в продължение на поне 3 месеца. 30 пациенти са получавали deferohamine (6 първична миелофиброза, ПМФ; 3 апластична анемия, АА; 1 хронична миеломоноцитна левкемия, ХММЛ; 2 остра миелоидна левкемия, ОМЛ; 18 МДС), 68 - deferasirox (9 ПМФ, 5 АА, 3 ХММЛ, 51 МДС), а 7 - deferasirox след предхождащо лечение с deferohamine (1 ПМФ, 6 МДС). Средното серумно ниво на феритина по време на ЖХТ е 1983 ng/ml и не се различава значимо между двете кохорти ($p=0.8$). На пациентите по време на ЖХТ е прелята средно от 30 единици еритроцитна маса (40 в кохортата DFO и 24.5 в кохорта DFX, $p=0.001$). 25 от 105 са получавали терапия с еритропоетин (ЕПО) по време на ЖХТ, започната най-малко 6 месеца преди ЖХТ без значително клинично подобрене, трима пациенти са получавали JAK2 инхибитор, започнат най-малко 1 година преди ЖХТ. Пациентите, приемащи някаква терапия, която може да промени еритроидния отговор в т. ч. azacitidine, са били изключени, както и пациенти, лекувани с ЕПО по-малко от 6 месеца преди ЖХТ или JAK2 инхибитори или имunosупресивна терапия за по-малко от 12 месеца преди ЖХТ. Хематологичният отговор е оценен както следва: постигане на трансфузионна независимост от еритроцитна маса (пълнен хематологичен отговор) или хематологично подобрене за пациентите, показващи Hb увеличение от 1.5 g/dL или намаляване на хемотрансфузиите с 4 единици еритроцитна маса / 8 седмици (IWG 2006). 13 пациенти не са оценени, защото са получавали ЖХТ в продължение на по-малко от 3 месеца. 41 пациенти от 92 (42.7%) пациенти, които са били оценени, постигат хематологичен отговор. В детайли: 18 пациенти (19.5%) стават напълно трансфузионно независими; 6 пациенти (1 АА, 3 RARS, 1 RCMD, 1 ОМЛ) при лечение с DFO и 12 пациенти (3 АА, 2 RA, 3 RARS, 1 RAEBII, 1 ХММЛ, 2 ПМФ) при лечение с DFX. В допълнение, всички 4 АА пациенти, които постигат значима трансфузионна независимост, увеличават значимо броя на

тромбоцитите (средно 17,000/mm³ преди ЖХТ и 35,000 и 55,000 след 6 и 12 месеца на ЖХТ). Средното време за отговор е било 15 месеца за DFO и 3 месеца за DFX. 16 пациенти (17.3%) (6 RA, 4 RARS, 1 RCMD, 1 RAEB, 4 ПМФ) получават хематологично подобрене, определено като намаляване с 4 E / 8 седмици (5 в DFO и 11 в кохортата с DFX) след средно 6 месеца на DFO и DFX. Хематологично подобрене, определено като увеличение от 1.5 g/dL, се наблюдава при 7 пациенти (7.6%) (4 RA, 1 RARS, 1 RCMD, 1 ПМФ) след средно 6 месеца терапия с DFO и 3 месеца с DFX. Хематологичното подобрене не е тясно свързано с ефективното намаляване на серумния феритин (p=0.4).

Данните показват висок процент на пълни хематологични отговори, главно при пациенти с AA и RARS, но също така и при пациенти с по-висок риск МДС / ОМЛ, представляващи 11% от постигналите пълна трансфузионна независимост. 50% от пациентите с AA постигат трансфузионна независимост по отношение на еритроцитна и тромбоцитна маса.

Заклучение

Последни данни от анализи на клинични проучвания показват, че ползата от желязо-хелатиращата терапия (ЖХТ) се простира отвъд отстраняване на токсичното желязо от организма. Хелатирането с deferasirox за период от 3 години може да доведе до регресия или стабилизиране на чернодробната фиброза при 83% от пациентите с желязно натоварване и бета-таласемия. Публикуваните в литературата отделни клинични случаи и ретроспективни анализи, показват, че ЖХТ може да подобри хематологичните показатели при пациенти с различни анемични състояния. Остава необходимостта от допълнителни проучвания в тези насоки, които проспективно да оценят получените данни, както и да разкрият механизмите и предиктивните фактори, свързани с тези допълнителни предимства на ЖХТ.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, et al. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 2008;8:7-15
2. Hershko C, Link G, Cabantchik I. Pathophysiology of iron overload. *Ann NY Acad Sci* 1998;850:191-201
3. Pippard MJ, Callender ST, Warner GT, Weatherall DJ. Iron absorption and loading in beta-thalassaemia intermedia. *Lancet* 1979;2:819-21
4. Pootrakul P, Huebers HA, Finch CA, et al. Iron metabolism in thalassemia. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1988;23:3-8
5. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, et al. Survival and disease complications in thalassemia major. *Ann NY Acad Sci* 1998;850:227-31;
6. Kattamis C, Liakopoulou T, Kattamis A. Growth and development in children with thalassaemia major. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1990;366:111-17
7. Ladis V, Chouliaras G, Berdousi H, et al. Longitudinal study of survival and causes of death in patients with thalassemia major in Greece. *Ann NY Acad Sci* 2005;1054:445-50
8. Low LC. Growth of children with beta-thalassemia major. *Indian J Pediatr* 2005;72:159-64
9. Modell B, Khan M, Darlison M. Survival in beta-thalassaemia major in the UK: data from the UK Thalassaemia Register. *Lancet* 2000;355:2051-2
10. Gabutti V, Piga A. Results of long-term iron-chelating therapy. *Acta Haematol* 1996 ; 95 : 26 -36
11. Brittenham GM, Griffith PM, Nienhuis AW, et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. *N Engl J Med* 1994 ; 331 : 567 -73
12. Delea TE, Edelsberg J, Sofrygin O, et al. Consequences and costs of noncompliance with iron chelation therapy in patients with transfusion-dependent thalassemia: a literature review. *Transfusion* 2007 ; 47 : 1919 -29
13. Cappellini MD, Pattoneri P. Oral iron chelators. *Annu Rev Med* 2009;60:25-38
14. Ceci A, Baiardi P, Felisi M, et al. The safety and effectiveness of deferiprone in a large-scale, 3-year study in Italian patients. *Br J Haematol* 2002 ; 118 : 330 -6
15. Cohen AR, Galanello R, Piga A, et al. Safety and effectiveness of long-term therapy with the oral iron chelator deferiprone. *Blood* 2003 ; 102 : 1583 -7
16. Nick H, Acklin P, Lattmann R, et al. Development of tridentate iron chelators: from desferriethiocin to ICL670. *Curr Med Chem* 2003 ; 10 : 1065 -76
17. Nisbet-Brown E, Olivieri NF, Giardina PJ, et al. Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet* 2003 ; 361 : 1597 -602
18. Piga A, Galanello R, Forni GL, et al. Randomized Phase II trial of deferasirox (Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. *Haematologica* 2006 ; 91 : 873 -80
19. Daar S, Taher A, Pathare A, et al. Sustained protection from labile plasma iron (LPI) with the once-daily, oral iron chelator deferasirox (Exjade ® , ICL670) in iron-overloaded - thalassemia patients [abstract 1773]. *Blood* 2006; 108 (11)
20. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999; 341:1986-1995.
21. Kushner JP, Porter JP, Olivieri NF. Secondary iron overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2001;47-61.
22. Ardalán FA, Osquei MR, Toosi MN, et al. Synergic effect of chronic hepatitis C infection and beta thalassemia ma-

- for with marked hepatic iron overload on liver fibrosis: a retrospective cross-sectional study. *BMC Gastroenterol* 2004;4:17.
23. Angelucci E, Muretto P, Nicolucci A, et al. Effects of iron overload and hepatitis C virus positivity in determining progression of liver fibrosis in thalassemia following bone marrow transplantation. *Blood* 2002;100:17–21.
 24. DEUGNIER et al., Improvement in Liver Pathology of Patients With B-Thalassemia Treated With Deferasirox for at Least 3 Years; *GASTROENTEROLOGY* 2011;141:1202–1211
 25. Farci P, Roskams T, Chessa L, et al. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 2004;126:1740–1749.
 26. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349:825–832.
 27. Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000;132:517–524.
 28. Das K, Chowdhury A. Hepatic fibrosis: can we treat it clinically? *Trop Gastroenterol* 2008;29:76–83.
 29. Povero D, Busletta C, Novo E, et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process. *Histol Histopathol* 2010;25:1075–1091
 30. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289–293.
 31. Falize L, Guillygomarc'h A, Perrin M, et al. Reversibility of hepatic fibrosis in treated genetic hemochromatosis: a study of 36 cases. *Hepatology* 2006;44:472–477.
 32. Muretto P, Angelucci E, Lucarelli G. Reversibility of cirrhosis in patients cured of thalassemia by bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 2002;136:667–672.
 33. Wanless IR, Sweeney G, Dhillon AP, et al. Lack of progressive hepatic fibrosis during long-term therapy with deferiprone in subjects with transfusion-dependent beta-thalassemia. *Blood* 2002;100:1566–1569.
 34. Wu SF, Peng CT, Wu KH, et al. Liver fibrosis and iron levels during long-term deferiprone treatment of thalassemia major patients. *Hemoglobin* 2006;30:215–218.
 35. Olivieri NF, Brittenham GM, McLaren CE, et al. Long-term safety and effectiveness of iron-chelation therapy with deferiprone for thalassemia major. *N Engl J Med* 1998;339:417–423.
 36. Barry M, Flynn DM, Letsky EA, et al. Long-term chelation therapy in thalassaemia major: effect on liver iron concentration, liver histology, and clinical progress. *Br Med J* 1974;2:16–20.
 37. Berdoukas V, Bohane T, Tobias V, et al. Liver iron concentration and fibrosis in a cohort of transfusion-dependent patients on long-term desferrioxamine therapy. *Hematol J* 2005;5:572–578.
 38. Bruin GJ, Faller T, Wiegand H, et al. Pharmacokinetics, distribution, metabolism and excretion of deferasirox and its iron complex in rats. *Drug Metab Dispos* 2008;36:2523–2538.
 39. Messa E, Carturan S, Maffé C, et al. Deferasirox is a powerful NF- κ B inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from intracellular iron chelation and reactive oxygen species scavenging. *Haematologica* 2010;95:1308–1316.
 40. Fujimoto H, D'Alessandro-Gabazza CN, Palanki MS, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB in T cells suppresses lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:1251–1260.
 41. Gattermann N. et al. Hematologic responses with deferasirox therapy in transfusion-dependent myelodysplastic syndromes patients. *Haematologica* 2012. Published Ahead of Print on March 14, 2012, as doi:10.3324/haematol.2011.048546.
 42. Messa E, Cilloni D, Messa F, Arruga F, Roetto A, Saglio G. Deferasirox treatment improved the hemoglobin level and decreased transfusion requirements in four patients with the myelodysplastic syndrome and primary myelofibrosis. *Acta Haematol.* 2008;120(2):70–4.
 43. Capalbo S, Spinosa G, Franzese MG, Palumbo G. Early deferasirox treatment in a patient with myelodysplastic syndrome results in a long-term reduction in transfusion requirements. *Acta Haematol.* 2009;121(1):19–20.
 44. Okabe H, Suzuki T, Omori T, Mori M, Uehara E, Hatanano K, et al. Hematopoietic recovery after administration of deferasirox for transfusional iron overload in a case of myelodysplastic syndrome. *Rinsho Ketsueki.* 2009;50(11):1626–9.
 45. Badawi MA, Vickars LM, Chase JM, Leitch HA. Red blood cell transfusion independence following the initiation of iron chelation therapy in myelodysplastic syndrome. *Adv Hematol.* 2010;2010:164045.
 46. Oliva EN, Ronco F, Marino A, Alati C, Pratico G, Nobile F. Iron chelation therapy associated with improvement of hematopoiesis in transfusiondependent patients. *Transfusion.* 2010;50(7):1568–70.
 47. Breccia M, Loggisci G, Salaroli A, Cannella L, Santopietro M, Alimena G. Deferasirox treatment interruption in a transfusion-requiring myelodysplastic patient led to loss of erythroid response. *Acta Haematol.* 2010;124(1):46–8.
 48. Jensen PD, Heickendorff L, Pedersen B, Bendix-Hansen K, Jensen FT, Christensen T, et al. The effect of iron chelation on haemopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload. *Br J Haematol.* 1996;94(2):288–99.
 49. Smeets ME, Vreugdenhil G, Holdrinet RS. Improvement of erythropoiesis during treatment with deferiprone in a patient with myelofibrosis and transfusional hemosiderosis. *Am J Hematol.* 1996;51(3):243–4.
 50. Molteni A, Riva M, Speziale V, Morra E, Cappellini MD. Iron-chelation therapy in MDS/IMF patients: does it really impact on transfusion requirements? *Haematologica.* 2010;95(suppl 2):abst 1410.
 51. Di Tucci AA, Murru R, Alberti D, Rabault B, Deplano S, Angelucci E. Correction of anemia in a transfusion-dependent patient with primary myelofibrosis receiving iron chelation therapy with deferasirox (Exjade®, ICL670). *Eur J*

- Haematol. 2007;78(6):540-2.
52. Park SJ, Han CW. Complete hematopoietic recovery after continuous iron chelation therapy in a patient with severe aplastic anemia with secondary hemochromatosis. J Korean Med Sci. 2008;23(2):320-3.
 53. Deferasirox(Exjade®)Summary of Product Characteristic 2012, Available at EMA website: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000670/WC500033925.pdf
 54. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol. 2007;25(23):3503-10.
 55. Cilloni D. et al. High Rate of Erythroid Response During Iron Chelation Therapy in a Cohort of 105 Patients Affected by Hematologic Malignancies with Transfusional Iron Overload: An Italian Multicenter Retrospective Study. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011 118: Abstract 611
 56. Ghaffari S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. Antioxid Redox Signal. 2008;10(11):1923-40.
 57. Nishiuchi T, Okutani Y, Fujita T, Yoshida K, Ohnishi H, Haba R. Effect of iron chelator deferasirox on chronic anemia and thrombocytopenia in a transfusiondependent patient with myelodysplastic syndrome. Int J Hematol. 2010;91(2):333-5.
 58. Guariglia R, Martorelli MC, Villani O, Pietrantonio G, Mansueto G, D'Auria F, et al. Positive effects on hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndrome receiving deferasirox as oral iron chelation therapy: A brief review. Leuk Res. 2011;35(5):566-7.
 59. List AF, Baer MR, Steensma D, Raza A, Esposito J, Virkus J, et al. Deferasirox (ICL670; Exjade®) reduces serum ferritin (SF) and labile plasma iron (LPI) in patients with myelodysplastic syndromes (MDS). Blood. 2007;110(11):abst 1470.
 60. Ghoti H, Fibach E, Merkel D, Perez-Avraham G, Grisariu S, Rachmilewitz EA. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2010;95(8):1433-4.
 61. Braun T, Carvalho G, Coquelle A, Vozenin MC, Lepelletier P, Hirsch F, et al. NFkappaB constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. Blood. 2006;107(3):1156-65.
 62. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. Cancer Cell. 2004;6(3):203-8.
 63. Smeets ME, Vreugdenhil G, Holdrinet RS. Improvement of erythropoiesis during treatment with deferiprone in a patient with myelofibrosis and transfusional hemosiderosis. Am J Hematol. 1996;51(3):243-4.
 64. Jensen PD, Heickendorff L, Pedersen B, Bendix-Hansen K, Jensen FT, Christensen T, et al. The effect of iron chelation on haemopoiesis in MDS patients with transfusional iron overload. Br J Haematol. 1996;94(2):288-9.
 65. Vreugdenhil G, Smeets M, Feelders RA, van Eijk HG. Iron chelators may enhance erythropoiesis by increasing iron delivery to haematopoietic tissue and erythropoietin response in iron-loading anaemia. Acta Haematol. 1993;89(2):57-60.
 66. Capalbo S, Spinosa G, Franzese MG, Palumbo G. Early deferasirox treatment in a patient with myelodysplastic syndrome results in a long-term reduction in transfusion requirements. Acta Haematol. 2009;121(1):19-20.

Адрес за кореспонденция:

Георги Г. Михайлов
НСБАЛХЗ, София
ул. "Пловдивско поле" 6
тел.: +359 879 104 905
e-mail: geombulg@gmail.com

МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ МИЕЛОФИБРОЗА – ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, ПРОСЛЕДЯВАНЕ. РЕГИСТЪР НА ПАЦИЕНТИТЕ С МИЕЛОФИБРОЗА В БЪЛГАРИЯ

*Г. Михайлов, М. Рангелова, Ст. Тошков, М. Генова, Г. Балаценко,
В. Хрисчев, С. Ахмед*

Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания (СБАЛХЗ),
София

MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS. MYELOFIBROSIS - DIAGNOSTICS, MANAGEMENT, FOLLOW - UP. REGISTRY OF THE PATIENTS WITH OSTEOMYELOFIBROSIS IN BULGARIA

*G. Mihaylov, M. Rangelova, St. Toskov, M. Guenova, G. Balatzenko,
V. Chrishchev, C. Ahmed*

National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Резюме. Миелопролиферативните неоплазми (МПН) са разнородна група клонални нарушения, които произхождат от мултипотентните хемопоетични миелоидни прогениторни клетки. Разделят се на две групи - BCR-ABL1–положителни (хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) и BCR-ABL1–отрицателни (есенциална тромбоцитемия (ЕТ), полицетемия вера (ПВ), миелофиброза (МФ), хронична неутрофилна левкемия, хронична еозинофилна левкемия, хиперееозинофилен синдром, мастоцитоза).

Миелофиброзата е миелопролиферативна неоплазма, за която се знае, че е свързана с дисрегулация на JAK1 и JAK2 сигналните пътища, независимо от статуса по отношение на JAK2V617F мутацията.

Настоящият доклад има за цел да обобщи някои от последните данни, свързани с диагнозата, прогнозата и лечението на миелофиброзата, както и да постави въпроса за нуждата от национален регистър на пациентите с миелофиброза в България.

Ключови думи: миелопролиферативни неоплазми, миелофиброза, руксолитинб, национален регистър.

Summary. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a heterogeneous group of clonal disorders derived from multipotent hematopoietic myeloid progenitors. They are classified in two groups: BCR-ABL1–positive (chronic myeloid leukemia (CML) and BCR-ABL1–negative (essential thrombocythaemia (ET), polycythemia vera (PV), myelofibrosis (MF), chronic neutrophilic leukemia, chronic eosinophilic leukemia, hypereosinophilic syndrome, mastocytosis).

Myelofibrosis is a myeloproliferative neoplasm known to be connected with deregulation of JAK1 and JAK2 signaling pathways, regardless of their JAK2V617F mutation status.

Current report aimed to summarize some of the latest data on the diagnosis, prognosis and treatment of myelofibrosis and to raise the need for the creation of national registry of the patients with myelofibrosis in Bulgaria.

Key words: myeloproliferative neoplasms, myelofibrosis, ruxolitinb, national registry.

Въведение

През 1951 г. патогенетично свързаните полицетемия вера (ПВ), есенциална тромбоцитемия (ЕТ) и първична миелофиброза (ПМФ) са определени като миелопролиферативни нарушения, които в документ на СЗО от 2008 г. се класифицират вече като миелопролиферативни неоплазми (МПН).^[1] МПН са група клонални нарушения, които произхождат от мултипотентните хемопоетични

миелоидни прогениторни клетки. През 2005 г. при повечето пациенти с ПВ и в значителна част от пациентите с ЕТ и ПМФ са идентифицирани соматични мутации в JAK2-тирозин киназа (JAK2V617F). Последващите проучвания установяват допълнителни мутации в JAK-STAT пътя при някои пациенти с JAK2V617F МПН, което предполага, че активирането на този сигнален път е обединяваща черта на тази група заболявания.

Въпреки че откриването на мутации в JAK-STAT пътя е важно от патогенетична и диагностична гледна точка, все още остават важни въпроси свързани с ролята на този единичен алел в три свързани, но клинично различни заболявания, както и ролята на допълнителни генетични събития в патогенезата на МПН. Тези открития осигуриха основа за разработване на малки молекули, инхибитори на JAK2.[1]

- **Класификация.** *BCR-ABL1–положителни* (хронична миелоидна левкемия, ХМЛ) и *BCR-ABL1–отрицателни* (ЕТ, ПВ, миелофиброза (МФ), хронична неутрофилна левкемия, хронична еозинофилна левкемия, хиперееозинофилен синдром, мастоцитоза).[2]
- **Генетика.** В групата на BCR-ABL1-отрицателните МПН се наблюдава *нарушение в регулацията на JAK/STAT сигналните пътища (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription)*, като JAK2 V617F мутацията показва по-висока честота в подгрупите на ЕТ, ПВ и МФ, съответно: ЕТ 69%-79%, ПВ 89%-94% и МФ 47%-78%.[3,4,5]
- **Разпространение.** В стандартната европейска популация, по данни на INSEE (National Institute for Statistics and Economic Studies), честотата на разпространение за МФ, ПВ и ЕТ се равнява съответно на 0.5, 0.9 и 2.0 на 100,000.[6]

Миелофиброза

Миелофиброзата е клонално неопластично заболяване, което се характеризира с костномозъчна фиброза, спленомегалия и инвалидизиращи симптоми.[7,8] Средната възраст при поставянето на диагнозата е 67 години.[9]

Класификация

Миелофиброзата се разделя на първична МФ (ПМФ) и вторична МФ (миелофиброза след полицитемия вера или миелофиброза след есенциална тромбоцитемия).[7,8] 10-годишният риск от прогресия за ЕТ в МФ е < 4%, докато при ПВ той достига 10%.[10]

Диагноза

Съвременната диагноза на ПМФ се поставя на базата на критериите, установени от СЗО (2008), които отчитат хистопатологични, морфологични, клинични и молекулярноцитогенетични показатели.[11] Вторичната МФ трябва да отговаря на критериите на IWG-MRT (International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment).[12] Все пак, приложението на тези критерии в практиката се подлага на обсъждане. Например, основни диагностични трудности могат да възникнат при

диферинцирането на миелодиспластичния синдром (МДС) от ПМФ, както и между ЕТ и някои ранни форми на ПМФ (Wilkins et al, 2008; Beer et al, 2010, 2011). Освен това, наскоро се доказа, че повишено ниво на LDH не е специфично за първична миелофиброза (Beer et al, 2010). С оглед на тези ограничения се препоръчват диагностичните критерии, предложени от Campbell и Green (2006) за ПМФ (Табл. I), както и за миелофиброза след полицитемия вера и миелофиброза след есенциална тромбоцитемия (Табл. II).[13]

Таблица I. Диагностични критерии за първична миелофиброза: диагнозата изисква A1 + A2 и gba от B критериите.

A1	Фиброза на костния мозък ≥ 3 (по скала от 0–4).
A2	Патогенетични мутация (напр. в JAK2 или MPL), или отсъствие и на BCR-ABL1, и на реактивна причина за костно-мозъчна фиброза
B1	Палпаторно установена спленомегалия
B2	Необяснима анемия
B3	Левкоеритробластоза
B4	Еритроцити с форма на сълза (tear-drop)
B5	Конституционални симптоми *
B6	Хистологични данни за екстрамедуларна хемопоеза

* Тежки нощни изпотявания, загуба на тегло >10% за период от 6 месеца, необяснимо повишена температура (>37.5°C) или дифузни костни болки.

Таблица II. Диагностичните критерии за миелофиброза след полицитемия вера или миелофиброза след есенциална тромбоцитемия: диагноза изисква A1 + A2 и gba от B критериите.

A1	Фиброза на костния мозък ≥ 3 (по скала от 0–4).
A2	Предшестваща диагноза на ЕТ или ПВ
B1	Новоустановена палпаторно спленомегалия или увеличение в размерите на слезката ≥ 5 cm
B2	Необяснима анемия с 20 g/l намаление на хемоглобин в сравнение с изходното ниво
B3	Левкоеритробластоза
B4	Еритроцити с форма на сълза (tear-drop)
B5	Конституционални симптоми *
B6	Хистологични данни за екстрамедуларна хемопоеза

* Тежки нощни изпотявания, загуба на тегло >10% за период от 6 месеца, необяснимо повишена температура (>37.5°C) или дифузни костни болки.

Прогностични фактори при ПМФ

Вземането на терапевтични решения при ПМФ, особено определянето на необходимостта от алогенна трансплантация на стволови клетки (allo-SCT), изисква точна оценка на прогнозата при всеки отделен пациент. Доскоро най-широко използваната прогностична скала беше т. нар. Lille Score (Dupriez et al, 1996). Международната прогностична точкова система (International Prognostic Scoring System, IPSS) беше публикувана (Cervantes et al, 2009), за да отстрани недостатъците на последната въз основа на анализ на 1,054 пациенти. Тя оценява преживяемостта по време на поставяне на диагнозата въз основа на пет рискови фактори: възраст >65 години, концентра-

ция на хемоглобина $<100 \text{ g/l}$, левкоцити $>25 \times 10^9/\text{l}$, циркулиращи бласти $\geq 1\%$ и наличие на конституционални симптоми.[13]

Въз основа на присъствието на 0 (нисък риск), 1 (среден-1 риск), 2 (среден-2 риск) или 3 или повече (висок риск) от тези променливи се идентифицират четири рискови групи, при които няма припокриване в кривите на преживяемост. Отчетената средна преживяемост (месеци) в различните рискови категории е: при висок риск- 27 месеца (23-31), при среден-2 риск- 48 месеца (43-59), при среден-1 риск- 95 месеца (79-114) и при нисък риск- 135 месеца (117-181) (Табл. III). Въз основа използването на едни и същи пет прогностични променливи IPSS е променена (Passamonti et al, 2010b), за да може да бъде използвана по всяко време в хода на заболяването и е наречена Динамична международната прогностична точкова система (Dynamic International Prognostic

Scoring System, DIPSS) (Табл. III). По-нататъшно усъвършенстване води до създаването на DIPSS Plus (Gangat et al, 2011) с добавяне на три допълнителни независими рискови фактори - трансфузионна зависимост, неблагоприятни кариотипове (вкл.: +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, 11q23 пренареждане и сложни кариотипове) и брой на тромбоцитите $<100 \times 10^9/\text{l}$. Това дава на четирите прогностични групи още по-голяма степен на диференциране със съответните медиани на прогнозна преживяемост от 185, 78, 35 и 16 месеца (Табл. III). Въпреки че броят на молекулярните промени са показали, че оказват неблагоприятно въздействие върху прогнозата в т. ч. ниското ниво на JAK2V617F алела (Guglielmelli et al, 2011), и EZH2 мутационния статус (Guglielmelli et al, 2011), тези параметри все още не са включени в практическите прогностични точкови системи, макар в бъдеще това да е вероятно да се случи.[13]

Таблица III. Прогностични критерии

Променлива	IPSS	DIPSS
Възраст >65 години	✓	✓
Конституционални симптоми	✓	✓
Хемоглобин $<100 \text{ g/l}$	✓	✓
Левкоцити $>25 \times 10^9/\text{l}$	✓	✓
Циркулиращи бласти $\geq 1\%$	✓	✓
	По 1 точка всеки	По 1 точка всеки; Hb=2
DIPSS-Plus: добавя се 1 точка към DIPSS РИСКОВА ГРУПА* (нисък = 0; среден 1 = 1, среден 2 = 2 и висок риск = 3) в допълнение за:		
Тромбоцити $<100 \times 10^9/\text{l}$		
Нужда от трансфузия на еритроцитна маса		
Неблагоприятни кариотипове: +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p-, 11q23 пренареждане		

	IPSS		DIPSS		DIPSS-Plus	
Рискова група	Предиктори (n)	Средна преживяемост (години)	Предиктори (n)	Средна преживяемост (години)	Предиктори (n)	Средна преживяемост (години)
Нисък	0	11.3	0	Не се достига	0	15.4
Среден-1	1	7.9	1 или 2	14.2	1	6.5
Среден-2	2	4.0	3 или 4	4.0	2-3	2.9
Висок	≥ 3	2.3	4 или 6	1.5	≥ 4	1.3

*Забележка: това е рискова група, а НЕ сума от точки.

Терапевтични решения при ПМФ, особено по отношение използването на алогенна трансплантация на стволови клетки, трябва да се основават на прогнозата, определена от DIPSS Plus, тъй като това е система, валидирана за всеки времеви интервал от развитието на заболяването и е по-точна по отношение на средната преживяемост в сравнение с IPSS.[13]

Лабораторни изследвания

Анемия (най-често Hgb $<100 \text{ g/l}$ при $\sim 50\%$ от пациентите), левкоеритробластоза, левкоцитоза или левкопения, тромбоцитоза или тромбоцитопения, повишено серумно ниво на LDH, повишени циркуляционни CD34-позитивни хемопоетични прогениторни клетки, нисък общ холестерол.[8,14]

Молекулярно изследване

JAK2 мутация V617F присъства в около 45-68% от случаите, което налага мутационен скрининг да се извършва рутинно при пациенти с ПМФ (Tefferi et al, 2005, 2008; Campbell et al, 2006; Barosi et al, 2007; Guglielmelli et al, 2009). JAK2 V617F алел, се свързва с по-висок процент на трансформация на МФ в ПВ и ЕТ (Vannucchi et al, 2007; Passamonti et al, 2010a), количествената им оценка към настоящия момент не се налага поради липса на значение при определяне терапия на пациентите с миелопрролиферативни неоплазми.[13]

Наличие на BCR-ABL1 изключва ПМФ. BCR-ABL1 пренареждане трябва да се изключва в случаите, с нетипични резултати от трепанобиопсията или

ако пациентът няма мутация в JAK2 или MPL.[13] MPLW515L мутациите са описани за първи път при 4/45 (9%) от случаите на ПМФ, отрицателна за JAK2V617F мутация (Pikman et al, 2006), с честота, която се потвърждава от други проучвания (Pardanani et al, 2006; Guglielmelli et al, 2007). Пациентите, позитивни за MPL мутация са по-възрастни, по-често жени и в началото са с по-тежка анемия (Guglielmelli et al, 2007). Изследване за MPL екзон 10 мутации може да се обсъжда в случаи, които могат да се отчитат като отрицателни за JAK2V617F. Мутации в онкогена TET2 се срещат в около 15% от случаи на ПМФ и са свързани с по-напреднала възраст и анемия, без да има никаква връзка с общата преживяемост (OS) или риска от левкемична трансформация (Tefferi et al, 2009a). TET2 не се препоръчва за рутинно изследване. Клиничното значение на мутации в други гени, в т. ч. IDH1, IDH2, ASXL1, SH2B3, IKZF1, CBL и NRAS, остават неизяснени. EZH2 мутации са наблюдавани при около 5% от случаите и са свързани с лоша прогноза (Guglielmelli et al, 2011), но рутинен скрининг не е оправдан в момента.[13] Пренареждане в PDGFRA и PDGFRB трябва да бъде изключено в присъствието на значителна еозинофилия, тъй като PDGFRA/B-миелопротрофративни неоплазми са силно чувствителни към imatinib.[13]

Клинични находки

Клиничните прояви на миелофиброза са променливи и включват прогресивна анемия, левкопения или левкоцитоза, тромбоцитопения или тромбоцитоза и мултиорганна екстрамедуларна хемопоеза, най-често водеща до хепатомегалия и симптоматична спленомегалия. Пациентите с напреднала заболяване имат тежки конституционални симптоми (втрисане, нощно изпотяване, загуба на тегло), последици от масивна спленомегалия (болка, чувство на ситост, инфаркт на слезката, портална хипертония и диспнея), прогресивна недостатъчност на костния мозък, умора, болки в костите, белодробна хипертония, трансформация в левкемия и ранна смърт.[13,18]

Еволюция

Миелофиброзата е животозастрашаващо заболяване и е свързана с намалена преживяемост.[15] 10-годишният риск от трансформация в остра миелоидна левкемия (AML) е 3.9%-23%.[9,10,16,18]

Лечение

FDA и EMA, одобриха първия селективен инхибитор на JAK1 и JAK2 за лечение на миелофиброза - ruxolitinib. Ruxolitinib е показан за лечение на свързани със заболяването спленомегалия или

симптоми при възрастни пациенти с първична миелофиброза (известна също като хронична идиопатична миелофиброза), миелофиброза след полицитемия вера или миелофиброза след есенциална тромбоцитемия.[17]

Ruxolitinib е селективен инхибитор на Janus Associated Kinases (JAKs) JAK1 и JAK2 (IC₅₀ стойности от 3,3 nM и 2,8 nM съответно за JAK1 и JAK2 ензимите). Те медираат сигналните пътища на редица цитокини и растежни фактори, които са важни за хемопоезата и имунната функция.[17]

Ruxolitinib потиска JAK-STAT сигналния път и клетъчната пролиферация на цитокин-зависими клетъчни модели на хематологични злокачествени заболявания, както и на цитокин-независими Ba/F3 клетки чрез експресията на JAK2V617F мутантен протеин с IC₅₀ варираща от 80-320 nM.[17]

Клинична ефикасност и безопасност на ruxolitinib е установена в проведените две рандомизирани фаза 3 проучвания (COMFORT-I и COMFORT-II) при пациенти с миелофиброза (първична миелофиброза, миелофиброза след полицитемия вера или миелофиброза след есенциална тромбоцитемия).[17]

Алогенната трансплантация на стволови клетки (allo-SCT) в момента представлява единствената терапия с потенциал за излекуване. Повечето пациенти не са кандидати за трансплантация, защото средната възраст при поставянето на диагнозата е 67 години (5-годишна преживяемост, съответно 14% и 62% за пациенти ≥ 45 и < 45 години).[18]

Хирургична и лъчева терапия на спленомегалията са свързани със значителна заболяемост и смъртност и също не влияят на основното заболяване.[18,19]

Дискусия

Необходимо е изготвянето на национално ръководство за диагностика и лечение на МФ. В началото на 2013 г. се очаква да приключи набирането на данните за епидемиологичен МФ регистър, който да даде възможност да се оптимизират грижите за болните с МФ в България.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Levine R, Gilliland DG. *Blood*. 2008;112:2190-2198.
2. Vardiman JW, et al. *Blood*. 2008;114 (5):937-951.
3. Xiao Z, et al. *Haematologica*. 2008;93(5):787-788.
4. Lucia E, et al. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(10):1907-1915.
5. Basquiera AL, et al. *Hematology*. 2009;14(6):323-330.
6. Girodon F, et al. *Haematologica*. 2009;94(6):866-869.
7. Tefferi A. In: Ansell SM, ed. *Rare Hematological Malignancies*. 2009;112:2190-2198.

- nancies. 2008;29-49.
8. Abdel-Wahab OI, Levine RL. *Annu Rev Med.* 2009;60:233-245.
 9. Mesa RA, et al. *Blood.* 2005;105(3):973-977.
 10. Tefferi A. *Am J Hematol.* 2008;83:491-4.
 11. Tefferi A, et al. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6:627-637.
 12. Barosi G, et al. *Leukemia.* 2008;22:438-439.
 13. Reilly J, et al. *British Journal of Haematology*, 2012, 158, 453–471
 14. Tefferi A, et al. *Cancer.* 2007;109(10):2083-2088.
 15. Cervantes F, et al. *Blood.* 2009;113(13):2895-2901.
 16. Rambaldi A. *Int J Hematol.* 2010;91(2):180-188.
 17. Ruxolitinib Product Information EMA 23/08/2012
 18. Abdel-Wahab OI, Levine RL. *Annu Rev Med.* 2009;60:233-245.
 19. Arana-Yi C, et al. *Oncologist.* 2006;11:929-943

Адрес за кореспонденция:

Георги Г. Михайлов
НСБАЛХЗ, София
ул. "Пловдивско поле" 6
тел.: +359 879 104 905
e-mail: geombulg@gmail.com

АРСЕНИКЪТ В СЪВРЕМЕННАТА ПРОТИВОТУМОРНА ХИМИОТЕРАПИЯ

К. Карлов, С. Константинов

Лаб. по Експериментална Химиотерапия, кат. по Фармакология, Фармакотерапия и Токсикология при
Фармацевтичен факултет на МУ-София

ARSENIC IN THE CONTEMPORARY ANTITUMOUR CHEMOTHERAPY

K. Karlov, S. Konstantinov

Laboratory of Experimental Chemotherapy, Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology
Pharmaceutical Faculty, Medical University Sofia

Резюме. Арсеникът все повече възвръща своето клинично значение. Терапевтичната му ефективност е неопровержима при пациенти с остра промиелоцитна левкемия, а днес все повече данни доказват приложимостта му и при мултиплен миелом. Малигнените промиелоцити са особено чувствителни към действието на арсеника поради наличието на фузионния протеин PML-RAR α , понижената им способност да неутрализират действието на свободните радикали и наличието на специален транспортер за As₂O₃. PML-RAR α се инактивира от арсеник, приложен в ниски дози (0.1-0.5 μ M). В по-висока концентрация (0.5-2.0 μ M) се повишава продукцията на свободни радикали и се отключват проапоптотични механизми чрез промяна в сигналната трансдукция, в експресията на редица про- и антиапоптотични протеини, транскрипционни фактори и регулатори на клетъчния цикъл. Наред с апоптозата е доказана и ролята на автофагията като механизъм на клетъчна смърт. As (III) е високо активен, попаднал в биологична среда. Продължителното излагане на арсеник повишава риска от някои злокачествени заболявания, аналогично на конвенционалните цитостатици. В статията са обстойно разгледани механизмите на фармакологично повлияване и възможните странични ефекти при терапия с арсеник.

Ключови думи: арсеник, остра промиелоцитна левкемия, механизъм на действие, странични ефекти, апоптоза, автофагия

Summary. Arsenic trioxide is getting back its clinical significance. There is no doubt for the clinical efficacy of this compound in patients with acute promyelocytic leukemia and nowadays rising number of data indicates its usefulness in multiple myeloma as well. Malignant promyelocytes are particularly sensitive to the activity of arsenic due to the presence of the fusion protein PML-RAR α and because such cells have reduced ability to neutralize free radicals, as well as because of the presence of a specific As₂O₃ transporter. PML-RAR α undergoes inactivation by the arsenic applied at lower doses (0.1-0.5 μ M). At higher concentration (0.5-2.0 μ M) the production of free radicals is elevated and proapoptotic mechanisms are switched on through changes in the signal transduction, expression of pro- and antiapoptotic proteins, transcription factors and cell cycle regulators. Beside of the apoptosis autophagy plays a key role as cell death mechanism, also. As (III) is highly reactive in biological environment. Prolonged arsenic exposition increases the risk of malignant disease development, which is similar to conventional cytostatics. The article reviews in detail the mechanisms of the pharmacological activity and possible side effects of arsenic trioxide.

Key words: arsenic, acute promyelocytic leukemia, mode of action, side effects, apoptosis, autophagy

Въведение

С откритието през 70-те години на миналия век в Китай, че арсеникът (As₂O₃, АТО, Trisenox®) предизвиква пълна ремисия на пациенти с остра промиелоцитна левкемия (ОПЛ, FAB М3) и въвеждането му на американския фармацевтичен пазар през 2000г. започва новата ера на арсеника в противотуморната химиотерапия. Той успешно намира място при лечение на рецидивирала и ре-

фрактерна форма на болестта, а днес клиничните изпитвания показват удачността му на приложение и при новодиагностицирани пациенти [1]. До нас достигат и все повече научни данни, разширяващи спектъра му на действие извън ликвидирането на малигнените промиелоцити. Наред с клиничните му предимства няма как да бъдат подминати и добре известните факти, свързани с неговата немалка токсичност при продължи-

телна експозиция. Това допълнително повишава интереса към по-задълбоченото разбиране на механизмите, по които арсеникът оказва своето цитотоксично действие и разширяването на предклиничните и клинични данни за удачни лекарствени комбинации с други цитостатици с цел по-добра терапевтична ефективност при по-ниски приложени дози. В обзора са обстойно разглеждани механизмите на фармакологично повлияване и възможните странични ефекти при терапия с арсеник.

Роля в лечението на неопластичните заболявания

Познат първоначално като лекарство средство в Рим, Гърция и в древната китайска стоматологична практика, арсеникът се превръща в основа на терапията на редица онкологични заболявания през XIX век, докато не е изоставен поради въвеждането на съвременната химио- и лъчетерапия. Първите документиранни сведения за антилевкемичната му активност датират от 1878г., когато в градската болница в Бостън откриват, че разтворът на Fowler (1% As_2O_3 в $KHCO_3$) притежава способността да понижи броя на белите кръвни клетки [2].

През 1971 год. китайски клиницисти провеждат експеримент върху повече от 1000 пациенти, диагностицирани с различни видове левкемии, прилагайки 1% разтвор на арсеник, съдържащ следи от $HgCl_2$ – препарат, базиран на традиционната китайска медицина, като установяват, че пациентите с ОПЛ се повлияват най-добре. С доказването, че активността се дължи изцяло на As_2O_3 , интересът към арсен-съдържащите съединения като потенциална противотуморна химиотерапия се възобновява [3].

Засега арсеникът е одобрен като средство на лечение единствено при пациенти с ОПЛ, но днес са в ход предклинични и клинични изследвания, показващи добри терапевтични резултати и при други злокачествени заболявания на кръвта. В ход са и редица експерименти, търсещи активност на самостоятелна или комбинирана терапия с арсеник и при нехематологичната онкология, но засега положителните данни са твърде оскъдни.

Остра промиелоцитна левкемия

Заболяването обхваща около 5-15% от всички случаи на остра миелоидна левкемия (ОМЛ). Типично е натрупването на бласти в костния мозък, представляващи клетки, чиято диференциация е блокирана на етап – промиелоцити. При повечето пациенти, диагностицирани с ОПЛ, се наблюдава транслокация между хромозома 15 и 17. Като резултат от получения *pml-rara* ген се експресира нетипичният за нормалните промиелоцити PML-RAR α протеин, играещ ключова роля в патогенезата на болестта, инхибирайки клетъчната

диференциация. Ключов момент в терапията на болестта е откритието, че тя се повлиява от ретиноиди. С въвеждането на ATRA (all-trans-retinoic acid) ОПЛ се превърна в първия пример за диференциращо лечение на малигнено заболяване при човека [4].

Рефрактерна и рецидивирала ОПЛ

Прието е арсеникът да се прилага интравенозно в дневна доза 0.15 mg/kg като при индукцията въвеждането е ежедневно (до 50 дни) до постигане на костно-мозъчна ремисия. Консолидиращото лечение започва 3 до 4 седмици след приключване на индукцията и се прилага 5 дни в седмицата в продължение на 5 последователни седмици. Мултицентрово изследване в САЩ на пациенти с рецидивирала ОПЛ показва, че арсеникът предизвиква ремисия при 85% от случаите като при 91% от излекуваните тестът за $t(15;17)$ е отрицателен [5]. Други данни сочат, че дори и при неповлияна от ATRA ОПЛ може да се постигнат добри клинични резултати с As_2O_3 като самостоятелен терапевтичен агент с посттерапевтично мониториране на нивата на експресия на PML-RAR α [6]. Едновременно прилагане на арсеник и ATRA не показва по-добри терапевтични резултати при пациенти с рецидив на заболяването [7].

Новодиагностицирани пациенти с ОПЛ

Клиничните проучвания на новодиагностицирани пациенти с ОПЛ показват висок процент на пълна ремисия при използване на арсеника като самостоятелен химиотерапевтик. Това предопределя и по-добрата поносимост поради терапевтична ефективност на монотерапията. Две различни схеми на лечение с As_2O_3 са описани на **фиг. 1**. И в двата случая се наблюдава 86% пълна ремисия, но с различна 5-годишна преживяемост.



Фиг. 1 Проучване върху ефективността на монотерапията с диарсенов триоксид по две различни схеми на лечение, при които се наблюдава 74% (горе) [1] и 64% (долу) [8] обща 5-год. преживяемост. Доказана е терапевтичната ефективност на комбинираната химиотерапия с As_2O_3 и ATRA. Тя постига още по-висок процент на пълна ремисия (94%) и обща петгодишна преживяемост при новодиагностицирани пациенти (92%) [9].

Други хематологични заболявания

Мултиплен миелом

Все повече положителни резултати постъпват от клинични проучвания върху пациенти, диагностицирани с мултиплен миелом. Арсеникът умерено понижава и стабилизира нивата на типичния

за болестта парaproтеин като при 13-33% от изследваните пациенти с рефрактерна или рецидивирала форма на заболяването се наблюдава понижение с повече от 50% [17]. Проучена е комбинираната терапия с аскорбинова киселина, при която 1/3 от пациентите получават ремисия [18]. Включването на Dexamethasone, Bortezomib или Melphalan в тройна комбинация с арсеник и аскорбинова киселина също показва значителен терапевтичен ефект при поносима токсичност при рефрактерен и рецидивирал мултиплен миелом [19,20,21]. Документирана е също частична ремисия и стабилизиране на високо-рисков, нелекуван мултиплен миелом при съвместно прилагане на арсеник, аскорбинова киселина, Dexamethasone и Thalidomide [22].

Други остри миелоидни левкемии

Засега клиничните проучвания върху пациенти с диагноза остра миелоидна левкемия, различна от M3, не показват значителни терапевтични резултати при самостоятелната употреба на арсеник като цитостатик. Има данни обаче, че аскорбиновата киселина може да потенцира ефектите на арсеника върху отключването на апоптотични механизми при пациенти с рефрактерна или рецидивирала форма на левкемия като понижава нивата на вътреклетъчен глутатион. При това от 11 изследвани пациенти в едно проучване при двама се наблюдава пълна ремисия, а един се повлиява частично [10]. Комбиниран подход с арсеник и ниски дози Cytarabine е проучен при лечение на ОМЛ с лоша прогноза, при което се наблюдава пълна ремисия при около 1/3 от случаите [11].

Хронична Ph(+) миелоидна левкемия

Няма данни за самостоятелна цитотоксична активност на арсеника при пациенти с хронична миелоидна левкемия. По-познати са опитите с комбинирана химиотерапия, в които се включва и Imatinib, при които се наблюдава само частичен цитогенетичен отговор при пациенти в различен стадий на заболяването [12].

Миелодиспластичен синдром

Немалко изследвания са проведени върху пациенти в различни фази на заболяването. Монотерапия с арсеник показва умерена фармакологична активност при пациенти с нисък риск (34-39%) и по-слаба - при тези с висок риск (6-9%, 3% пълна ремисия) [13]. Значителни надежди се възлагат на участието на As₂O₃ в терапевтични комбинации с други цитостатици. Едно пилотно проучване на съвместното прилагане на арсеник с Thalidomide показва много добри терапевтични резултати при различни форми на МДС [14]. Подобни данни са получени и при комбинирането с Cytarabine и то при пациенти с висок риск на болестта [15], а опи-

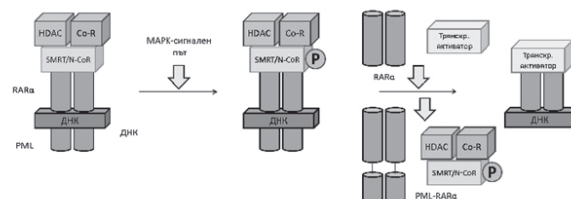
ти с Lovastatin показват умерена ефективност при поносима токсичност на терапията [16]

Механизъм на фармакологичната активност

Най-добре са проучени фармакодинамичните характеристики на арсеника върху малигнените промиелоцити. Чувствителността на този тип клетки може да се обясни с наличието на протеина PML-RAR α , инактивиран от арсеника, намалената способност на промиелоцитите да буферират, индуцираните от него свободни радикали и наличието на специален транспортер – акваглицеропорин 9, отговорен за ъптейка му в клетките [3]. Успоредно с тези данни, се провеждат експерименти и с клетки от други типове злокачествени заболявания, които допълнително дават светлина върху механизмите, по които арсеникът оказва своето действие.

Инактивиране на PML-RAR α

Установено е, че ниски концентрации (0.1-0.5 μ M) As₂O₃ инактивират действието на PML-RAR α , отключвайки механизмите на клетъчна диференциация. Това става възможно благодарение на фосфорилирането на SMRT/N-CoR-комплекса (MAPK-сигнален път) и последващата дисоциация от PML-RAR α [23], както е показано на **фиг. 2**. SMRT/N-CoR (silencing mediator for retinoid / nuclear receptor co-repressor 2) играе ключова роля в регулацията на генната експресия, служейки едновременно като репресор и платформа за хистон-деацетилазите (HDAC) и другите корепресори (Co-R).



Фиг. 2 Дисоциация на SMRT/N-CoR от PML-RAR α с отпадане на целия репресорен комплекс и на фузионния протеин. Започва да функционира нормален RAR α , който включва към себе си активатори на транскрипцията, необходими за клетъчната диференциация.

Продукция на свободни радикали

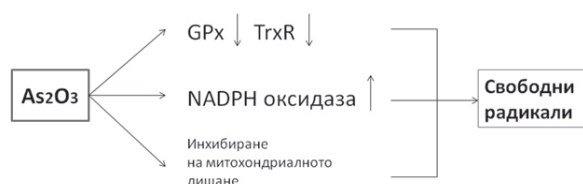
Прилагането на по-високи концентрации арсеник (0.5-2.0 μ M) върху малигнените промиелоцити води до повишаване на концентрацията на свободни радикали в клетките, в резултат на активирането на NADPH-оксидазата и влиянието върху някои други ензимни системи. Те от своя страна повлияват експресията на транскрипционни фактори и сигнални молекули, отговорни за генериране на апоптоза. За това спомага и типичното за клетките на ОПЛ ниско ниво на глутатион, което ги прави по-лесна прицелна мишена за действие-

то на арсеника. Доказателство е, че прилагането на антиоксидант като N-Acetylcysteine значително намалява цитотоксичността му [24]. Сравнена е способността на клетъчната линия NB-4, изолирана от пациент с остра промиелоцитна левкемия, да акумулира свободни радикали в сравнение с три клетъчни линии от друг произход. Резултатът недвусмислено показва, че ОПЛ-клетките са значително по-чувствителни на действието на арсеника поради тази причина [25].

Проучване на Pelicano, и съавт. показва и че дишателните вериги в митохондриите също играят роля при цитотоксичността на арсеника. Клетъчна суб-линия HL-60 с дефект в митохондриалното дишане е сравнена с изходните HL-60-клетки, при което се установява, че дъщерната клетъчна суб-линия е по-устойчива на третиране с цитостатика [26]. Въпреки това при клетките от линия NB-4 водеща роля при генериране на свободни радикали играе NADPH-оксидазата, тъй като прилагането на ацетованилон (инхибитор на ензима) блокира действието на арсеника, докато инхибирането на митохондриалното дишане не оказва толкова силно влияние върху цитотоксичния ефект [27].

С особена важност трябва да бъдат споменати и инхибиращите ефекти на арсеника върху детоксикиращите свободни радикали системи на туморните клетки – глутатион-пероксидаза (GPx) и тиоредоксин-редуктаза (TrxR). Блокирането на функцията на GPx се засилва при съвместно прилагане на As₂O₃ с меркаптосукцинова киселина (инхибитор на GPx). От своя страна, TrxR е единственият познат ензим, който може да редуцира окислената форма на тиоредуксина и неговото инхибиране води до клетъчна смърт. Подобни ефекти върху GPx и TrxR притежават и метилираните метаболити на арсеника, наблюдавани в урината на пациенти с ОПЛ [28]. *фиг. 3.*

За способността As₂O₃ да предизвиква продукция на високи концентрации свободни радикали свидетелстват и данните, че той може да взаимодейства с молибденовия каталитичен център на ксантинооксидазата, която катализира превръщането на хипоксантин в ксантин и на ксантина в пикочна киселина чрез генериране на супероксид и така да я активира [29].



Фиг. 3 Най-важните клетъчни механизми, по които арсеникът генерира продукцията на свободни кислородни радикали [28].

Промяна в експресията на про- и антиапоптотични протеини

Установено е, че As₂O₃ смущава работата на MPTP (mitochondrial permeability transition pore) във вътрешната митохондриална мембрана, което дава възможност на цитохром с и други проапоптотични протеини да напуснат митохондриите и да индуцират апоптоза [30]. Други проучвания върху непромиелоцитни клетки доказват и влияние върху външната митохондриална мембрана: транслокация и олигомеризация на Вах с формиране на пори, през които могат да преминат проапоптотичните протеини при глиобластомната клетъчна линия A-172 [31].

За индукция на апоптоза спомага и понижаването на експресията на антиапоптотичния bcl-2 [32]. Синергизъм в цитотоксичното действие се наблюдава при комбинирано третиране на миелоидните клетъчни линии K-562 и NB-4 с ниски дози арсеник и bcl-2-насочени антисенс-олиго-дезоксинуклеотиди [33].

Опит с клетъчна линия HL-60 показва удачност на съвместното прилагане на As₂O₃ и протеазомния инхибитор Bortezomib, при което се наблюдава значително засилена активност на каспази 8 и 9 и умерено активиране на каспаза 3. Наред с това се повишава и експресията на рецепторите за FAS и TRAIL (tumor necrosis factor - related apoptosis-inducing ligand) [34].

Влияние върху сигналните пътища

Генерираните свободни радикали могат да въздействат върху сигналната трансдукция на малигнените клетки. Така например те повишат нивата на фосфорилираната JNK, вероятно чрез транскрипционния фактор AP-1 [28]. Изследване на Kang & Lee върху клетъчната линия HELA доказва, че механизмите на апоптоза могат да бъдат отключени и при активиране на p38 протеинкиназата. p38, нормално се активира при оксидативен стрес, UV лъчение, възпаление и е отговорна за активирането на транскрипционни фактори като p53 (регулиращ клетъчния цикъл, тумор-супресорен протеин) [35]. От друга страна при третиране на клетъчна линия K-562 с 2 μM арсеник се наблюдава активиране на ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), която на свой ред активира p38- и JNK-проапоптотичните сигнални пътища [36]. При концентрация 0.5-1.0 μM арсеникът може да активира ERK 1/2, което да потисне апоптозата при клетъчната линия NB4. Това обяснява и защо комбинираното прилагане с MEK1-инхибитор отключва програмирана клетъчна смърт при NB-4, HMCL (миелом) и клетки от пациент с мултиплем миелом [37]. MEK1 е протеинкиназа, отговорна за фосфорилирането и активирането на ERK1, която на свой ред активира редица протеинкинази (с-Мус, Elk-1 и др.) и регулатори на трансляцията и

спомага за клетъчния растеж и диференциация. Проучена е способността за генериране на апоптоза при промиелоцитите. До шестия час след третиране с арсеник фосфорилираният ERK на свой ред фосфорилира PML с последващо сумилиране. Това дава сигнал на DAXX да се придвижи от клетъчната мембрана към ядрото, където заедно с PML и ZIPK образува комплекс, отключващ транскрипцията на проапоптотични гени. Успоредно с това 11s- и 20s-протеазомни компоненти се придвижват към нуклеарните телца, а фосфорилираната JNK активира проапоптотични сигнали чрез генна регулация или влияние върху bcl-2. 18-24 часа след прилагането на цитостатика се наблюдава убиквитинилиране на PML с последваща деградация (фиг. 4). При сравняване на действието на арсеника върху промиелоцитната клетъчната линия HL-60 и нейна дъщерна линия с перманентно активиран PI3K/Act-сигнален път се установява, че майчината клетъчна линия е значително по-чувствителна към цитостатика, тъй като каскадата на PI3K е отговорна за инхибиране на проапоптотичните пътища. Това ни дава основание да се търси синергизъм на As₂O₃ в комбинация с PI3K-инхибитори [39].



Фиг. 4 Ефекти при 1-6 часа (ляво) и 18-24 часа (дясно) от началото на действието на As₂O₃ [38].

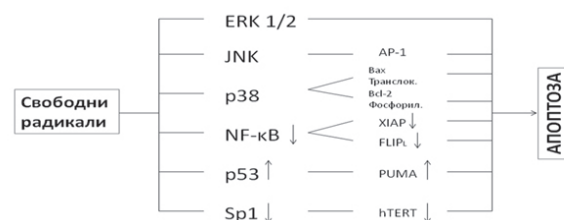
Промяна в експресията на транскрипционни фактори

При третиране на клетъчна линия NB-4 с арсеник се повишава експресията на p53 и на модулятора на апоптозата PUMA. Известно е, че фосфорилирането и активирането на p53 се осъществява от Chk1 и Chk2 (checkpoint kinase), а дефосфорилирането и деактивирането от Wip1 (wild-type p53-induced phosphatase 1). Има данни, че при прилагане на 1-5 μM от цитостатика върху същата клетъчна линия се инхибира активността на Wip1, което дава възможност на Chk2 да бъде фосфорилиран с последващо активиране и на p53 [40]. Арсеникът може да повиши експресията на p53 и да преодолее механизмите на резистентност към цитостатици на клетъчна линия K-562/ADM, при което клетките загиват чрез апоптоза. Наблюдава се повишаване на експресията на FAS (CD95, трансмембранен протеин, отговорен за индуциране на апоптоза) с едновременно понижаване на тази на P-gp (MDR-1). По този начин As₂O₃ моду-

лира експресията на ключови за програмираната клетъчна смърт фактори в използваната резистентна левкемична клетъчна линия [41].

Арсеникът може да понижи експресията на човешкия теломеразен ген (hTERT) в различни клетъчни линии поради нарушаване на свързването на транскрипционния фактор Sp1 с ДНК. При това експресията на Sp1 остава непроменена, което предполага, че окислението породено от свободните радикали е основна причина за нарушаването на функцията на цинк-съдържащия транскрипционен фактор, необходим нормално за регулиране на промоторната активност на даден ген [42]. (фиг. 5)

Резултатите, получени след третиране на миелоидната клетъчна линия U-937 (човешки хистиоцитарен лимфом) с 1 μM арсеник, показват инхибиторното действие на цитостатика върху функцията на транскрипционния фактор NF-κB (фиг. 5). В резултат на това се наблюдава понижаване на експресията на XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) и на FLIPL (FLICE-inhibitory protein) (43). Първият притежава способността да спира апоптозата като се свързва с каспази 3, 7 и 9 и така инхибира тяхната функция, докато семейството на FLIP, включва представители, блокиращи функцията на каспази 8 и 10. Установено е, че свързването на NF-κB с ДНК при клетъчна линия HELA може да бъде значително потиснато при комбиниране на арсеника с емодин [44].



Фиг. 5 Влияния на свободните радикали върху някои сигнални пътища и транскрипционни фактори [28].

Влияние върху клетъчния цикъл

Способността на арсеника да инхибира пролиферацията на малигнените клетки може да бъде обяснена и чрез влиянието му върху клетъчния цикъл. При миеломната клетъчна линия MC/CAR например е понижена експресията на CDK6, cdc2-киназата и циклин A, при което клетъчният цикъл спира във фази G₂ и G₂-M. Допълнително е увеличена способността за свързване на p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) със споменатите регулатори на клетъчния цикъл, както и с циклин E, при което се блокира тяхното действие [45].

Апоптоза и автофагия

Според някои най-нови данни арсеникът може да индуцира клетъчна смърт едновременно чрез

апоптоза и автофагия при клетки от Т-лимфоцитна левкемия и миелодиспластичен синдром. При това в малигнените левкоцити се наблюдава повишена експресия на Beclin-1, необходим за инициирането на автофагията [46]. Автофагия е наблюдавана и при третиране на глиомни клетки от линията U-373-MG. Електронната микроскопия не показва наличие на апоптотични клетки при третиране с 2 μ M As₂O₃, за което свидетелства и фактът, че каспазните инхибитори не повлияват цитотоксичността му. От друга страна, прилагането на бафиломицин (инхибитор на автофагията) повишава ролята на апоптозата като водещ цитотоксичен механизъм [47].

Токсикологичен профил (странични реакции)

Наричан отрова за кралете и кралят на отровите, арсенът е добре известен през Средновековието като оръжие за политически убийства. Но дори и днес значението на неговата токсичност не е намаляло и милиони хора по света са изложени на хроничен прием на неорганични арсенови съединения от околната среда, в това число и As₂O₃. Ярък пример за това е контаминирането на питейната вода в страни от Югоизточна Азия, Южна Америка, Европа и дори САЩ. Повече от 50 милиона души в Бангладеш (измерени концентрации на арсена до 1000 μ g/l), милиони жители на Виетнам (до 3050 μ g/l), Западен Бенгал, Индия (до 3700 μ g/l) и Китай (до 2000 μ g/l) са приемали хронично замърсена питейна вода. По последни данни СЗО препоръчва съдържанието на арсена в нея да не надвишава 10 μ g/l (стандартът е приет в Европейския съюз през 2003г.), а максималната стойност е лимитирана на 50 μ g/l. В пълен контраст е регистрираната в Тайланд стойност от 5114 μ g/l [48].

Като химичен елемент с металоиден характер As(III) притежава способността, попадайки в биологична система да формира здрави връзки с физиологично важни функционални групи като тиоловата в цистеина и имидазоловите азотни атоми в хистидина и така да образува стабилни комплекси, инактивиращи протеиновото действие. На това свойство се дължи както фармакологичната активност на As₂O₃, така и неговите цитотоксични ефекти [3].

Други данни доказват, че As(III) е генотоксичен, тъй като *in vitro* и *in vivo* може да увреди ДНК чрез инхибиране на репарационните процеси. Съществува и хипотеза, че под негово действие може да се осъществи трансформация на един доброкачествен тумор в злокачествен [49].

Най-голямото бедствие, свързано със съединението на арсена - замърсяването на питейната вода в споменатите по-горе страни, е важен извор на информация относно ефектите при дълготрайна експозиция на арсен-съдържащи вещества. До-

казана е причинно-следствената връзка между замърсената вода и зачестелите случаи на рак на кожата, белия и черния дроб, пикочния мехур, простатата и бъбрека. Най-честите симптоми при продължително излагане на As₂O₃ са лезии по кожата (175 хил. случая), хиперпигментации, конюнктивити, кератози и хиперкератози [50].

С навлизането на арсеника в терапията на ОПЛ и с напредването на клиничните проучвания в различни сфери на хематологията се обръща все по-голямо внимание на токсичността и поносимостта на цитостатика при терапевтични дози с различна продължителност на лечението. Докато краткотрайното прилагане се характеризира със сравнително малко нежелани ефекти, то за по-продължителното лечение с As₂O₃ се знае още твърде малко. От друга страна, данните от хроничния прием на замърсена вода също не дават яснота върху този проблем, тъй като общото прието количество арсеник от околната среда достига около 4000 mg, повече от прилагания клинично арсеник. Въпреки това се установява, че диарсеновият триоксид може да увеличи риска от развитие на вторични неопласични заболявания след терапия с цитостатика при среден общ прием от 1680 mg арсеник [51].

Най-често терапевтичната дневна доза от 0.15 mg/kg е съпроводена с нежелани ефекти от страна на стомашно-чревния тракт: гадене (75%), повръщане (58%), абдоминална болка (58%), диария (53%). Типични още са кашлицата (65%), умората (63%), треската (63%), главоболието (60%), диспнеята (53%). Доказано е влиянието на арсеника и върху сърдечно-съдовата система: наблюдава се тахикардия (55%) и пролонгация на QT-интервала (40%), а в случай на хипокалиемия (50%) и хипомагнезиемия (45%) е възможна и камерна аритмия тип „torsades de pointes” или пълен AV-блок [52]. Рискът от кардиотоксичност се повишава при предхождащо лечение с антрациклини. През първите две седмици от терапията много често се наблюдава синдромът на левкоцитна активация, който се характеризира с фебрилитет, болка в опорно-двигателния апарат, диспнея, покачване на телесното тегло, ретенция на течности, белодробни инфилтрати и плеврални и перикардни изливи с или без левкоцитоза [53]. Постмаркетинговото наблюдение на нежеланите реакции от страна на Trisenox® показва увеличаване на честотата на случаите и на периферна невропатия [52].

Заклучение

С разширяването на нашите познания относно начина, по който арсеникът упражнява своето фармакологично действие върху малигнените клетки, се засилва интересът към откриването на рационални терапевтични комбинации с кон-

венционални лекарства и други вещества, които да покажат подобрена безопасност и потенциран противотуморен ефект както при пациенти с остра промиелоцитна левкемия, така и при други неопластични заболявания дори извън сферата на хематологичната онкология. По-пълното проучване на механизмите, по които As_2O_3 постига ремисия при ОПЛ и способността му да предизвиква клетъчна диференциация в ниски дози, без това да е свързано със загиване на промиелоцитите, също са обект на интерес и бъдещи експериментални проучвания. От друга страна, преоткриването на арсеника като мощен цитостатик дава тласък на лабораторните изследвания и върху други арсенсъдържащи вещества като реалгар (As_4S_4), орпимент (As_2S_3) и най-вече органоарсеновите съединения, за които днес се знае, че се отличават със значително по-добър токсикологичен профил. Интерес представлява и оптимизирането на фармацевтичната технология, което да позволи на арсеника да достига целенасочено определени тъкани и клетки. Всички тези данни и насоки недвусмислено определят все по-голямата роля на арсеника в близкото бъдеще на противотуморната химиотерапия, особено при някои хематологични неоплазии като ОПЛ и мултиплен миелом.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Mathews, V., B. George, E. Chendamarai, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 3866-71.
- Kwong, Y.L., D. Todd. Delicious poison: arsenic trioxide for the treatment of leukemia [letter]. *Blood* 1997; 89: 3487-8.
- Dilda, P., P. Hogg. Arsenic-based cancer drugs. *Cancer Treatment Rew.* 2007; 33: 542-64.
- Munker, R., E. Hiller, J. Glass, et al. *Modern Hematology – Biology and Clinical Management* 2nd ed, New Jersey, Humana Press 2007, 155-72.
- Soignet, S., S. Frankel, D. Douer, et al. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19: 3852-60.
- Shigeno, K., K. Naito, N. Sahara, et al. Arsenic trioxide therapy in relapsed or refractory Japanese patient with acute promyelocytic leukemia: updated outcomes of the phase II study and post-remission therapies. *Int. J. Hematol.* 2005; 82: 224-9.
- Raffoux, E., P. Rousselot, J. Poupon, et al. Combined treatment with arsenic trioxide and all-trans-retinoic acid in patients with relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2326-34.
- Ghavamzadeh, A., K. Alimoghaddam, S. Rostami, et al. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2753-7.
- Liu, Y.F., Y.M. Zhu, Z.Z. Shi, et al. Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As_2O_3) as front line therapy for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia (APL). In: *Blood ed. 2006 ASH Annual Meeting Abstracts*; 2006.
- Douer, D., K. Watkins, R. Louie, et al. Treatment of non-APL acute myelogenous leukemia with intravenous arsenic trioxide plus ascorbic acid. In: *Blood ed. 2006 ASH Annual Meeting Abstracts*; 2006.
- Roboz, G., E. Ritchie, T. Curcio, et al. Arsenic trioxide and low-dose cytarabine in older patients with untreated acute myeloid leukemia, excluding acute promyelocytic leukemia. *Cancer* 2008; 113: 2504-11.
- Ravandi-Kashani, F., J. Ridgeway, S. Nishimura, et al. Pilot study of combination of imatinib mesylate and trisenox (As_2O_3) in patients with accelerated (AP) and blast phase (BP) CML. In: *Blood ed. 2003 ASH Annual Meeting Abstracts*; 2003.
- Schiller, G.J., J. Slack, J. Hainsworth, et al. Phase II multicenter study of arsenic trioxide in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 2456-64.
- Raza, A., S. Buonamici, L. Lisak, et al. Arsenic trioxide and thalidomide combination produces multi-lineage hematological responses in myelodysplastic syndromes patients, particularly in those with high pre-therapy EVI1 expression. *Leuk. Res.* 2004; 28: 791-803.
- Roboz, G., E. Ritchie, S. Allen-Bard, et al. Arsenic trioxide (ATO) is safe and effective in combination with low-dose Ara-C (LDAC) for the treatment of IPSS-2 myelodysplastic syndrome (MDS) and poor-prognosis acute myeloid leukemia (AML) in elderly patients. In: *Blood ed. 2005 ASH Annual Meeting Abstracts*; 2005.
- Stroh, A., T. Carter, R. Hohl, et al. Pilot study of lovastatin in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) receiving arsenic trioxide (Trisenox) therapy. In: *Blood ed. 2006 ASH Annual Meeting Abstracts*; 2005.
- Rolig, C., T. Illmer. The efficacy of arsenic trioxide for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: a systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 2006; 35: 425-30.
- Verstovsek, S., F. Giles, A. Quintas-Cardama. Arsenic derivatives in hematologic malignancies: a role beyond acute promyelocytic leukemia? *Hem. Oncol.* 2006; 24: 181-8.
- Berenson, J., R. Boccia, D. Siegel, et al. Efficacy and safety of melphalan, arsenic trioxide and ascorbic acid combination therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a prospective, multicentre, phase II, single-arm study. *Br. J. Haematol.* 2006; 135: 174-83.
- Abou-Jawde, R.M., J. Reed, M. Kelly, et al. Efficacy and safety results with the combination therapy of arsenic trioxide, dexamethasone, and ascorbic acid in multiple myeloma patients: a phase 2 trial. *Med. Oncol.* 2006; 23: 263-72.
- Berenson, J., J. Matous, R. Swift, et al. A phase I/II study of arsenic trioxide/ bortezomib/ ascorbic acid combination therapy for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 1762-8.
- Baz, R., M. Kelly, J. Reed, et al. Phase II study of dexamethasone, arsenic trioxide, and ascorbic acid combination therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 1762-8.

- methasone ascorbic acid, thalidomide and arsenic trioxide (DATA) in high risk previously untreated (PU) and relapsed/refractory (RR) multiple myeloma (MM). In: *Oncology JoC* ed. 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings; 2006.
23. Hong, S.H., Z. Yang, M. Privalsky. Arsenic trioxide is a potent inhibitor of the interaction of SMRT corepressor with its transcription factor partners, including the PML-retinoic acid receptor alpha oncoprotein found in human acute promyelocytic leukemia. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21: 7172–82.
 24. Chou, W.C., C. Jie, A. Kenedy, et al. Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004; 101: 4578–83.
 25. Wang, J., L. Li, H. Cang, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are responsible for the high susceptibility to arsenic cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk. Res.* 2008; 32: 429–36.
 26. Pelicano, H., L. Feng, Y. Zhou, et al. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 2008; 278: 37832–9.
 27. Barchowsky, A., Dudek, E.J., Treadwell, M.D., Wetterhahn, K.E., 1996. Arsenic induces oxidant stress and NF-kappa B activation in cultured aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 783–790.
 28. Sumi D, Shinkai Y, Kumagai Y. Signal transduction pathways and transcription factors triggered by arsenic trioxide in leukemia cells. *Toxic and Applied Pharm* 2010; 244: 385–392.
 29. Hille R, Stewart R, Fee J, et al. The interaction of arsenite with xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1983;258:4849–4856.
 30. Cai X, Shen YL, Zhu Q, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated, respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 262–70.
 31. Haga, N., N. Fujita, T. Tsuruo. Involvement of mitochondrial aggregation in arsenic trioxide (As₂O₃)-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Cancer Sci.* 2005; 96: 825–33.
 32. Chen, G.Q., J. Zhu, X.G. Shi, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 1996; 88: 1052–61.
 33. Zhang, Y., W.L. Shen. Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide increases the sensitivity of leukemic cells to arsenic trioxide. *Cell Biol. Intern.* 2003; 23: 953–8.
 34. Canestraro, M., S. Galimberti, H. Savli, et al. Synergistic antiproliferative effect of arsenic trioxide combined with bortezomib in HL60 cell line and primary blasts from patients affected by myeloproliferative disorders. *Cancer Gen. and Cytogen.* 2010; 199: 110–20.
 35. Kang, Y.H., S.J. Lee. The role of p38 MAPK and JNK in arsenic trioxide-induced mitochondrial cell death in human cervical cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 2008; 217: 23–33.
 36. Yan, W., A. Arai, M. Aoki, et al. ASK1 is activated by arsenic trioxide in leukemic cells through accumulation of reactive oxygen species and may play a negative role in induction of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 355: 1038–44.
 37. Lunghi, P., N. Giuliani, L. Mazzera, et al. Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood* 2008; 112: 2450–62.
 38. Mann, K., W. Miller. Death by arsenic: Implications of PML sumoylation. *Cancer Cell* 2004; 5: 307–9.
 39. Tabellini, G., A. Cappellini, P. Tazzari, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J. Cell. Physiol.* 2005; 202: 623–34.
 40. Yoda, A., K. Toyoshima, Y. Watanabe, et al. Arsenic trioxide augments Chk2/p53-mediated apoptosis by inhibiting oncogenic Wip1 phosphatase. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:18969–79.
 41. Wang, D.H., H.L. Wei, H.S. Zhao, et al. Arsenic trioxide overcomes apoptosis inhibition in K562/ADM cells by regulating vital components in apoptotic pathway. *Pharm. Res.* 2005; 52: 376–85.
 42. Chou, W.C., H.Y. Chen, S.L. Yu, et al. Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation. *Blood* 2005; 106: 304–10.
 43. Lemarie, A., C. Morzadec, D. Merino, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of human monocytes during macrophagic differentiation through nuclear factor-kappaB-related survival pathway down-regulation. *J. Pharm. Exp. Ther.* 2006; 316: 304–14.
 44. Jing, Y., Yang, J., Wang, Y., et al. Alteration of subcellular redox equilibrium and the consequent oxidative modification of nuclear factor kappa B are critical for anticancer cytotoxicity by emodin, a reactive oxygen species-producing agent. *Free Rad. Biol. & Med.* 2006; 40: 2183–97.
 45. Park, W.H., J.G. Seol, E.S. Kim, et al. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Res.* 2000; 60: 3065–71.
 46. Wenbin, Q., L. Junqing, J. Jie, et al. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. *Leuc. Res.* 2007; 31: 329–39.
 47. Kanzawa, T., Y. Kondo, H. Ito, et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2003; 63: 2103–8.
 48. Tapio, S., B. Grosche. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mut. Res.* 2006; 612: 215–46.
 49. Basu, A., J. Mahata, S. Gupta, et al. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mut. Res.* 2001; 488: 171–94.
 50. Das, D., A. Chatterjee, B.K. Mandal, et al., Arsenic in ground-water in six districts of West Bengal, India: the biggest arsenic calamity in the world, *Analyst* 1995; 120: 917–24.

51. Au, W.Y., C. Kumana, C.W. Lam, et al., Solid tumors subsequent to arsenic trioxide treatment for acute promyelocytic leukemia. *Leuc. Res.* 2001; 31:105-8.
52. Trisenox® (arsenic trioxide) injection. Кратка характеристика на лекарствения продукт. Cephalon 2010.
53. Au, W. Y., Y. L. Kwong. Arsenic trioxide: safety issues and their management. *Acta Pharm. Sin.* 2008; 29: 296-304.

Адрес за кореспонденция:

С. Константинов
ФФ при МУ - София
1000 София, ул. "Дунав" 2
тел.: 02 9236559
e-mail: konstantinov.spiromihaylov@gmail.com

**ИНФЕКЦИЯ С ЧОВЕШКИ ПАРВОВИРУС В19/ЕРИТРОВИРУС В19:
НОСИТЕЛСТВО И ДОКАЗВАНЕ ПРИ ИМУНОКОМПЕТЕНТНИ И
ИМУНОКОМПРОМЕТИРАНИ ЛИЦА. БЕЗОПАСНОСТ И ПРИЛОЖЕНИЕ НА
КРЪВНИ ПРОДУКТИ В ТРАНСФУЗИОННАТА МЕДИЦИНА**

А. Тошев¹, З. Михнева²

1 - Лаборатория „Имунохимия“, Катедра Биология, МУ – София

2 - НРЛ „Морбили, паротит, рубеола“, НЦЗПБ

**INFECTION WITH HUMAN PARVOVIRUS B19/ ERYTHROVIRUS B19: CARRIER
AND PROOF IN IMMUNOCOMPETENT AND IMMUNOCOMPROMISED PERSONS.
SAFETY AND ADMINISTRATION
OF BLOOD PRODUCTS IN TRANSFUSION MEDICINE**

A. Toshev¹, Z. Mihneva²

1 - Laboratory “Immunochemistry”, Department of Biology, - Sofia

2 - National Reference Laboratory “Measles, mumps, rubella”, Department of Virology

Резюме. Представя се обзорна информация относно Парвовирус В19/Еритровирус В19 и неговото разпространение. Подчертава се ролята му като кръвнопреносим агент - резултат от неговото устройство, тропизъм и трансмисия, както и клиничното протичане на инфекцията в имунокомпетентни и имуносупресирани лица.

Коментират се честотата на В19-ДНК носителството при различни проучвания, доказването на вируса в здрави донори, лица с костно-мозъчна и органна трансплантация, хемотрансфузия и терапия с кръвни продукти от една страна, както и предприеманите мерки за тяхната безопасност.

Обсъждат се чувствителността на използваните методики, калибрирани със съществуващите международни стандарти за доказване на вируса, минимално допустимото ниво на контаминация и опита на редица изследователски колективи в това направление.

Предлага се дискусииране на възможността за въвеждане на мониториране на дейностите: донорство и производство на плазмени деривати и в нашата страна, особено в случаи при определени техни приложения.

Ключови думи: еритровирус В19, персистираща инфекция, В19-ДНК контаминация

Summary. Overview information about Erythrovirus B19 (Parvovirus B19/PVB19) and its spread is presented here. PVB19's role as a blood-borne agent is emphasized as a result of its structure, tropism and transmission. Clinical course of the infection in immunocompetent and immunocompromized persons is also explained.

The frequency of B19 – DNA carriage in different studies is commented. Important aim of the review is focused on virus detection in healthy donors, people with bone marrow and organ transplantation, as well as cases of transfusion therapy with blood products. Another issue taken into account is the necessity for blood products safety measurements.

The sensitivity of the methods used, calibrated with existing international standards to detect the virus is discussed. A number of research groups in this field confer a minimum level of contamination.

Now, the possibility of monitoring of defined activities including blood donation and production of plasma derivatives in our country is being proposed.

Key words: erythrovirus B19, persistent infection, B19-DNA contamination

Въведение

Парвовирус В19 (PVB19), доскоро единствен човешки патогенен представител на сем. Parvoviridae бе открит през 1974 г от Cossart и сътр. [10]. при скриниране за хепатит В на донорски кръвни проби, когато инфектиран серум, показал наличие на преципитати. В изследвания материал електронно-микроскопски били открити симетрични частици с размер 25 нм и празни капсиди. Така кръвна проба №19 от изследвания панел В дава оригиналното име на вируса. Десетилетие по-късно бяха установени неговите биологични характеристики и етиологичната му роля в човешката патология. През 1981 г при проследяване на сероконверсни серуми от деца със сърповидноклетъчна анемия, страдащи от транзиторна апластична анемия бе идентифицирана антигенемия, доказваща етиологичната роля на VB19 [23]. Две години по-късно (1983 г), VB19 бе изолиран като причинител на взрив от т.нар. пета болест Erythema infectiosum [2]. През 1984г същият вирус бе свързан с фетална смърт и неимунен хидропс на плода [3]. Постепенно спектърът на заболяванията с участието на VB19 бе все повече разширяван. Вирусът бе сочен като причинител на персистираща инфекция в имunosупресирани лица и срещан при други медицински синдроми и заболявания. Развитието на молекулярните техники допринесе в значителна степен за неговото изучаване, предвид трудното му култивиране и липсата на продуктивна в стандартния смисъл система вирус-клетка. През 1995 г поради достатъчно натрупани генетични и функционални различия между VB19 и останалите представители на род Parvovirus, последният бе класифициран в отделен род Erythrovirus [14], заедно с маймунския представител (Simian parvovirus), причиняващ тежка анемия при човекоподобните маймуни. Основна отличителна черта на този род бе предпочитаното размножение в първичните клетки на костния мозък (erythroid progenitor cells), предизвикващо, генерализирана еритробластна инфекция с последваща инхибция на еритропоезата. През 1998г и 2002г бяха изолирани два нови щамма, представители на този род, наречени временно V9 и A6 при дете с апластична криза и HIV-позитивен пациент с анемия респективно, с генетично несходство с щамове на VB19 до 14.2 % и 9.4% [20, 21]. По този начин се обособиха трите основни генотипа на род Erythroviruses: генотип 1 с прототип VB19 основно доминиращ, генотип 2 с прототип щам Lali и изолат (A6) и генотип 3 с прототип изолат (V9) за субтип 3a и изолат D91.1 за субтип 3b.

Изключителният тропизъм на VB19 към клетки с този произход се обуславя от наличието на кръвно-групов Р антиген, главен клетъчен рецептор

за вируса. Последният присъства не само на повърхността на първичните и зрели клетки от еритроиден произход, но също така и върху клетки от ембрионален и друг произход. Индивиди, при които генетично липсва кръвно-групов Р антиген (т.нар. Р фенотип) са нечувствителни към инфекцията с този вирус.

Инфекцията с парвовирус В19 е широко разпространена, особено в развитите страни на Европа, Азия и Америка. В около 30-50% от случаите тя протича безсимптомно. Заболяемостта показва пикова цикличност на всеки 3-4 години.

Вирусът се разпространява по въздушно-капков път. Предаването по парентерален чрез инфектирана кръв и кръвни продукти се обуславя от две важни негови характеристики (структурна и патогенетична): липсата на вирусна обвивка, обуславяща чувствителността към третиране с физико-химични фактори, което прави възможна вирусната контаминация при хемотрансфузия и други хемотерапевтични процедури и персистиращата инфекция в клетките на костния мозък дори при асимптомни здрави индивиди, потенциални донори.

Трансфузията с VB19 контаминирана кръв и кръвни продукти носи тежки последици в някои категории високо-рискови пациенти, включващи лица с: хеморагични диатези и трансфузионно-зависими анемии (таласемия, апластична анемия, различни видове хемолитични анемии, в т.ч. конгенитална), остра лимфатична левкемия, неимунни бременни жени и имунокомпрометирани лица, в т.ч. HIV позитивни и трансплантирани с имunosупресивна терапия.

В19 вирусна инфекция при имунокомпетентни и имунокомпрометирани лица

Персистентност на вирус В19 при имунокомпетентност: отзвучаване, носителство и доказване

Класическата остра В19 вирусна инфекция, явяваща се в имунологично здрави лица се контролира от появата на вирус-неутрализиращи антитела в хода на инфекцията. Преходна, силна виремия с вирусен товар 10^{11-13} геномни копия в мл присъства за по-малко от седмица, след което титърът спада като се появяват специфичните антитела от клас IgM, потвърждаващи острата инфекция, задържащи се 8-10 седмици и специфичните антитела от клас IgG, запазващи се пожизнено, които в хода на острата инфекция показват значителна сероконверсия. Хематологичните параметри по време на виремията показват спад на ретикулоцитите (до неопределими нива) и хемоглобина (до около 1g/l), поради прякото действие на вируса в клетките на костния мозък, както и клинично незначителни лимфопения, неутропе-

ния и тромбоцитопения като всички те достигат нормалните си стойности след 7 до 10 дни, когато инфекцията отзвучава сама (self-limited).

Съобщават се, обаче, случаи на персистиране на инфекцията с ниско-степенни вирусни титри в около 2% от пробите от костен мозък на здрави, имунокомпетентни лица, при които инфекцията е протекла леко или дори безсимптомно [13].

Лабораторната диагностика на острата инфекция се провежда чрез серологични (ELISA тестове за доказване на специфични IgM/IgG антитела) и молекулярни методи (one step PCR, nested PCR и количествен qPCR тестове за доказване етиологичното участие на вируса и вирусния товар). За акуратно потвърждение в редица лаборатории се използва международен VB19-ДНК стандарт (WHO International Standard код 99/800 и код 99/802) с потенция 10^5 и 10^6 IU/ml респективно.

При имунокомпетентни реципиенти излагането на VB19 инфекция при трансфузия е най-често без последствия, тъй като голяма част от населението са имунна прослойка [6]. Последни данни предполагат възможността хроничното и безсимптомно носителство на VB19 да съществува в имунокомпетентни лица (костен мозък и/или други депа), като при тях дори може и да не присъстват специфични IgG антитела. В потвърждение на това ДНК на вируса може да бъде установена по-често в костния мозък отколкото в периферната кръв [7]. Счита се, че VB19 демонстрира модел на инфекция „удар и бягство“, като се приема, че в нормален гостоприемник последната бързо отминава чрез ефекта на хуморалния и клетъчен имуен отговор в рамките на няколко седмици с успешно изчистване на вируса от организма. Отдиференцирани са два типа имуен отговор при имунокомпетентни лица в зависимост от типа на инфекцията (остра или хронична):

VB19 имунни отговори при остра инфекция

Приема се, че хуморалният имуен отговор е най-надеждният при инфекции с къси репликационни цикли, характеризирани с бърз лизис на инфектираните клетки и освобождаване на свободни вириони вече изложени на антитела, които могат да се свържат с тях и да улеснят тяхното разрушаване.

От друга страна, нелизиращите се, персистиращи вируси са изложени в по-малка степен на хуморалната имунна система и следователно гостоприемникът зависи в по-голяма степен от развитието на клетъчен имуен отговор, за да се освободи от инфекцията.

Хуморалният имуен отговор е във фокуса на повечето изследвания при VB19 имунитета, затова клетъчен имуен отговор и по-специално CD4+ и

CD8+ Т клетъчни пролиферации са изследвани едва наскоро [28].

Тъй като VB19 е вирус, който притежава характеристиките на вируси, които се евакуират класически литично и на нелитичните, персистиращи такива, не е изненадващо, че и хуморалната и клетъчната имунни системи са ангажирани в борбата с него. Запазването на отговорите след 1 и дори 2 години изглежда несвойствено в отсъствието на антигенен стимул, което означава, че VB19 макар и не класически персистентен вирус, успява да персистира в тялото за продължителен период от време; и така може да бъде в по-голяма степен инфектиращ вирус от типа „удар и задържане“.

VB19 имунни отговори при хронично инфектирани лица

Ниско ниво на VB19 вiremия се описва в различни изследвания като периодът на персистенция може да бъде от 10 месеца до 5 години [17].

Последни данни предполагат, че има насочване към CD8+ Т клетъчните отговори при персистентно инфектирани лица, отнасяни не само към неструктурния (NS1) ген, но и към структурните (VP1иVP2) гени на вируса [15]. Според различни изследвания честотата на персистиращите VB19 инфекции се движи между 0,6%, 1,3% и 7,9% в зависимост от чувствителността на използваните диагностични методи [7].

Персистентност на вирус В19 при имунокомпрометираност: протичане, носителство и доказване

Клиничната картина на острата и персистентна В19 вирусна инфекция значително се отличава при имунокомпрометирани лица в сравнение с тази при имунокомпетентни. При липса на ефективен хуморален и/или клетъчен имуен отговор, VB19 не се изчиства от организма и причинява системна супресия на костния мозък, манифестирана с персистираща ретикулоцитопения, тромбоцитопения от централен произход и потенциално тежка хронична анемия от типа Pure Red Cell Aplasia (PRCA), както и преходна апластична криза (Transient Aplastic Crisis-TAC) при лица с хронична хемолитична анемия без предполагаемите обрив и атралгия [5].

Хематологичните параметри са адекватни на персистиращата инфекция и същевременно различни при двете клинични прояви, а именно: доказване на вирусна ДНК за период от 2 до 3 седмици при TAC и за неопределено дълго време при PRCA; наличие на умерена антитяло активност при TAC и липса на такава при PRCA; спад и възстановяване на ретикулоцитите и хемоглобина при TAC и срив на същите показатели при PRCA;

клинични прояви със симптоми на анемия за период около месец при ТАС и персистираща анемия за неопределен период при РСА.

Лабораторната диагностика на персистентната инфекция се провежда преди всичко с молекулярни техники на съответен клиничен материал за откриване на вируса.

Съвсем на място възниква въпросът какъв би могъл да бъде механизмът на хроничното носителство на вирус В19? Малко вероятно е и явлението на реинфекция или реактивация с оглед присъствието на високи нива IgG наблюдавани в изследваната популация. Възможността фрагменти от вирусна ДНК, вместо цели вириони да остават в циркулацията, е също малко вероятно поради установяването на вирусна ДНК с двойка праймери амплифициращи две отдалечени области от генома (NS1 и VP1 гени). Това показва, че вирусния геном е цялостен, а не фрагментиран. Относителната степен на имуномодулация свързана с повтарящи се трансфузии може да е станала причина персистенцията да се установява по-често при реципиенти, отколкото в лица, при които няма кръвопреливания, каквито са кръвните донори.

В19 вирусна инфекция при кръвни донори: методи за доказване и чувствителност

Въпреки че, основният път за разпространение на ВВ19 е въздушно-капковият, възможен е и парентерален пренос чрез преливане на кръв и кръвни продукти, произведени от плазмени пулове, особено факторите на кръвосъсирване VIII и IX, съдържащи донорска кръв от вiremичната фаза на вирус В19 инфекцията. Това се случва около 7 до 9 дни след контакта и предхожда появата на клиничните симптоми с няколко дни, т.нар. „прозоречен период“, когато донорите се оказват асимптомни.

Малките размери на вируса (18-26 nm), липсата на липидна обвивка и ограниченото ДНК-съдържание правят В19 вирусите особено резистентни на солвентно-детергентни методи на третиране, използвани за инактивиране на други вирусни контаминанти. Малките размери на вирионите правят невъзможно също и отстраняването им чрез филтрация с вирус-отстраняващи мембрани [29]. Третиране на течността с високи температури, считан за високосигурен метод за вирусна инактивация: при 60°C (пастюризация), лиофилизация и третиране на 100°C за 30 минути след лиофилизация се оказват със съмнителен ефект по отношение на вирусната издръжливост; така третиран материал се оказва, че е контаминирал концентрати на фактор VIII и IX [25]. Инфекциозният потенциал на вируса нараства особено в отсъствието на специфични В19-IgG антитела.

В тази връзка, първото доказателство за кръвно-преносима В19 инфекция е описано през 1995г при 22-годишен пациент, страдащ от таласемия майор с последващо развитие на ТАС и преходни сърдечни неблагоприятия [30].

Рискът от трансмисия чрез хемотрансфузия и плазма-derivatни продукти е отдавна известен. До неотдавна се считаше, че антивирусните антитела в плазмата правят ВВ19 по-малко инфекциозен при трансфузионната трансмисия и терапия с кръвни продукти. Това обаче сега е недостатъчно след установяването на различните вирусни генотипа на род Еритровирус и новите човешки парвовируси (PAR4 и PAR5), получени от пациенти с остър инфекциозен синдром, както и от асимптоматичен кръвен донор [11].

След 2002 г. [24], производители на *плазмени деривати*: човешки албумин, коагулационен фактор VIII и IX, нормален човешки имуноглобулин, анти-D имуноглобулин и др. въведоха скрининг на мини пулове чрез техника за амплификация на нуклеинови киселини (NAT) [4]. Това позволява нивата на еритровирусна ДНК да бъдат значително понижени в стартовите пулове, т.е. методиката установява неинфекциозна „имунологично тиха вирусна ДНК“. Допускан праг за контаминация <10⁴ геномни копия на мл (gEq/ml).

В много страни скринингът на *донорска кръв* по настоящем е общо прието, но не стриктно регулаторно изискване. Силно се препоръчва рутинното *тестиране преди трансплантация на донора и реципиента*. Провеждането на постоянен мониторинг на кръвта, кръвните продукти и работещия персонал трябва да бъде рутинна процедура, за да се осигури безопасност на тези продукти, особено при приложението им на пациенти от високо рискови групи, което би предотвратило и възникването на *нозокомиални* случаи.

Разпространението на ВВ19 носителство в кръвни донори варира най-общо в около 1%, съгласно чувствителността на използвания метод и активността на вируса в популацията (през епидемичен и неепидемичен период) според обобщените данни на редица авторски колективи от 0,03% до 0,6% [16]. При неотдавна проведено изследване в Корея [22] е било установено, че присъствието на В19 вирусна ДНК в здрави донори при плазмафереза е 0,1%, което е по-малко в сравнение с данни от други страни като САЩ (0,83-0,88%), Германия и Австрия (0,5 до 0,9%). По данни на ирландски автори [8] в неепидемични години ВВ19 се среща в 1:16000 трансфузии, докато в епидемичен период съотношението силно нараства до 1:3790. За нашата страна има данни от скринирането на кръвна банка при ВМА, като сред 5560 донорски единици ВВ19 антигенемия е открита в 0,09% [18].

**Вирус В19 и кръвни продукти:
безопасност и приложение при
пациенти с хеморагични диатези,
трансфузионно зависими анемии и
имунодефицитни състояния**

Рискът от пренос на инфекцията чрез кръвопреливане и продукти, получени от плазма, е известен от години и много производители на плазмени деривати скринират продуктите си чрез количествен qPCR. Количествено измерване на VB19 ДНК би трябвало да се прави и при предстоящи кръвопреливания при имunosупресирани лица и други рискови групи. Всъщност препоръки, че кръвни донори с високи титри на анти-В19 имуноглобулин G трябва да се използват за донорства на високорискови реципиенти са направени вече в Холандия от Комисията на здравния съвет [12]. За клетъчните кръвни продукти (еритроцитна маса), получени от един донор или от ограничен брой донори и приложени на един пациент или на ограничен брой пациенти, Комисията препоръчва да бъде одобрен *подход за рискови групи*, а именно: бременни жени (освен в случаите на преливане по време на раждане), пациенти с вродена или придобита хемолитична анемия и такива с клетъчен имунодефицит, които нямат установими антитела срещу VB19, да бъдат прилагани кръвни продукти „безопасни за PVB19“. Комисията дефинира като „безопасни за В19 вирус“ клетъчни кръвни продукти от един донор, при който IgG антитела срещу VB19 са били установени в 2 отделни кръвни проби - едната взета поне 6 месеца след другата. Пациенти, различни от тези в рисковите групи трябва да продължат да получават клетъчни кръвни продукти, които се произвеждат в съответствие с текущите критерии за безопасност.

Този подход за рисковите групи препоръчан за клетъчните продукти не може да бъде приложен за плазмени продукти, поради широкото им производство и употреба.

За плазмени продукти, приготвени от плазмени пулове и прилагани на голям брой пациенти, мерките трябва да бъдат насочени към понижаване нивата на инфекциозност на VB19 в такива пулове. Силно инфекциозните донорства трябва да бъдат идентифицирани и отстранени преди отделните проби да бъдат обединени в пулове. Възприемчивостта зависи не само от фактори в гостоприемника, но също и от връзката на вирусния товар и титрите на анти-вирусните В19-IgG в кръвния продукт.

Хора с нарушен клетъчно медиран имунитет (т.е. синдром на тежък комбиниран имунодефицит; синдром на придобит имунодефицит; и пациенти на имunosупресивна терапия след органна трансплантация) могат да развият чиста еритроцитна аплазия, при която супресията на

еритроидните предшественици е постоянна. Началото на анемията след трансплантация варира от 2 до 34 месеца. Смята се, че производството на специфични антитела срещу вируса представлява основната защита срещу вирус В19, като нормалният човешки имуноглобулин често изчиства вируса от периферната кръв и завършва с клинично подобрене при имunosупресирани лица.

Доказана е връзка между острата лимфобластна левкемия и персистентната VB19 инфекция, която досега се считаше, че представлява опортюнистична инфекция, чиято хроничност е породена от имunosупресията [9]. Предполага се, че ако VB19 наистина играе роля в патогенезата на острата левкемия, вирусът може вече да не присъства в серума в момента на диагнозата, но може да присъства в други по-защитени места като изчистването от тези области може да е отложено във времето. Докладва се, че персистираща VB19 инфекция в имунокомпрометирани пациенти е честа причина и за анемии при СПИН инфекция. При пациенти със СПИН и с чиста еритроцитна аплазия, търсенето на VB19 ДНК в серума или в костния мозък е препоръчително. При HIV позитивни пациенти без СПИН, инфекцията протича като лека екзантема, артропатия и без хематологична симптоматика, както и че VB19 антитела може да присъстват в по-голяма степен при тях отколкото в общото население; ограничени изследвания в това направление са проведени и от наши автори [1]. При HIV позитивни пациенти с напреднал имунодефицит се среща персистентна анемия без обрив и други клинични прояви.

Около 50% от възрастните пациенти и 10% от децата, подложени на химиотерапия при хематологични злокачествени заболявания, персистентно инфектирани с вирус В19, са засегнати от тежки и дори летални цитопении, както и около 1-2% от пациентите с трансплантации на органи и стволови клетки получаващи животозастрашаващи усложнения причинени от парвовирусната инфекция. Случаите на асоциирани с еритровирус В19 панцитопении или изолирани пении на различни хематологични клетъчни линии *могат погрешно да бъдат интерпретирани* като повторение на текущото злокачествено заболяване или въздействие на други микробни инфекции, като отпадане на присадката, лекарствена токсичност и др.

Инфекцията с вирус В19 трябва да се включва задължително в *диференциалната диагноза* на необяснените тежки хронични анемии и тромбоцитопения при имунокомпрометирани лица, а ранното откриване на VB19 е от изключителна важност за терапията при такива пациенти: кръвопреливане и интравенозен имуноглобулин (IVIg) във високи дози.

В19 вирусна инфекция при пациенти с костно-мозъчна и органна трансплантация

Пациенти с костно-мозъчна трансплантация

Докладвани са два случая [19] на инфекция с човешки парвовирус В19 като рядко, но предвидимо усложнение малко след аlogenна трансплантация на кръвни стволови клетки (PBSCT), което отшумява от само себе си. Първия пациент е 48 годишна жена, лекувана от вторична остра миелоидна левкемия (AML) след химиотерапия за рак на гърдата. Тя получила PBSCT при втората пълна ремисия от подходящ донор без роднинска връзка с нея. На десетия ден след трансплантацията развила еритематозен обрив, съпроводен със сърбеж по кожата на двете ръце и линията на врата, първоначално напояващ за остра болест на присадката (aGvHD), но в последствие това твърдение се отхвърлило, тъй като обривът мигрирал от линията на врата към корема и обратно като обхванал и двата крака. Диференциалната диагноза включвала ранна остра кожна болест на присадката (aGvHD), вирусна еритема или лекарствено-индуцирана еритема. Последната изглеждала най-невероятна, тъй като не били прилагани нови медикаменти. За изясняване на диагнозата били взети проби: кожна биопсия и костно-мозъчен аспират, които се оказали положителни за VB19 (700gEq/ml при костно-мозъчната биопсия). Вторият пациент е също аналогичен случай.

Пациенти с бъбречна и чернодробна трансплантация

Инфекцията с VB19 в трансплантирани лица се отличава от тази при имунокомпетентни пациенти по това, че вирусната репликация може да присъства за дълъг период от време като има за резултат персистиращата анемия. Началото на свързаните с VB19 симптоми може да се появи по всяко време след трансплантацията. Начинът за пренос на вируса е неизвестен при тези пациенти. Възможностите включват инхалация на инфектирани аерозоли, както при имунокомпетентните реципиенти, така и също чрез пренос от донор. Възможността за вирусна реактивация също съществува, както в случаите с херпес-вирусни инфекции, макар че се знае малко за латентността на VB19 и за клетъчните му резервоари. Тъй като анемията е чест проблем при бъбречнотрансплантираните пациенти, е важно общопрактикуващите лекари да имат предвид тази диагноза, особено за случаите на тежка необяснима или рекалцитрантна анемия. Други клетъчни линии също могат да бъдат повлияни и това да доведе до левкопения и тромбоцитопения. По-малко известна информация съществува при: преходна алографска дисфункция, колапсна глу-

мерулопатия, остра реакция на отхвърляне на трансплантата и тромбозна микроангиопатия (ТМА). Серологичните изследвания имат ограничено приложение, тъй като те могат да бъдат повлияни и възпрепятствани от трансфузия или имуноглобулинова терапия.

Thaunat [27] описват първи случай на хемофагоцитна лимфохистоцитоза (HLH) при 24-годишен мъж с бъбречна трансплантация, при който се появява треска, тежка анемия и дисфункция на алоприсадката 2 години след трансплантацията. Били отбелязани още хиперферитинемия, хипертриглицеридемия, повишена серумна лактат дехидрогеназа, цитопения и фрагментирани еритроцити в периферната кръв. Изследването на костния мозък разкрило гигантски пронормобласти и множество хистоцити с вътреклетъчни хематопоеични елементи отговарящи на HLH. Присъствието на анти-VB19 IgM антитела и вирусна ДНК в серума на пациента (установена с qPCR) потвърдило остра инфекция с VB19.

Изходът на асоциирана с инфекция хемофагоцитна лимфохистоцитоза зависи от предизвикващия патоген. Ебщайн-Бар вирус (EBV), цитомегаловирус (CMV) и парвовирус В19 (VB19) са сред най-често предизвикващите това състояние агенти.

Еритроцитната аплазия (PRCA) е относително рядко заболяване, характеризиращо се с инхибиране на еритропоезата в костния мозък и с множество фактори участващи в развитието на заболяването, асоциирано главно с трансплантация на цели органи.

Има нарастващ брой доклади за PRCA причинена от VB19 след бъбречна трансплантация, но много малко описани случаи с реципиенти на чернодробна трансплантация. Това тежко усложнение обикновено следва от високо дозова интравенозна имуноглобулинова терапия (IVIg) с възстановяване на еритропоезата, но повтаряне на заболяването се случва често и опитът в справянето с това рядко и лесно повтарящо се заболяване е недостатъчен. Съобщава се още, че IVIg контаминиран с VB19 също може да бъде източник на инфекция. Търговският имуноглобулин е добър източник на неутрализиращи антитела срещу вируса, като е доказано, че високи дози IVIg имат съществена роля в лечението на заболяването. Това се основава и на факта, че вирусът е широко разпространен и чест инфекциозен патоген при хората, а наличието на B19-IgG антитела срещу него достига 60% до 80% при възрастните популации.

Заклучение

Предпазването на пациентите от досег с VB19, скринингът на кръвните продукти за наличие на вируса преди вливанията и тестването на орган-

ните донори преди трансплантацията могат да бъдат отнесени към превантивните мерки. Стратегии за намаляване на вирусния товар в производствените плазмени пулове чрез отстраняване на VB19 ДНК положителните донорства както и развитието на нови мощни методи за инактивация на вируса също се препоръчват за практиката. Съгласно значението на кръвно-преносимите инфекциозни агенти в трансфузионната медицина, последните се кодират условно в няколко групи: код „червен“ са потенциални агенти с тежък клиничен изход (HIV и HCV); при код „оранжев“ е необходим висок приоритет и внимание в бъдеще време по отношение на засегнатите лица (HBV, CMV, EBV); към код „жълт“ спадат също агенти с обществен и регулаторен ангажимент спрямо тях и код „бял“, включващ агенти, при които не се явява необходимост от по-високо внимание към тях за момента. VB19 се отнася към приоритетната група с код „жълт“ и се счита за един от опасните инфекциозни агенти в хемотрансфузиологията, особено при определени рискови групи [26]. При всички тях се налага прилагане на постоянен мониторинг с използване на конвенционални и съвременни молекулярно-диагностични техники, оптимизирани със стандартите на СЗО, приложени не само в клиничните вирусологични лаборатории, но и в трансфузионните центрове. Оставаме с надежда този материал да заостри вниманието на медицинската общественост в страната, относно обсъждане възможността за мониториране на тези дейности - донорство и производство на плазмени деривати и в нашата страна, особено в случаи на определени техни приложения.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Михнева З. и съавт. Наличие на специфични IgG антитела към човешки парвовирус B19 в имунокомпрометирани пациенти - Медицински преглед „Инфекциозни заболявания“, 33, 2002, №4, 32-36
2. Anderson, M.J. et al. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? - Lancet, 1983; 1:1378
3. Anderson M.J. et al. Human parvovirus B19 and hydrops fetalis, Letter - Lancet, 1988; 1 : 535
4. Baylis, S. et al. Collaborative study to establish a replacement WHO International Standard for Parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays - Vox Sang, 2010; 98: 441-446
5. Brolinden, K., T. Tolfvenstam, O. Norbeck Clinical aspects of parvovirus B19 infection - J Intern Med, 2006; 260: 285-304
6. Brown, K.E., N.Young, L.Barbosa Parvovirus B19 implications for transfusion medicine: summary of a workshop - Transfusion, 2001; 41: 130-135
7. Candotti, D. et al. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples - J Virol., 2004; 78: 12169-12178
8. Corcoran, A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. J Med Microbiol 2004; 53: 459-75.
9. Corcoran, A. et al. Establishment of functional B cell memory against parvovirus B19 capsid proteins may be associated with resolution of persistent infection - J Med Virol, 2006, 78: 125-128
10. Cossart, Y. E. et al. Parvovirus- like particles in human sera - Lancet, 1975, 1:7273
11. Fryer, J.F. et al. Novel Parvovirus and Related Variant in Human Plasma - Emerging Infectious Diseases, 12, 2006; 1:151-154
12. Groeneveld, K., J. van der Noordaa Blood products and parvovirus B19 - Neth J Med, 2003; 61: 154-156
13. Heegaard, E.D., K. E. Brown Human parvovirus B19 - Clin Microbiol Rev., 2002;15:485-505.
14. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV 2007), Virus taxonomy: 2007 release. Virology division, IUMS Available at <http://www.ictvonline.org>
15. Isa, A. et al. Prolonged activation of virus-specific CD8+ T cells after acute B19 infection PloS Med, 2005; 2: e 343.
16. Jordan, J. et al. Human Parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients - Vox Sang, 1998;75:97-102.
17. Kerr, J.R. et al. Persistent parvovirus infection - Lancet, 1995; 345: 1118
18. Lambova, R., R. Kulinska, A. Andreev Prevalence of Human Parvovirus B19 in volunteer Blood donor population - Biotechnol & Biotechnol. Eq., 18, 2004, 1, 91-94
19. Muetherig A. et al. Human parvovirus B19 infection with GvHD-like erythema in two allogeneic stem cell transplant recipients - Bone Marrow Transplantation, 39, 2007; 5: 315-316
20. Nguyen, Q.T. et al. Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia - J Clin Microbiol., 37, 1999, 2483-2487
21. Nguyen, Q.T. et al. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6 - Virology, 301, 2002, 374-380
22. Oh, D.J. et al. Investigation of the Prevalence of human Parvovirus B19 DNA in Korean Plasmapheresis Donors - Korean J Lab Med, 2010; 30: 58-64
23. Pattison, and D. A. J. Tyrell. 1985. Experimental parvoviral infection in humans. J. Infect. Dis. 152:257-265.
24. Saldanha, J. et al. Collaborative study group. Establishment of the first WHO International Standard for human Parvovirus B19 nucleic acid amplification techniques - Vox Sang. 2002, 82: 24-31
25. Santagostino, E. et al. Transmission of parvovirus B19 by coagulation factor concentrates exposed to 100° C heat after lyophilization - Transfusion, 1997; 37: 517-522
26. Stramer, S.L. et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety - Transfusion, 2009; 49: 1S-29S
27. Thauvat, O. et al. Nephrotic syndrome associated with

hemophagocytic syndrome - Kidney Int, 2006; 69: 1892-1893

28. Tolfvenstam, T. et al. Direct ex vivo measurement of CD8(+) T-lymphocyte responses to human parvovirus B19 - J Virol, 2001; 75: 540-543
29. Yunoki, M. et al. Inactivation on B19 by liquid heating incorporated in the manufacturing process of human intravenous immunoglobulin preparation - Br J Haematol, 2004; 128: 401-404
30. Zanella, A. et al. Transfusion-transmitted human parvovirus B19 infection in a thalassemic patient - Transfusion, 1995; 35: 769-772

Адрес за кореспонденция:

Зефира Георгиева Михнева
НРЛ "Морбили, паротит, рубеола", Отдел Вирусология, Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ),
1233 - София бул. "Столетов" 44А
Тел.: 02/ 931-07-13 в. 254;
Моб.тел.: 0877/ 66-97-43
e-mail: mihnevaz@yahoo.com

ХЕПСИДИН: НОВ ДИАГНОСТИЧЕН МАРКЕР ПРИ КЛИНИЧНИ НАРУШЕНИЯ В ОБМЯНАТА НА ЖЕЛЯЗОТО

В. Манолов¹, Б. Атанасова², Е. Хаджиев³, К. Цачев⁴

МУ София, УМБАЛ „Александровска”: 1,2,4 - Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология; 3. Катедра по клинична хематология

HEPCIDIN: A NEW MARKER IN DIAGNOSIS OF IRON METABOLISM DISORDERS

V. Manolov¹, B. Atanassova², E. Hadzhiev³, K. Tzachev⁴

Medical University – “Alexandrovskia” Sofia: 1,2,4 - Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, Central Clinical Laboratory

Резюме. Хепсидин-25 е ключов регулатор на абсорбцията на желязото и на освобождаването на елемента от клетките. Различни физиологични и патологични процеси регулират синтеза на хепсидина. Състояния, при които има повишени нужди от желязо (дефицит на елемента, хипоксия, анемия, и стимулирана еритропоетична активност), предизвикват намаление в синтеза на хепсидин в черния дроб. Намалението на хепсидина води до освобождаване на желязо от депата и повишение на абсорбцията на желязо от храната. От друга страна, инфекцията и възпалението повишават синтеза на хепсидин, а това води до недоимък на желязо за нуждите на еритропоезата. Повишеният хепсидин ограничава желязото в макрофагите и намалява абсорбцията в чревната лигавица. Изследването на хепсидин намира приложение като нов обещаващ маркер в диагностичната медицина при пациенти с хемохроматоза, анемии с натрупване на желязо, желязо-дефицитна анемия, прилагане на желязни препарати, желязо-рефрактерна желязо-дефицитна анемия, инфекции и възпалителни заболявания.

Ключови думи: хепсидин, обмяна на желязо, анемия, хемохроматоза

Summary. Hepcidin-25 is a main regulator of iron absorption and iron efflux from the cells. Hepcidin synthesis is regulating by different physiologic and pathologic processes. Several conditions with elevated iron need (loss of iron, hypoxia, anemia, stimulated erythropoietin activity) decreases liver hepcidin secretion. Low hepcidin levels stimulate releasing of iron from the stores and increase dietary iron absorption. On the other hand, infection and inflammation increases hepcidin secretion thus leading to insufficient iron for erythropoiesis. High hepcidin levels are related to iron accumulation in macrophages and to decrease intestinal uptake. Measurement of serum hepcidin levels is a novel marker for diagnosis of hemochromatosis, iron loading anemia, iron-deficiency anemia, administration of iron drugs, iron-refractory iron-deficiency anemia, in infectious and inflammatory diseases.

Key words: hepcidin, iron metabolism, anemia, hemochromatosis

Желязото е един от най-разпространените метали в земната кора и е есенциален елемент за почти всички живи организми. Той участва в разнообразни метаболитни процеси – транспорт на кислород, синтез на РНК и ДНК, транспорт на електрони, тъканно дишане, клетъчна пролиферация и диференциация, регулация на генната експресия. Поради двойствената му природа, поддържането на желязо в тесни граници в човешкия организъм е изключително важно за нормалното протичане на редица жизнени функции. Системното регулиране на хомеостазата включва

прецизен контрол на чревната абсорбция, на използването на желязо за еритропоезата, на ефективното рециклиране от загиващите еритроцити и на контролирано складиране в хепатоцитите и ендотелиалната макрофагиална система. Съвременното ниво на познание определя хепсидина-пептиден хормон, синтезиран в черния дроб, като ключов регулатор на хомеостазата. Хепсидинът взаимодейства с клетъчния експортер на желязо феропортин и модулира наличността на елемента с оглед на нуждите за организма.

Въведение

Хепсидин - синтез, функция, регулация

Системната хомеостаза на желязото включва: 1. строг контрол на абсорбцията на елемента в чревната лигавица; 2. ефективно използване за нуждите на еритропоезата; 3. ефективно използване от секвестрираните еритроцити; 4. съхранение в хепатоцитите и макрофагите. Използването на желязото в еритрона зависи преди всичко от ефективността на усвояването на елемента чрез трансфериновия цикъл в еритроидните прекурсори. Останалите три важни аспекта на хомеостазата (абсорбция, рециклиране и складиране) се контролират системно и координирано от хепсидина - пептид, синтезиран в черния дроб, който има главната отговорност да модулира наличността на желязо в зависимост от нуждите на организма.

Хепсидинът се синтезира от хепатоцитите като 25-аминокиселинен пептид, който се секретира в кръвообръщението (12). Последващи трансформации в тази струкура водят до получаването на две по-малки изоформи от 22- и 20- аминокиселинни остатъка. За сега все още малко се знае за произхода на тези по-малки изоформи, но съществуват данни, предполагащи участие на панкреаса (8). При физиологични условия, двете по-малки изоформи присъстват предимно в урината, но не се срещат в серума. Интересно е, че малките изоформи имат подчертано присъствие в серума на пациенти със заболявания, при които се наблюдава повишение на изоформата хепсидин-25 (инфаркт на миокарда, сепсис, анемия при хронични заболявания, хронична бъбречна недостатъчност (9,10,15,18,20)).

Съвременни проучвания показват, че освен в хепатоцитите, хепсидинът е представен в по-ниски концентрации и в други клетки: бъбречни тубули, ретина, моноцити, неутрофили, кардиомиоцити, алвеоларни клетки, β -клетки на панкреаса. Тези по-ниски нива нямат значим принос към системните концентрации в кръвообръщението, но те могат да упражняват локални ефекти върху секреторните тъкани: защита на съседни клетки от развитие на желязен дефицит, предотвратяване на екстрацелуларен оксидативен стрес, възможно влияние върху отговора при възпаление и/или изчерпване на извънклетъчното желязо, което е достъпно за външни патогени.

Хепсидин-25 е ключов регулатор на абсорбцията на желязото и на освобождаването на елемента от клетките. Той блокира действието на феропортина, който е експортер на желязо от макрофагите, хепатоцитите и дуоденалните ентероцити. Хепсидинът се прикрепва към феропортина върху клетъчната мембрана и отключва разграждането на експортера в лизозомите (12). Този регулаторен

механизъм води до повишено отлагане на желязо в клетъчните депа, до намалена абсорбция на желязо в чревната лигавица и до ниски концентрации на елемента в кръвообръщението.

Хепсидинът може да участва и в защитата на организма срещу външни патогени. Първоначално хепсидинът е бил идентифициран като антимикробен пептид. Бактерицидните ефекти обаче предполагат по-високи концентрации от тези, наблюдавани в кръвообръщението. Подобни високи концентрации могат да бъдат постигнати локално например във фагозомите или в инфектирани макрофаги (17). Хепсидинът може и индиректно да стимулира и защитата срещу външни патогени като намалява плазмените нива на желязото. Проучванията показват и роля на хепсидина в острия фаза на възпалителния процес, причинен от бактериални инфекции (2).

Регулирането на серумните нива на хепсидина се осъществява чрез модулиране на синтеза му в черния дроб (12). Всъщност, кинетиката на пептида включва транспорт в кръвообръщението както в свободна форма, така и в свързана предимно с α_2 -макроглобулин структура, филтрация през бъбречната гломерулна мембрана на свободната фракция, тубулна реабсорбция, тубулна секреция и екскреция. Липсата на реабсорбция в тубулите може да играе важна роля при редица нарушения в обмяната на желязото, които се свързват с тубулна дисфункция и повишени концентрации на хепсидин в урината – например при възпаление, свръх-обременяване с желязо и малария. При интерпретация на уринната концентрация на хепсидина като отражение на серумната му концентрация би трябвало да се имат предвид и евентуална тубулна секреция и нарушена тубулна реабсорбция (2,8). При всички случаи интерпретацията на уринните и серумни нива на хепсидина изискват комплексен подход с поглед както върху механизмите, регулиращи синтеза му по отношение на желязото, така и върху процесите, протичащи в бъбреците.

Различни физиологични и патологични процеси регулират синтеза на хепсидина (7). Състояния, при които има повишени нужди от желязо (особено при стимулирана еритропоеза), предизвикват намаление в синтеза на хепсидин в черния дроб. Подобни състояния са дефицит на желязо, хипоксия, анемия, и състояния със стимулирана еритропоетична активност. Намалението на хепсидина води до освобождаване на желязо от депата и повишение на абсорбцията на желязо от храната. От друга страна, инфекцията и възпалението повишават синтеза на хепсидин, а това води до недоимък на желязо за нуждите на еритропоезата. Повишеният хепсидин е отговорен за ограничаването на желязо в макрофагите, за намаляването на абсорбцията в чревната лигавица и за

ниските серумни нива на желязо при анемия при хронични заболявания.

Основните регулаторни механизми, които повлияват експресията на хепсидин, не функционират независимо един от друг, защото различни потенциални възможности предполагат взаимно повлияване между тях.

Серумните концентрации на хепсидина се определят в различна степен от отделните регулаторни фактори. Предложен е алгоритъм, който би могъл да очертае относителната значимост на тези регулатори при пациенти с нарушения в обмяната на желязото и който би могъл да предскаже относителното ниво на хепсидина на базата на известни клинично-химични параметри (С-реактивен протеин, трансфериново насищане и разтворими трансферинови рецептори), отразяващи степента на възпаление, концентрацията на серумно желязо и еритропоетичните регулаторни пътища. Този алгоритъм хвърля светлина върху взаимното повлияване на регулаторните пътища като показва, че инхибирането на хепсидина от еритропоезата пречи на стимулирането му от желязото и че възпалението силно повишава хепсидина независимо от статуса на желязото и еритропоетичната активност. Нуждите от желязо за еритропоезата намаляват хепсидиновата индукция, дължаща се на отговора при възпаление (8,11). Стимулираната и/или не-ефективна еритропоеза намалява индукцията на хепсидин, която зависи от повишеното желязо в депата. Не е ясно как дефектите в пътя на хемохроматозен железен протеин/трансферинов рецептор 2 повлияват стимулираната регулация, която се дължи на възпаление. Очаква се в бъдеще нови, добре обмислени проучвания да доведат до по-детайлно разбиране на регулацията на хепсидина при различни нарушения в обмяната на желязото.

Хепсидин и клинични нарушения в обмяната на желязото при човека

Нарушения, свързани с дефицит на хепсидин Хепсидин при наследствена хемохроматоза (НН).

Наследствената хемохроматоза обхваща генетични нарушения в обмяната на желязото с прояви на свръх-обременяване. Натрупването на желязо води до органични увреждания като чернодробна фиброза и цироза. При повечето пациенти няма съответно стимулиране на синтеза на хепсидин в отговор на повишеното съдържание на желязо в депата. Причина за това несъответствие са мутации в гените на хемохроматозен железен протеин, трансферинов рецептор 2, хемоувелин, които стимулират експресията на хепсидина или в по-редки случаи дефекти в гена, кодиращ структурата на самия хепсидин (11,19). Относително

ниските нива на хепсидина при тези болни водят до влошен контрол на чревната абсорбция и освобождаването от макрофагите, повишено серумно желязо и свръх-натрупване на елемента в черния дроб, сърцето и ендокринните тъкани. При пациенти с нелекувана ювенилна хемохроматоза (мутации в структурата на хемоувелин) концентрациите на хепсидина са много ниски (14).

При лекувани пациенти с класическа хемохроматоза поради мутация С282У в хемохроматозен железен протеин, серумният хепсидин е много нисък, вероятно поради комбиниран ефект на генния дефект и на флеботомията върху експресията на хепсидина. При тези пациенти се наблюдава силно повишение на серумното желязо (над това, типично за силно стимулирана абсорбция). Тези наблюдения пораждаат загриженост, че допълнителното понижаване на хепсидина от флеботомията при пациенти с наследствена хемохроматоза може да задълбочи съществуващата патология с много силно изразено освобождаване на излишно желязо в кръвообръщението, а това води до последващ порочен кръг от много чести поддържащи флеботомии (8). Подобни ефекти не се наблюдават при пациенти на флеботомия с мутации в трансферинов рецептор 2 и такива, които са с хемохроматоза при мутация на хемохроматозен железен протеин, но не са подлагани на флеботомия - вероятно при такива пациенти ниският хепсидин не стимулира чревната абсорбция при повишено трансфериново насищане. В тези случаи вероятно излишъкът от желязо от диетата навлиза в кръвообръщението като не-трансфериново свързано, бързо се изчиства от черния дроб и така не рефлектира върху системните серумни нива на елемента.

Мутациите в структурата на трансферинов рецептор 2 не са толкова чести както тези на хемохроматозен железен протеин. Клиничните прояви на двата типа генетични дефекти не се различават съществено. Тази изоформа на рецептора има значение не толкова за усвояване на дифери-трансфериновото желязо, колкото по-скоро регулира цялостния статус на елемента. Повишената експресия на протеина се наблюдава в отговор на трансфериновото насищане (12).

Хемохроматоза се наблюдава и при мутации в гена, кодиращ структурата на експортера на желязо феропортин. Съществуват 2 класа мутации във феропортиновата структура:

1. Мутации, при които феропортинът става нечувствителен към действието на хепсидина (ефект от загуба на хепсидиновата регулация). При пациенти с този клас мутации фенотипът е подобен на този при класическата хемохроматоза, но при тях не се наблюдава нисък хепсидин. След флеботомия, която възстановява депата на желязо (оценени чрез серумен феритин), тези пациенти

имат концентрация на серумен хепсидин или величина на отношението серумен хепсидин/феритин в рамките или над референтните интервали. Относително високите нива на хепсидина при някои пациенти биха могли да бъдат следствие от трансфериновото насищане, което остава високо независимо от приложената флеботомия.

2. Мутации, които засягат клетъчната локализация на феропортина и при които той губи своята експортна функция (ефект от загуба на функция (9,12). При тези мутации натрупването на желязо е генерализирано предимно в макрофагите. Фенотипът е различен от този на класическата хемохроматоза; уринният хепсидин е повишен, когато нарушението не е лекувано.

На базата на съвременните познания за молекулярната патогенеза на хемохроматозата, би могла да се формулира следната класификация (12,13):

- Клас 1 хемохроматоза: мутации в структурата на самия хепсидин - тези дефекти нарушават продукцията на функционалния по отношение на хомеостазата на желязото протеин.
- Клас 2 хемохроматоза: мутации в структурата на трите протеина, регулиращи хомеостазата на желязото - дефектите в тези структури нарушават основните регулаторни пътища, които нормално стимулират експресията на хепсидина.
- Клас 3 хемохроматоза: дефекти в структурата на експортера феропортин, при които той става нечувствителен към хепсидиновата активност.
- Предложено е клиничното състояние, което се дължи на мутации, при които феропортинът губи своята транспортна функция да се нарича «феропортинова болест».

Разработването и валидирането в клинично-лабораторната практика на методи за изследване на хепсидин показват, че пептидът би могъл да се прилага като нов обещаващ маркер в диагностиката (16). Потенциалните възможности на изследването на хепсидин при пациенти с хемохроматоза (диагностицирана или подозирана) биха могли да се обобщят в следните направления: а) скрининг за наследствена хемохроматоза при пациенти с повишен феритин; б) приоритетно насочване към генна диагностика (много ниски хепсидинови концентрации насочват към ювенилна хемохроматоза с дефекти в хемоювелина); в) отсяване на пациенти с хомозиготни мутации C282Y, които са рисков контингент за развитие на свръх-обременяване с желязо; г) мониториране на терапията с флеботомия.

Хепсидин при анемии с натрупване на желязо.

При наследствените анемии с натрупване на желязо като β -таласемия (major и intermedia)

и наследствената дисеритропоетична анемия тип I и II, а също и придобитите форми като миелодиспластичен синдром типове рефрактерна анемия и рефрактерна анемия с пръстеновидни сидеробласти, болният еритроцит не регулира нормално обмяната на желязото чрез инхибиране на синтеза на хепсидин дори и в присъствие на свръх-обременяване. Съотношението хепсидин/феритин е ниско при тези заболявания. Последствията от неефективната еритропоеза вероятно имат превес над тези, които се дължат на свръх-натрупване на желязо в депата. При сърповидно-клетъчната анемия, се добавят и фактори на възпаление. Вероятно повишението на хепсидина от възпалението смекчава токсичността на желязото, което би се наблюдавало при пациенти със сърповидно-клетъчна анемия (2,8).

При пациенти с наследствени форми на анемия, серумните концентрации на хепсидина биха позволили да се отидиференцират най-тежко засегнатите пациенти и да се предскаже и мониторира паренхимното обременяване с желязо.

Хепсидин при желязодефицитна анемия.

При пациентите с желязодефицитна анемия, както и при тези с нисък серумен феритин в латентна и прелатентна форма на дефицит без съпътстваща анемия (в резултат на кръвозагуба или недостатъчен прием на желязо от храната) се установяват много ниски нива на хепсидин, често дори под долната граница на откриване на използваните методи за количествен анализ на показателя (6).

Ефект от прилагане на жлезни препарати върху концентрациите на хепсидина.

При здрави индивиди се наблюдава повишение на концентрацията на хепсидина в серум и урина по време на прием на орални желязо-съдържащи препарати (8). Някои проучвания показват значима отрицателна корелация между серумния хепсидин и скоростта на абсорбция на желязо в червата. Серумните концентрации на хепсидина могат да служат като предиктор на терапевтичния ефект при прием на перорални жлезни препарати. Още повече, отговорът на хепсидина към терапията с перорални жлезни препарати би могъл да бъде полезен тест за оценка на абсорбцията на желязото при жлезен дефицит.

Хепсидин при придобити форми на хемохроматозно свръх-обременяване с желязо.

Някои ненаследствени увреждания на черния дроб като алкохолна цироза, неалкохолна стеатоза, неалкохолно чернодробно заболяване се съпровождат с умерено натрупване на желязо в чернодробния паренхим. При тези заболявания

е установена нарушена регулация на хепсидиновия синтез като резултат на оксидативен стрес, на стрес в ендоплазмения ретикулум и на медиации от цитокинен тумор некротичен фактор- α регулаторни механизми - относително намаленият синтез на хепсидин води до акумулиране на желязо в хепатоцитите (8,9). Серумният хепсидин би бил полезен маркер за нарушена регулация на желязото при тези форми на свръх-обременяване.

Нарушения, свързани с повишено ниво на хепсидин

Хепсидин при желязорефрактерна желязодефицитна анемия.

Повечето пациенти с това състояние не могат да усвояват желязото при орално суплементиране поради дефект на гена TMPRSS6, кодиращ матриптаза-2. Честите венозни трансфузии на еритроцитни концентрати частично повишават хемоглобина и средния обем на еритроцитите (2,5,8). Загубата на активност на матриптаза-2 не позволява да се намали хепсидина при дефицит на желязо. Съответно, пациентите имат генетично-детерминиран висок хепсидин, който води до ниско трансфериново насищане и серумен феритин около долната референтна граница (8,10). Определянето на серумните нива на хепсидин в тези случаи може да помогне да се отхвърлят или да се потвърдят подозренията за дефект в матриптаза-2 при сложни случаи на желязо-дефицитна анемия: подобен подход би спестил назначаването на многобройни излишни клинично-лабораторни изследвания, както и ще позволи да се избегнат забавено или неправилно лечение.

Хепсидин при инфекции и възпалителни заболявания.

Инфекциите се свързват със значими промени в хомеостазата на желязото. Анемията при малария се характеризира с ниско серумно желязо и повишен хепсидин, който е причина за акумулиране на желязо в ендотелиалната макрофагиална система и до недоимък на желязо за нуждите на еритропоезата (1,3,4,5,13). Вероятно повишеният хепсидин играе протективна роля срещу растежа на микроорганизми като намалява екстрацелуларното желязо. От друга страна, повишеният хепсидин може да доведе до дефицит на желязо и до невъзможност за ефективно компенсиране при орално суплементиране, защото подтиска абсорбцията на желязо през чревната лигавица. Повишеният хепсидин при възпаление може да увеличи вирулентността на бактериите, която зависи от количеството желязо в макрофагите (напр. *Salmonella*, *Mycobacteria spp.*). Такива патогени са характерни за ендемичните маларийни райони. Нецелесъобразното суплементиране с

желязо на деца от тези региони без дефицит в депата може да доведе до тежки странични ефекти поради стимулирана пролиферация на латентни патогени (2,8,9).

Хепсидинът е важен и за патогенезата на други инфекциозни агенти. При пациенти с вирусен хепатит С се наблюдава високо трансфериново насищане, висок серумен феритин и обременяване на черния дроб с желязо. Тези лабораторни данни за натрупване на желязо са съвместими с ниския серумен хепсидин, който е установен при тях.

Анемията при хронични заболявания е придобито нарушение на хомеостазата на желязото. Това състояние се свързва с инфекция, малигненост, органна недостатъчност, тежка травма или други случаи на възпаление. Анемията обикновено е слабо или умерено изразена, еритроцитите могат да не показват типични характеристики на дефицит на желязо. Подчертаната етиология, свързана с желязото е очевидна: нарушено рециклиране на желязо от макрофагите, нарушена чревна абсорбция на желязо, еритроидните прекурсори реагират бързо на дифери-трансферина, но еритропоезата е нарушена поради недостатъчно желязо. Характеристиките на този тип анемия се дължат на индуциран хепсидинов синтез поради действието на интерлевкин-6 и други цитокини. Доколкото желязорефрактерната желязодефицитна анемия също се причинява от висока експресия на хепсидин, би трябвало да се очаква, че анемия при хронични заболявания и желязо-рефрактерна желязо-дефицитна анемия би трябвало да имат общи клинични характеристики. Една поразителна разлика е, че желязо-рефрактерната желязо-дефицитна анемия се свързва с тежка микроцитоза, докато анемията при хронични заболявания е нормоцитна. Според някои автори нормоцитните еритроцити при анемия при хронични заболявания са резултат от действието на два противоположни ефекта: от една страна недостатъчно желязо, а от друга все още неизяснена в детайли тенденция към макроцитоза вероятно поради нарушена хомеостаза на фолата в отговор на възпалението (12).

Заклучение

Понастоящем няма лабораторен тест който да може напълно да отличи анемия при хронични заболявания (ACD) от желязодефицитна анемия (IDA) (7,8). От диференцирането на тези две състояния често се постига чрез комбинирането изследване на различни биохимични маркери на обмяната на желязото. Проучването на хепсидина при анемия при хронични заболявания е затруднено поради липса на златен стандарт като методологичен подход. Оценката на диагностичната значимост на хепсидина много зависи от де-

финирането на методология, която сама по себе си е само заместител на златен стандарт. Според някои изследвания хепсидинът е полезен маркер при отдиференцирането на ACD от IDA/ACD, но не и на IDA от IDA/ACD, докато според други хепсидинът позволява да се разграничи IDA от IDA/ACD, но не и ACD от IDA/ACD. Други автори представят данни за това, че концентрацията на хепсидина може да служи като полезен маркер при отдиференцирането и на 3-те групи патологични нарушения.

Изследването на хепсидина има потенциално полезно значение в диагностичните алгоритми за разграничаването на желязо-дефицитна анемия (IDA) от анемия при хронични заболявания (ACD) и от комбинираното състояние IDA/ACD. Бъдещи проучвания на отговора на хепсидина към суплементирането с желязо биха могли да приближат диагностиката към златния стандарт по отношение на обмяна на желязото. Изследването на хепсидина също би било ползотворно в предвиждането на последствията от суплементиране с желязо при инфекции и при възпалителни заболявания.

В съвременната клинично-лабораторна практика изследването на хепсидин в биологични матрици става чрез различни аналитични платформи: първо поколение, полуколичествени методи - SELDI-TOF-MS; второ поколение, количествени методи – мас-спектрометрия в комбинация с хроматография (Q-TOF LC-MS и MALDI-TOF-MS); имуноензимни методи (ELISA); ProteinChip technology.

Въвеждането на изследване на серумните хепсидинови нива в рутинната практика ще доведе до предоставяне на възможност за диагностициране на наследствената и вторична хемохроматоза; при наследствените и придобити анемии с натрупване на желязо; за диагноза, контрол и избор на терапия при желязо-дефицитна анемия; при нарушения, свързани с хепсидиновата секреция и функция.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Cherian S, Forbes DA, Cook AG, Sanfilippo FM, Kemna EH, Swinkels DW, Burgner DP. An insight into the relationships between hepcidin, anemia, infections and inflammatory cytokines in pediatric refugees: a cross-sectional study. *Plos One* 2008; 3: e4030.
2. De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, et al. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 2395–405.
3. De Mast Q, Nadjm B, Reyburn H, Kemna EH, Amos B, Laarakkers CM, et al. Assessment of urinary concentrations of hepcidin provides novel insight into disturbances in iron homeostasis during malarial infection. *J Infect Dis* 2009; 199: 253–62.
4. De Mast Q, Syafruddin D, Keijmel S, Olde RT, Deky O, Asih PB, et al. Increased serum hepcidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Haematologica* 2010; 95: 1068–74.
5. De Mast Q, van Dongen-Lases EC, Swinkels DW, Nieman AE, Roestenberg M, Druilhe P, et al. Mild increases in serum hepcidin and interleukin-6 concentrations impair iron incorporation in haemoglobin during an experimental human malaria infection. *Br J Haematol* 2009; 145: 657–64.
6. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008; 112:4292–7.
7. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010; 142: 24–38.
8. Joyce J.C.Kroot, Harold Tjalsma, Robert E.Fleming, Doreen W.Swinkels. Hepcidin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem* 2011; 57:12, 1650-1669
9. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectro-metry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin Chem* 2007;53: 620–8.
10. Kroot JJC, Laarakkers CM, Geurts-Moespot AJ, Grebenchtchikov N, Pickkers P, van Ede AE, et al. Immunochemical and mass-spectrometrybased serum hepcidin assays for iron metabolism disorders. *Clin Chem* 2010;56:1570–9.
11. Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 489–515.
12. Nancy C.Andrews. Forging a field: the golden age off iron biology. *Blood* 2008, 112(2): 219-230
13. Nweneka CV, Doherty CP, Cox S, Prentice A. Iron delocalisation in the pathogenesis of malarial anaemia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104:175–84.
14. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 2005; 105:4103–5.
15. Peters HP, Laarakkers CM, Swinkels DW, Wetzels JF. Serum hepcidin-25 levels in patients with chronic kidney disease are independent of glomerular filtration rate. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:848–53.
16. Popova JG, Terzieva D, Panova M. Determining pro-hepcidin, soluble transferring receptor and zn protoporphyrin in anemic syndrome cases. *Klin transfuz hematol* 1-2/2007; 43-48
17. Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, SchlesingerLS, Zwilling BS, Lafuse WP. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 934–45.
18. Suzuki H, Toba K, Kato K, Ozawa T, Tomosugi N, Higuichi M, et al. Serum hepcidin-20 is elevated during the acute phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med* 2009;218:93–8.
19. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. He-

editary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. Clin Chem 2006; 52: 950–68.

20. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, Ishikawa I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. Blood 2006;108:1381–7.

Адрес за кореспонденция:

Виктор Емануилов Манолов
Медицински Университет, Медицински Факултет,
Катедра по Клинична Лаборатория и Клинична
Имунология; Централна Клинична Лаборатория към
УМБАЛ „Александровска”
София 1431, ул. „Георги Софийски” № 1
Сл. Тел.: (2) 9230 913
Факс: (2) 9230 922
Gsm: 0887 222 069
e-mail: victhedoc2@yahoo.com

FREE LIGHT CHAINS OF IMMUNOGLOBULIN AS A PROGNOSTIC FACTOR IN GROUP OF PATIENTS WITH WALDENSTRÖM'S MACROGLOBULINEMIA, LIGHT CHAIN DEPOSIT DISEASE AND MULTIPLE MYELOMA

Vesna V. Radovic¹, Zoran V. Mijuskovic², Ljiljana J. Tukic³, Predrag M. Djurdjevic⁴,
Jelica D. Stojanovic⁵, Milica B. Zlatkovic⁶

¹ Research and Development, STADA Hemofarm A.D., 11000 Belgrade; Serbia

² Institute of Medical Biochemistry, Military Medical Academy, 11000 Belgrade; Serbia

³ Clinic of Hematology, Military Medical Academy, 11000 Belgrade; Serbia

⁴ Department of Hematology, Clinic of Internal Medicine, Clinical Center Kragujevac, 34000 Kragujevac; Serbia

⁵ Faculty of Natural Science and Mathematics, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac; Serbia

⁶ Institute of Toxicology and Pharmacology, National Poison Control Centre, Military Medical Academy, 11000 Belgrade; Serbia

Резюме. Цел: Целта на проучването е да оцени значимостта на съотношението на свободните леки вериги (FLC съотношение) като прогностичен фактор за постигането на ремисия, прогресия и преживяемостта при изследваната група болни. **Пациенти и Методи:** Нивото на имуноглобулините и свободните леки вериги бе изследвано по имунонефелометричен метод с апарат "SIEMENS" DADE BN II analyser и оригинални реагенти. Проучени бяха 74 болни с три групи заболявания. **Резултати:** Референтният интервал за FLC съотношение е 0.26-1.65. При болните с Макроглобулинемия на Валденщрьом (MW) и мултиплен миелом (MM), с абнормно FLC съотношение, в комбинация с неблагоприятни рискови фактори (67.5 %) се установи медиана на преживяемост 22–30 мес. При болните с нормално или леко променено FLC съотношение, без неблагоприятни рискови фактори (32.5%) MS бе 9–51 мес. В групата болни с болест на лековерижните гена при 33.3% референтното FLC съотношение корелира с нисък риск от прогресия и обратно, при 66.7% с абнормно FLC съотношение (< 0.03 or > 32) се установява висок риск от прогресия. При 31% от пациентите след терапия се установи понижение на FLC съотношението с $> 50\%$ и бе доказана ремисия. **Заклучение:** Абнормното FLC съотношение в други изследвани групи може да бъде независим рисков фактор за прогресия и неблагоприятна прогноза.

Ключови думи: съотношение на свободните леки вериги, Макроглобулинемия на Валденщрьом, болест на лековерижните гена, мултиплен миелом

Summary. Purpose: The aim of this study was to evaluate the significance of free light chains ratio (FLC ratio) as a prognostic factor for remission, progression and survival in the investigated group of patients. **Patients and Methods:** The concentrations of immunoglobulins and free light chains were measured by immunonephelometric method on a "SIEMENS" DADE BN II analyser with reagents. In this examination 74 patients from 3 different disease groups. **Results:** Reference interval for FLC ratio is (0.26-1.65). The patients with WM and MM with an abnormal FLC ratio and a combination of adverse risk factors (67.5 %) had median survival times of 22–30 months, versus patients with a normal or slightly varied FLC ratio without adverse risk factors (32.5%) with median survival times of 39–51 months. In the group of patients with LCDD, 33.3% had reference values FLC ratio which corresponds to low risk of disease progression, as opposed to 66.7% with abnormal FLC ratio (< 0.03 or > 32) which corresponds to high risk. Approximately 31% of patients under therapy had a decrease in FLC ratio $> 50\%$, and have achieved remission of disease. **Conclusion:** Abnormal FLC ratio in other examined groups, could be an independent risk factor of progression and a worse disease prognosis.

Key words: free light chains ratio, marker, Waldenström's macroglobulinemia, light chain deposit disease, multiple myeloma

INTRODUCTION

Plasmocytes are the place of synthesis of the immunoglobulin (Ig) molecule, which consists of 2 heavy chains (HC) and 2 kappa (k) or lambda (λ) polypeptide light chains (LC). Under normal conditions, the concentration of polyclonal free k and λ light chains (FLC) are 3-19 and 5-26 mg/L, respectively. In abnormal conditions, one or several clones of B lymphocytes or plasmocytes synthesize only LC Ig, of k or λ type in excessive amount [1]. Waldenström's macroglobulinemia (WM), also called primary macroglobulinemia is a rare malignancy, hematological disease, or lymphoma that is characterized by increased concentrations of monoclonal IgM (M-IgM) in serum, too many of lymphoplasmacytic cells in the bone marrow, and unlike multiple myeloma (MM), involvement of visceral organs, including liver and spleen. The etiology of the disease is unknown. Disease incidence is 5-10% in patients with MM, with average annual increase of 1500 new cases in the USA and 300 in Great Britain. Average age of the ill is 65, and median survival time is 5 years. Over 20% of the patients live more than 10 years, and many of them die of diseases that are not related to this [2]. Only patients that have symptoms, enlarged lymph nodes, hepatosplenomegaly or anaemia were subjected to treatment. Also, light chain deposition disease (LCDD) is a rare, malignant plasma cell dyscrasia characterized by non-amyloid deposits in various organs. It is the most common form of M-Ig deposition disease which includes light heavy chain deposition disease (LHCDD) and heavy chain deposition disease (HCDD). In LCDD, which comprises 80% of the cases of monoclonal immunoglobulin deposition diseases (MIDD), monoclonal serum free light chains (sFLCs) are precipitated on the basal membranes of cells in the kidneys and other organs [3]. The rate appears to be much higher amongst patients with a monoclonal gammopathy (MG) who underwent a kidney biopsy [4]. Many patients with LCDD also have MM. The rate of myeloma varies from 37% to 65% [5]. The median survival varies from 18 months to over 5 years. MM is a neoplastic plasma-cell disorder that is characterized by clonal proliferation of malignant plasma cells in the bone marrow, monoclonal protein in the blood or urine, and associated organ dysfunction [6]. It accounts for approximately 1% of neoplastic diseases and 13% of hematologic cancers. In Western countries, the annual age-adjusted incidence is 5.6 cases per 100,000 persons [7]. The median age at diagnosis is approximately 70 years; 37% of patients are younger than 65 years, 26% are between the ages of 65 and 74 years, and 37% are 75 years of age or older [7]. Sensitive, latex agglutination test is used for detection of LC Ig, and it differs from earlier LC tests in that new polyclonal At reacts only with epitopes that are hidden when connected

with HC, but available when not connected with HC [8]. Concentrations of serum FLC (FLCs) are more sensitive, accurate and precise indicators for detection, characterization and monitoring of the course of various types of paraproteinemia. Urine analysis is not a reliable evidence of the change of concentration of synthesized FLC [9]. The aim of FLC examination was to evaluate the significance of the FLC ratio as a prognostic factor for remission, progression and survival in different disease groups.

PATIENTS AND METHODS

In this prospective clinical study that lasted from 2007 to 2011, the patients (n=74) were divided into 3 groups:

1. A group including patients with WM (M-IgM) (n=21).
2. A group including patients with LCDD (n=3).
3. A group including patients with MM (n=50).

Thorough clinical examinations were done for all 3 groups, and based on them, the patients were classified in suspected clinical diagnoses. Serum samples (2 ml) for protein measurement were taken in the morning in vacutainers without anticoagulant from inpatients and outpatients. After blood collection and spontaneous coagulation at room temperature samples were centrifuged at 5000 rpm and analyses were done in fresh sera immediately; some samples were kept at -20° C up to one month, and for longer periods, they were stored at -70° C. Quantitative determination of FLC and classes (isotypes) of Ig was done by automated immunonephelometric method on SIEMENS DADE Behring II analyzer with reagents (FREELITE, The Binding Site, UK), according to the instructions of the manufacturer in software programs for each analytical parameter.

Statistical analysis

The results were presented as FLC ratio expected value (EV) of medium values (M) and standard deviations (SD), and coefficient of variation (CV) of two groups of patients (WM (M-IgM) and LCDD). The obtained data were processed through the *IBM SPSS statistics 19* software package. The results were registered as individual or mean values with SD of groups of patients with MM. Sensitivity (SN), specificity (SP), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were used to determine the value of diagnostic test (FLC cut-off value 300 mg/L) on the probability of appearance of low and high risk of disease progression. The low risk category was obtained with a risk index 0 and 1 and the high risk category with a risk index 2 and 3. The obtained data were processed through the *Stat for Windows, R.4.5.* software package.

RESULTS

The paper includes 74 patients for the period of 5

years, divided into 3 groups. In the group of patients with WM (M-IgM), at the time they were diagnosed, 21/21 (100%) patients had concentrations of FLCs deviating from the reference interval ($\kappa=3.3-19.4$; $\lambda=5.71-26.3$) mg/L. Concentrations of FLCs of κ -type are from 11.3 to 1700.4 (mg/L), and for FLCs of λ -type from 4.1 to 796.0 (mg/L) (Figure 1). The results obtained with immunonephelometric test show that 1 (4.8%) patient had FLC ratios within the reference interval (0.26-1.65) and median survival of 51 months (range 33-69), and 7 (33.3%) patients high abnormal FLC ratios (< 0.03 or > 32) and median survival of 22 months (range 16-28). The remaining 10 (47.6%) patients had intermediate abnormal FLC ratios (< 0.125 or > 8) (median survival 30 months, range 22-38), and 3 (14.3%) patients had low abnormal FLC ratios (< 0.26 or > 1.65) with median survival 39 months (range 27-51). Based on the value of FLC ratio, more than half of the patients had intermediate and high abnormal FLC ratios, and thus they were

at higher intermediate and high relative risk (RR) of disease progression and poorer prognosis. In the group of patients with LCDD, at the time they were diagnosed, 3/3 (100%) patients had concentrations of FLCs deviating from the reference interval. Determined concentrations of FLCs of κ -type are from 12.7 to 416.8 (mg/L), and of FLCs of λ -type from 6.66 to 529.0 (mg/L) (Figure 2). The results obtained with immunonephelometric method show that 2/3 (66.7%) patients had high abnormal FLC ratios (< 0.03 or > 32), with the presence of other risk factors. These patients were at high RR of disease progression, and with that, a poor prognosis. In 1/3 (33.3%) patients, the values of FLC ratios slightly deviated from the reference interval (0.26-1.65). The patient was at low RR of disease progression, and with that, had better prognosis (Table 1). In the group of patients with MM, at the time they were diagnosed 43/50 (86%) patients had concentrations of FLCs deviating from

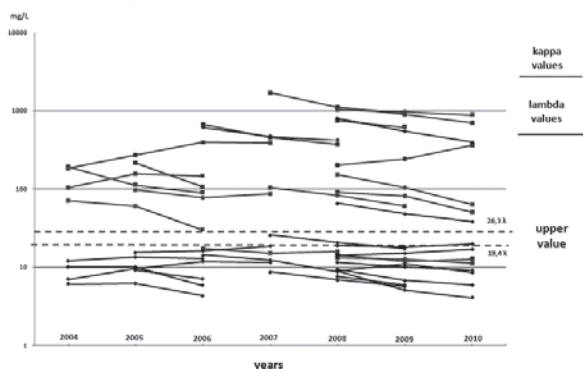


Fig. 1.

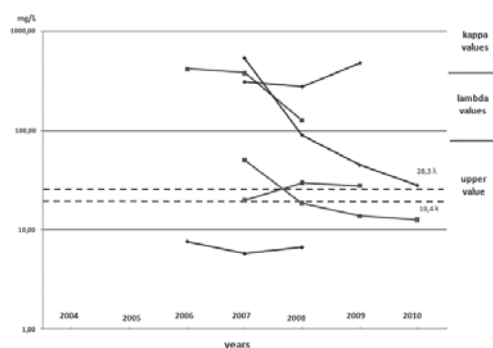


Fig. 2.

Table 1. The risk factors in 3 patients with LCDD

Type of LC Ig (No=number of patients)	FLC ratio	S β 2M (g/L)	Serum albumin (g/L)	The RR of disease progression
λ (n=1)	0.26 - 1.65	< 3.5	≥ 35	Low risk
	1 (33.3%)			
κ (n=1)	< 0.03 or > 32	≥ 5	< 35	High risk
λ (n=1)				
	2 (66.7%)			

Abbreviations: LCDD – light chain deposition disease; LC - light chain; Ig - immunoglobulin; FLC ratio - κ/λ ratio; S β 2M - serum β 2 microglobulin; RR relative risk

the reference interval. Concentrations of FLCs of κ -type ranged from 7.4 to 1950.0 mg/L, and for FLCs of λ -type from 3.0 to 640.0 mg/L. The results obtained with immunonephelometry showed that 9 (18%) patients had FLC ratios within the reference interval (0.26-1.65) and median survival of 51 months (range 33-69), and 15 (30%) had highly abnormal FLC ratios (< 0.03 or > 32) and median survival of 22 months (range 16-28). The remaining 12 (24%) patients had intermediately abnormal FLC ratios (< 0.125 or > 8) (median survival 30 months, range 22-38), and 14 (28%) had low abnormal FLC ratios (< 0.26 or > 1.65) with median survival 39 months (range 27-51) (Table 2). Based on the value of FLC ratio, more than half of the patients had intermediate and highly abnormal

FLC ratios, and thus they were at higher intermediate and high RR of disease progression and poorer prognosis (Fig. 3, Fig. 4).

The first group of 21 patients with WM (M-IgM) was characterized by significantly less mean values deviation of FLC ratio in relation to its expected value, which is only 13% (represented by CV). In the second group of 3 patients with LCDD, this ratio is much higher and its amount is 52.3%. (Table 3). There was no significant difference between the 2 groups (kappa or lambda ≤ 300 mg/L; kappa or lambda > 300 mg/L) regarding blood β_2 -microglobulin concentration (Tables 3).

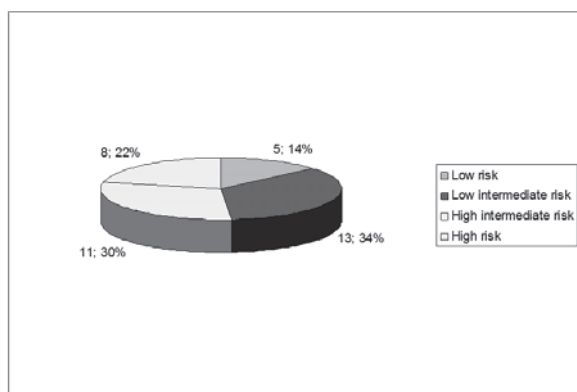


Fig. 3. FLC κ -type and relative risk of progressive disease in 37 patients with multiple myeloma

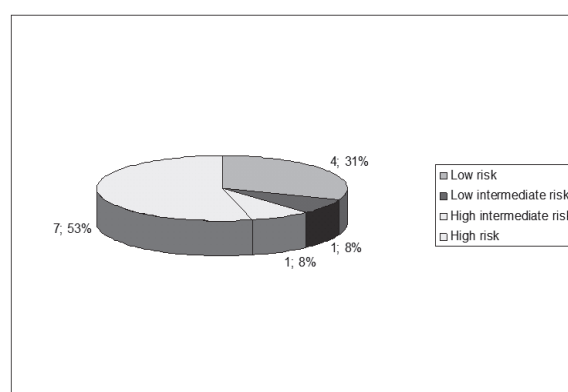


Fig. 4. FLC λ -type and relative risk of progressive disease in 13 patients with multiple myeloma

Table 2. The risk factors and survival in 50 patients with MM according to ISS

Class (isotype) of Ig (No=number of examinees)	FLC ratio	S β 2M (g/L)	Serum albumin (g/L)	ISS – median survival	The relative risk of disease progression
IgG κ (n=5) IgA λ (n=2) IgM λ (n=2)	0.26-1.65 9/50 (18%)	<3.5	≥ 35	(0 risk factors ~ 51 month)	Low risk
IgG κ (n=6) IgA κ (n=7) IgM λ (n=1)	< 0.26 ili > 1.65 14/50 (28%)	<3.5	≥ 35	(1 risk factors ~ 39 month)	Low intermediate risk
IgG κ (n=4) IgA κ (n=3) IgM κ (n=4) BG (n=1)	< 0.125 ili > 8 12/50 (24%)	$\geq 3.5-5$	≥ 35	(2 risk factors ~ 30 month)	High intermediate risk
IgG κ (n=8) IgA λ (n=3) IgM κ (n=4)	≤ 0.03 ili ≥ 32 15/50 (30%)	≥ 5	< 35	(3 risk factors ~ 22 month)	High risk

Abbreviations: ISS - international staging system; MM - multiple myeloma; BG - biclonal gammopathy; Ig - immunoglobulin; FLC - free light chain; FLC ratio - κ/λ ratio; S β 2M - serum β_2 -microglobulin

Table 3. The expected value of FLC ratio of M, SD and CV

FLC ratio	EV		CV
	M	SD	
WM (M-IgM) group	27.1	3.53	13%
LCDD group	15.58	8.15	52.30%

Abbreviations: FLC ratio - κ/λ ratio; WM - Waldenström's macroglobulinemia; M-IgM - monoclonal IgM; LCDD - light chain deposition disease; EV - expected value; M - medium values; SD - standard deviations; CV - coefficient of variation

DISCUSSION

In our study, at the time they were diagnosed, 21/21 (100%) patients with WM (M-IgM) had abnormal concentrations of FLCs, of κ -type and/or λ -type (Figure 1). Their short serum t $\frac{1}{2}$ provided them a role of sensitive markers for therapy response. The purpose of checking of these values was to set a diagnosis as early as possible, as with any malignant disease. It was very important for us to establish the importance of ratio (FLC ratio), as a prognostic factor for remission, progression and survival in groups of examinees. According to International Staging System (ISS), the values of FLC ratio in starting diagnosis were taken as an important indicator of MM prognosis. In that, abnormal FLC ratio (< 0.03 or > 32), high serum β_2 -microglobulin (≥ 3.5 g/L) or low serum albumin (< 35 g/L), were defined as adverse risk factors. Patients with any combination of 0, 1, 2 or 3 adverse risk factors, according to the above mentioned criteria, had significantly different FLC ratios of overall survival time, with median survival time of: 51, 39, 30 and 22 months ($p < 0.001$) [10]. Median survival times of patients with 3 risk factors was less than a half than the times of patients with 0 factors [median: 51 months with 0 factors, 39 months with 1 factor ($p = 0.13$), 30 months with 2 factors ($p = 0.001$) and 22 months with 3 factors ($p < 0.001$)] [10]. According to Bradwell et al. [11] the values of FCL ratio are not significant indicators of the change of the disease course in relation to the basic Ig molecule isotype in the group with MM, so their repeated laboratory determination is not indicated. It was noticed that sometimes the patients with MM can abruptly develop heavy and irreversible kidney damage. All this indicates that high concentrations of FLCs are toxic for kidneys.

Macroglobulinemia is a plasma cell cancer in which a single clone of plasma cells produces excessive amounts of a certain type of large antibody (IgM) called macroglobulins, which accumulate in the blood. Symptoms and signs of disease were conditioned by a high concentration of IgM [12]. As this is a rare disease, this is a large number of patients for our population, but this is also a possibility to consider some characteristics and examine the influence to the course and prognosis of the disease. According to IPI criteria [10], our results showed that 17 (80.9%) patients with high or medium abnormal FLC ratio and

the combination of adverse risk factors had median survival times of about 22-30 months, as opposed to 4 (19.1%) patients with normal or slightly changed FLC ratio, without adverse risk factors, with median survival time of about 39-51 months. In the group of patients with WM (M-IgM), our results showed that 7 (33.4%) patients with high abnormal values of FLC ratio (< 0.03 or > 32), shorter median survival time and poor prognosis. This supports the finding that in patients with WM there are numerous unfavourable conditions for clinical course of disease. Paraproteins, with the characteristics they have in WM, have the greatest adverse effects to blood vessels, i.e. to cardiovascular (CV) system. Damages of CV are the commonest terminal causes of lethal outcome in most of the patients with malignant diseases. When we take into account that this is a disease most commonly found in older people (sixth and seventh decade of life), this makes the risk even greater [12]. This is an interesting disease because malignant cell does significantly less direct damage to the organism, and the dominant damage is conditioned with disposal of M-IgM into certain organs and tissues [12]. We find that it is important to emphasize important ability of certain Ig molecules to link with each other and make bigger molecules, to polymerize. In WM, its M-IgM, that consists of 5 monomer molecules of Ig, is in the form of pentameric molecule ($M_m=900$ kD). In related MG, MM tendency of Ig molecules to polymerize is less distinct and it characterizes only one class of Ig molecules, IgA. In IgA myeloma, two Ig molecules are joined into dimeric molecules. This characteristic brings this type of myeloma close to WM, so that certain behaviours of the disease can be parallelly observed and compared. In other myeloma and other MG, Ig molecules are mostly monomer molecules [12]. In LCDD, monoclonal serum FLCs are precipitated on the basement membranes of cells in the kidneys and other organs. As with AL amyloidosis, the disease is progressive and leads to organ failure of the kidneys, heart or liver and has a poor prognosis [13]. This rare disease differs from AL amyloidosis by being more frequent in younger women (aged 30-50 years), and renal failure is a common presenting feature. The deposits usually contain κ FLCs (Vk1 and Vk4) without amyloid P component. Some of the patients have serum and urine monoclonal proteins detectable by electrophoretic (EF) tests. It is important

to note that patients with chronic kidney disease due to deposition of monoclonal FLCs are difficult to identify and monitor [14, 5]. It is likely that many patients have detectable monoclonal FLCs in serum but are undiagnosed from urine studies. In our research, at the time they were diagnosed, 3/3 (100%) patients had abnormal concentrations of FLCs, of κ -type and/or λ -type. In 2 patients, clones of plasma cells synthesized monoclonal FLC of λ -type (Table 1). All this indicates that there is a difference in the type of monoclonal FLCs in comparison with the data that other authors present [15]. We should look for the reason of this result in the small number of patients and the fact that this is a rare disease with the frequency of 1-5% within MG. Patients with of FLC ratio > 150 mg/L are of high RR from disease progression and they have poor prognosis (Figure 2). The results that we obtained show that 2/3 (66.7%) of patients had high abnormal values of FLC ratio (< 0.03 or > 32), with the presence of other risk factors too (deposition of L chains, high serum β_2 -microglobulin and low serum albumin). They had high RR of disease progression, and thus poor prognosis. In 1 of 3 (33.3%) patients, the values of FLC ratios were within reference interval (0.26-1.65). He had low RR from disease progression, and thus good prognosis (Table 1). And it is a fact that there are few studies on clinical importance of increased concentrations of FLCs in these patients. Also, patients with chronic kidney disease, due to the sedimentation of monoclonal concentrations of FLCs, are hard to diagnose and monitor [16]. Determination of FLC ratios is important for early diagnosis, monitoring of disease progress and recognition of all those cases that were not recognised with previous laboratory tests [17]. These results are very close to our findings. According to the previously mentioned ISS criteria [10], our results showed that 54% of myeloma patients with high or intermediate abnormal FLC ratio and a combination of adverse risk factors had median survival time of approximately 22-30 months, as opposed to 46% patients with normal or slightly changed FLC ratio, without adverse risk factors, with median survival of about 39-51 months (Table 2). Similar to what other authors determined [10], 15 (30%) patients had highly abnormal values of FLC ratio (< 0.03 or > 32), shorter median survival and poorer prognosis. These patients suffered from an aggressive type of MM that demands a more aggressive chemotherapeutic approach, by applying high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation (SCT). During our study, 7/50 (14%) patients died during or after therapy. They had poor response to therapy, highly abnormal values of FLC ratio (< 0.03 or > 32) and median survival time of about 22 months. MM can exist for years without visible signs of disease. As a rule, the symptoms appear only after the disease has existed for many years. Our results showed that 12 (24%) patients had

intermediate abnormal values of FLC ratio (< 0.125 or > 8) (Table 2). Viewed from the clinical and laboratory aspect, we found that it is extremely important to constantly and carefully monitor these patients to discover the transition to symptomatic disease early [18]. The most common complications include renal insufficiency, hypercalcemia, anemia and recurrent infections. The spectrum of MM neurological complications is diverse, however, involvement of MM in the cerebrospinal fluid (CSF) and leptomeningeal infiltration are rare considered. In about 1% of the cases, the disease affects the central nervous system (CNS) and presents itself in the form of localized intraparenchymal lesions, solitary cerebral plasmocytoma or CNS myelomatosis (LMM) [19]. Viewed from clinical and laboratory aspect, by applying adequate therapy that largely extends the duration of disease remission, as well as by "routine", repeated determination of FLC, disease prognosis would be improved. Until the '90s, tests for measuring of serum monoclonal Ig included EF, immunoelectrophoresis (IEF), immunofixation electrophoresis (IFE) and nephelometric determination of serum Ig HC. For most of the patients with MGUS and MM (WM), those quantifications proved to be sufficient. Nevertheless, for most of the patients with AL amyloidosis and for more than 3% of the patients with nonsecretory or oligosecretory myeloma, these tests proved to be insufficient [20]. During the monitoring, the examinees were submitted to some of therapeutic protocols for MM: MP protocol (melphalan/prednisone) or MPT protocol (melphalan/prednisone/thalidomide) for patients older than 65 years or younger than 65 years, but those were not candidates for autologous stem-cell transplantation (SCT). VAD protocol (vincristine/adriamycin/dexamethasone) and CTD protocol (cyclophosphamide/thalidomide/dexamethasone) were applied in patients younger than 65 years, who were candidates for autologous SCT. Interferon and thalidomide were used as maintenance therapy after autologous SCT, in the last five (2007-11) years. From the group of patients with WM and MM, approximately 31% of the patients who –during therapy– showed decrease of FLC ratio $> 50\%$ achieved disease remission. The time of achievement of remission and the length of its duration determined the overall survival time [21]. By quantification of concentrations of FLCs we obtained much more realistic results for patients with WM (M-IgM), LCDD and MM [22].

The first group of 21 patients with WM (M-IgM) characterized by significantly less mean values deviation of FLC ratio in relation to its expected value, which is only 13% (represented by CV). In the second group of 3 patients with LCDD, this ratio is much higher and amounts to 52.3%. (Table 2). The cut-off value for κ and λ chains (≤ 300 to > 300 mg/L) in newly diagnosed MM patients is of minimal utility for the precise evaluation of high-risk population due to its low sensitivity

and specificity (Tables 3). In conclusion, in our study we have confirmed that the existence of a significantly abnormal FLC ratio in the examined groups represents an independent risk factor for disease progres-

sion and thus for poorer prognosis. The reduction of FLC ratio and monoclonal Ig to normal values, under the influence of applied therapy indicates good response of patients and adequate choice of therapy.

Table 4. Serum free light chains characteristics at cut-off value in newly diagnosed multiple myeloma patients

Parameters	Test	Risk assessment		SN (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)
		High	Low				
kappa or lambda (mg/L)	> 300	(TP) 8	(FP) 5	28.0	70.0	55.0	43.0
	≤ 300	(FN) 21	(TN) 16				
Total (n)		29	21				

Abbreviations: TP: true-positive, FP: false-positive, FN: false-negative, TN: true-negative, Sn: sensitivity, Sp: specificity, PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value, Low risk: risk index 0 and 1, High risk: risk index 2 and 3

ACKNOWLEDGEMENTS/DISCLOSURES

Competing interests: none declared.

List of used abbreviations:

Ig - immunoglobulin
 LC - light chain
 HC - heavy chain
 k - kappa
 λ - lambda
 WM - Waldenström's macroglobulinemia
 M-IgM - monoclonal IgM
 M-Ig - monoclonal immunoglobulin
 AL amyloidosis - primary amyloidosis
 MGUS - monoclonal gammopathy of undetermined significance
 MM - multiple myeloma
 LCDD - light chain deposition disease
 LHCD - light heavy chain deposition disease
 HCDD - heavy chain deposition disease
 FLCs - serum free light chain
 FLC ratio - k/λ ratio
 MG - monoclonal gammopathy
 BG - biclonal gammopathy
 EV - expected value
 M - medium values
 SD - standard deviations
 CV - coefficient of variation
 Sn - sensitivity
 Sp - specificity
 PPV - positive predictive value
 NPV - negative predictive value
 TP - true-positive
 FP - false-positive
 FN - false-negative
 TN - true-negative
 ISS - International Staging System
 MP protocol - melphalan/prednisone
 MPT protocol - melphalan/prednisone/thalidomide

CTD protocol - cyclophosphamide/thalidomide/dexamethasone
 VAD protocol - vincristine/adriamycin/dexamethasone
 SCT - stem-cell transplantation
 RR - relative risk
 Sβ2M - serum β2 microglobulin
 CV - cardiovascular
 kD - kilodalton
 EF - electrophoresis
 IEF - immuno-electrophoresis
 IFE - immunofixation electrophoresis

REFERENCES

1. Z. Mijušković, V. Radović, J. Pejović, Lj. Tukić, S. Marjanović et al. Free light chains of immunoglobulin as a prognostic factor of some plasmaproliferative diseases. *Journal of Medical Biochemistry* 2011; 30 (4):1 – 5.
2. Proceedings of the 2nd International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. Athens, Greece, September 2002. *Sem IN Onc* 2003; 30:107-335.
3. Nasr SH, Valeri AM, Cornell LD, Fidler ME, Sethi S et al. Renal Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease: A Report of 64 Patients from a Single Institution. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 7(2):231-9.
4. Paueksakon P, Revelo MP, Horn RG, Shappell S, Fogo AB. Monoclonal gammopathy: significance and possible causality in renal disease. *American Journal of Kidney Diseases*. 2003; 42:87 – 95.
5. Pozzi C, D'Amico M, Fogazzi GB et al. Light chain deposition disease with renal involvement: clinical characteristics and prognostic factors. *American Journal of Kidney Diseases*. 2003; 42:1154 – 1163.
6. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351:1860-1873.
7. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M et al. SEER cancer statistics review, 1975-2007. Bethesda, MD: National Cancer Institute.
8. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al. International Mye-

- loma Working Group guidelines for serum free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009; 23:215 – 224.
9. Vesna V. Radović. Recommendations for use of free light chain assay in monoclonal gammopathies. *Journal of Medical Biochemistry* 2010; 29 (1):1 – 8.
 10. Snozek CL, Katzmman JA, Kyle RA et al. Prognostic value of the serum free light chain ratio in patients with newly diagnosed myeloma and proposed incorporation into the International Staging System. *Leukemia*. 2008; 22(10):1933 – 1937.
 11. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003; 361:489 – 491.
 12. Rafajlovski S, Orozović V: The incidence of hyperviscosity syndrome and consecutive cardiac and neurological complications in patients with Waldenström's macroglobulinemia and multiple myeloma (IgA). *News from neurology, psychiatry and related fields*, XIII, No. 3 – 4, 2005.
 13. Solomon A, Weiss DT, Herrera GA. Light-chain deposition disease. In: Mehta J, Singhal S, eds. *Myeloma*, Informa Healthcare, 2002:507 – 18.
 14. Sanders PW, Herrera GA, Kirk KA, Old CW, Galla JH. Spectrum of glomerular and tubulointerstitial renal lesions associated with monotypic immunoglobulin light chain deposition. *Lab Invest* 1991; 64:527 – 37.
 15. Suzuki K. Light- and heavy-chain deposition disease (LH-CDD): difficulty in diagnosis and treatment. *Intern Med*. 2005; 44:915-6.
 16. Buxbaum J, Gallo G. Nonamyloidotic monoclonal immunoglobulin deposition disease. Light-chain, heavy-chain, and light- and heavy-chain deposition diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13:1235 – 48.
 17. Fernandez de Larrera C, Cibeira MT, Elena M et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood* 2009; 114(24):4954-4956.
 18. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2582-2590.
 19. Marjanović S., Mađaru L., Ralić T., Mijušković Z., Trimčev J, Radović V. Multiple myeloma invasion of the central nervous. *Vojnosanitetski Pregled* 2012; 69. (2): 209-213.
 20. Vesna V. Radović. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and monoclonal free light chains of immunoglobulins. *Arhiv za farmaciju* 2010; 3:285 – 296.
 21. Child JA, Morgan GJ, Davies FE et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:1875 – 1883.
 22. Katzmman JA, Abraham RS, Dispenzieri A, Lust JA, Kyle RA. Diagnostic Performance of Quantitative {kappa} and {lambda} Free Light Chain Assays in Clinical Practice. *Clin Chem* 2005; 51:878 – 881.

Адрес за кореспонденција:

Vesna V. Radovic
STADA Hemofarm A.D
Research and Development
11000 Belgrade; Serbia
Tel: +381 63 734 44 30
Fax: +381 11 381 12 90
e-mail: veradovic@beotel.rs

ТЕРАПЕВТИЧЕН ОТГОВОР И ПРЕЖИВЯЕМОСТ ПРИ ПАЦИЕНТИ С МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ, ЛЕКУВАНИ С BORTEZOMIB - СЪДЪРЖАЩИ РЕЖИМИ

В. Горанова-Маринова¹, А. Недева², Т. Денева³, П. Георгиев¹, И. Христова¹,
Ю. Райнов² и Ст. Горанов¹

¹ Клиника по клинична хематология, МУ-Пловдив, УМБАЛ "Св.Георги", гр. Пловдив

² Клиника по хематология и онкология, ВМА, гр. София

³ Централна клинична лаборатория, МУ-Пловдив, УМБАЛ „Св.Георги“

THERAPEUTIC RESPONSE AND SURVIVAL IN PATIENTS, TREATED WITH BORTEZOMIB - BASED REGIMENS

V. Goranova-Marinova¹, A. Nedeva², T. Deneva³, P. Georgiev¹, I. Hristova¹,
J. Raynov² and S. Goranov¹

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

² Clinic of Clinical Hematology and Oncology, Military Medical Academy,

³ Central Clinical Laboratory, University Hospital "St.George", Plovdiv

Резюме. ЦЕЛ: Да се проучи честотата и характеристиката на терапевтичния отговор и преживяемостта при две групи пациенти с мултиплен миелом, лекувани с Bortezomib - съдържащи режими и конвенционална химиотерапия. **ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ:** За периода 2007-2011г. са анализирани 111 болни с ММ, лекувани с Bortezomib - съдържащи режими в две университетски клиники по хематология – УМБАЛ "Св. Георги", гр Пловдив и ВМА, гр София. За контролна група са анализирани 425 пациенти, лекувани с конвенционална химиотерапия. Терапевтичният отговор е оценен по съвременните EBMT критерии. Анализирани са честотата, качеството и продължителността на терапевтичния отговор; преживяемост без прогресия (PFS) и медиана на преживяемост (MS), факторите предопределящи терапевтичния отговор към Bortezomib. **РЕЗУЛТАТИ:** Общият терапевтичен отговор при двете групи е с 86 (78.2%) vs 295 (69.5%), в полза на лекуваните с Bortezomib – съдържащи режими (NS). Разликата е статистически значима при оценка на качеството на терапевтичния отговор. В ретроспективната група достоверно най-чест е частичния отговор – 57.2 % vs 36.9% ($p < 0.05$), а пълният е инцидентен - само 3.1%. При лекуваните с Bortezomib, CP+VGPR е 9 пъти по-чест 28.8% ($p < 0.01$). При болните постигнали терапевтичен отговор, MS е 52 мес спрямо 28 мес. ($P = 0.003$). При пациентите с CR (20.7%) и тези, понесли автоложна стволовоклетъчна трансплантация, MS не е достигната към момента на анализа. В многофакторния анализ качеството на терапевтичния отговор е единствения независим прогностичен фактор при пациенти, лекувани с Bortezomib. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Първият протеазомен инхибитор превърна класическите режими в исторически, като скъси времето за постигане на ремисия и доведе до честота и качество на терапевтичен отговор, непознати досега в клиничната хематология; изравни шансовете на високорисковите пациенти до тези със стандартен риск и промени цялостната терапевтична стратегия при болни с ММ.

Ключови думи: мултиплен миелом, Bortezomib, терапевтичен отговор, преживяемост

Summary: AIM: To analyze the frequency and characteristics of the therapeutical response and the median survival in two groups of patients with multiple myeloma (MM), treated with Bortezomib- containing regimens and conventional chemotherapy. **PATIENTS AND METHODS:** For the period 2007-2011, we analyzed 111 patients with MM, treated with Bortezomib – containing regimens in two university clinics of hematology- University Hospital "Sv.Georgi", Plovdiv and Military Medical Academy, Sofia. 425 patients treated with conventional chemotherapy were used for controls. Therapeutic response was assessed by the EBMT criteria. The response rate, quality and duration of the response were analyzed as well as the progression free survival (PFS) the median survival (MS) and the factors influencing the response to Bortezomib. **RESULTS:** The overall response rate was 86 (78.2%) for the Bortezomib group vs 295 (69.5%) for the conventional group (NS). The difference is statistically significant when assessing the quality of the response. In the retrospective group most frequent is the partial response 57.2 % vs 36.9% ($p < 0.05$), while the complete response is anecdotal 3.1%. In the Bortezomib group CP+VGPR is 9 times more frequent 28.8% ($p < 0.01$). The MS of the patients with a therapeutical response is 52 mo vs 28 mo. ($P = 0.003$). In the patients with CR (20.7%) and these, undergone autologous stem cell transplantation the MS is not reached to the time of the analysis. In the multifactor analysis the only independent prognostic factor for patients with MM on Bortezomib therapy is the quality of the therapeutical response. **CONCLUSION:** The first proteasome inhibitor turned the classical regimens into historical,

reducing the time to therapeutical response and resulting in a response rate and quality of response unseen by far in the clinical hematology. It balanced the chances of the standard and high-risk patients and changed completely the therapeutic concept in patients with MM.

Key words: Multiple myeloma, Bortezomib, therapeutic response, survival

Въведение

В последните години в лечението на мултипле-ния миелом (ММ) се въведоха нови лекарстве-ни продукти с уникален механизъм на действие - протеазомните инхибитори Bortezomib, Carfil-zomib и имуномодулаторите Thalidomide и Lenal-idomide. Чрез тях се постига непозната досега честота на качествен терапевтичен отговор, който промени значимо прогнозата и преживяемостта на болните. Понастоящем лечението с Bortezomib (Velcade®) е в основата на всички съвременни терапевтични подходи: при новодиагностицира-ни млади и възрастни пациенти, при подходящи за стоволово-клетъчна трансплантация (СКТ), при резистентност или прогрес на заболяването, при високорискови възрастни групи с неблагоприятни цитогенетични нарушения, бъбречна недостатъч-ност (БН) или изразена костна болест.

Цел

Да се проучи честотата и характеристиката на те-рапевтичния отговор и преживяемостта при две

групи пациенти с мултиплен миелом, лекувани с Bortezomib-съдържащи режими и конвенционал-на химиотерапия.

Пациенти и методи

За периода 2007-2011г са анализирани 111 болни с ММ, лекувани с Bortezomib - съдържащи режими в две университетски клиники по хематология – УМБАЛ "Св. Георги", гр Пловдив и ВМА, гр София. За контролна група са използвани 425 пациенти от базата данни на клиниката по хематология – гр. Пловдив, лекувани с конвенционална химио-терапия. Всички пациенти са диагностицирани по общоприетите критерии. За сравнителна харак-теристика на двете групи е използвана класиче-ската стадийна система на Durie and Salmon (DS), както и основните показатели за заболяването и неговата активност (табл.1). Двете групи са със сходни, типични за заболяването характеристики и без статистически значими разлики при изслед-ваните показатели: средна възраст около 60 г, преобладава мъжкият пол, DS –III, IgG варианти,

Табл 1 Сравнителна характеристика на проучения контингент

Показател	Пациенти лекувани с Bortezomib режими (N = 111) Брой %	Пациенти лекувани с конвенционална химиотерапия (N=425) Брой %
Средна възраст (години)	57.8 ± 9.1	61,1 ±9,3
Пол Мъже Жени	59 (53.2) 52 (46.8)	223 (52,5) 203 (47,5)
Клиничен стадий DS – I DS – II DS - III	12 (10.8) 30 (27.2) 69 (62.0)	51(12.0) 133(31,3) 241(56.7)
IgA IgG IgD BJ Биклонален Несекретиращ	26 (23.4) 62 (55.9) - 15 (13.5) - 8 (7.2)	102 (24,0) 239 (55,1) 3 (0,7) 49 (11,5) 16 (3,8) 21 (4,9)
С БН (сг > 176 µmol/l)	33 (29.7)	161(37.9)
Костни лезии: МКБ – 0 МКБ – 1 МКБ – 2+3	32 (28.8) 56 (50.5) 23 (20.7)	72 (16,9) 101(23,7) 138(32,4)
Hb<80g/l	15 (15.3)	164 (38,6)
Албумин<30g/l	30 (27.0)	160 (37,6)
Ca >2.65 mmol/l	29 (26.1)	111 (26,1)
β2 >3.5mmol/l	54 (48.7)	151 (35,5)*
LDH>480 U/L	28 (25.2)	126 (29,6)

* $p<0,05$

а почти всеки трети е с хипоалбуминемия, хиперкалциемия, БН или повишено ниво на LDH. В контролната група, без статистически значима разлика са по-чести тежкостепенните костни промени и анемичния синдром с $Hb < 80 g/l$, а при пациентите лекувани с Bortezomib - високото над $3.5 mmol/l$ ниво на $\beta 2$ -микроглобулин ($P < 0.05$). Контролната група пациенти е лекувана с режими, съдържащи алкилиращи агенти и глюкокортикостероиди (ГКС) и VAD-базирани схеми в стандартна дозировка през 28 дневен интервал. Приложената доза Bortezomib (Velcade®) е общоприетата - $1.3 mg/m^2$ в 21 дневен цикъл като монохимиотерапия или инкорпорирана в химиотерапевтичните режими Vel/Dex CyBorDex и PAD. Терапевтичният отговор е оценен по съвременните EBMT-критерии за пълен отговор (CR), много добър частичен отговор (VGPR), частичен отговор (PR) и минимален отговор (MR)¹. Анализирани са честотата, качеството и продължителността на терапевтичния отговор; преживяемост без прогресия (PFS) и медианата на преживяемост (MS), както и факторите, предопределящи терапевтичния отговор към Bortezomib. За статистическата обработка са приложени вариационен анализ, корелационен анализ, методът "independent samples T-test" за сравняване на средни величини, методът на Kaplan-Maier с log rank test за оценка на MS и PFS. Прогностичните фактори са оценени чрез Cox регресионен анализ при уroveň на значимост $P < 0.05$ (SPSSv18.0 for Windows).

Резултати

Bortezomib (Velcade®), като първа линия терапия е приложен при 15 (13.5%) болни, като втора линия при 49 (44.2%) и като трета или повече ли-

нии - при 47 (42.34%). В групата, лекувана с Bortezomib са използвани режимите: Velcade® като монотерапия при 15 (13.5%) пациенти, VelDex при 42(37.8%), CyBorDex - при 42(37.8%) и PAD при 12 (10.9%). Средното време на наблюдение е 24 мес (1-79 мес), средното време до започване на лечение е 21.2 (0-96) мес, като се реализирани средно 7.3 ± 2.6 цикли.

1. Терапевтичен отговор при лечение с Bortezomib (Velcade®) съдържащи режими спрямо конвенционална химиотерапия. Общият терапевтичен отговор (CR+VGPR +PR+MR) при двете групи е съответно - 86 (78.2%) vs 295 (69.5%), в полза на лекуваните с Bortezomib – съдържащи режими, но без статистическа достоверност (табл. 2 и фиг. 1). Разликата е съществена и статистически значима при оценка на качеството на терапевтичния отговор. В ретроспективната група достоверно най-чест е частичния отговор – 57.2% vs 36.9% ($p < 0.05$), а пълният е инцидентен - само 3.1%. При лекуваните с Bortezomib CP+VGPR е 9 пъти по-чест - 28.8% ($P < 0.01$).

2. Преживяемост без прогресия (PFS) при лечение с Bortezomib (Velcade®) съдържащи режими. Медианата на PFS е 11 ± 1.0 мес (95% ИД 9.03-12.97). С терапевтичен отговор след лечение с Bortezomib на 12 мес са 44%, на 18 мес - 28%, на 24 мес - 22% от болните. Най-дълга е PFS при пациентите, постигнали CR – 29 ± 2.8 мес (табл.2). От всички анализирани показатели: пол, възраст, ниво на хемоглобина, тромбоцитите, албумина, $\beta 2$ -микроглобулин, серумен Ca, АФ и LDH статистически значимо влияние върху продължителността на ремисията оказва единствено качеството на терапевтичния отговор. (Табл 3)

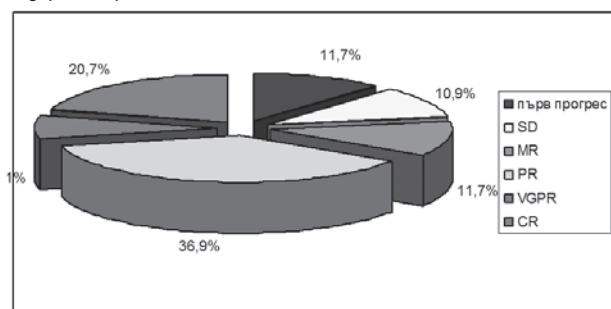
Табл.2 Терапевтичен отговор след Bortezomib –съдържащи режими и конвенционална химиотерапия при пациенти с мултиплен миелом

Терапевтичен отговор	След Bortezomib –съдържащи режими N 111 Брой %	След конвенционална химиотерапия N 425 Брой %	P
CR	23 (20.7)	13 (3.1)	< 0,01
VGPR	9 (8.1)	-	
PR	41 (36.9)	243 (57.2)	< 0,05
MR	14 (12.6)	39 (9.2)	NS
SD	11 (9.9)	56 (13.2)	NS
PD	13 (11.7)	73 (17.3)	NS

Табл 3. Медиана на продължителност на терапевтичния отговор

Вид терапевтичен отговор	Медиана (мес)	95% ИД	P
Прогресия	3 ± 0.69	1.65-4.35	<0.001
SD	9 ± 2.06	4.95-13.05	
MR	10 ± 1.1	7.68-12.14	
PR	19 ± 3.3	12.56-25.44	
VGPR	19 ± 7.3	4.6-33.4	
CR	29 ± 2.8	23.45-34.54	

Фиг 1. Терапевтичен отговор след лечение с Bortezomib - съдържащи режими



CR - пълен отговор ; VGPR – много добър частичен отговор;
PR- частичен отговор
MR – минимален отговор; SD – без промяна; PD - прогресия

3. Преживяемост след лечение с Bortezomib - съдържащи режими.

Общата преживяемост (OS) на 1г е 87%, на 2 г - 60%, на 3 г - 53% (време за наблюдение 1-79 мес). При болните, постигнали терапевтичен отговор, MS е 52 мес спрямо 28 мес за тези без терапевтичен отговор ($P=0.003$). При пациентите с CR (20.7%) и тези, понесли автоложна стволовоклетъчна трансплантация и с постигнати CR и VGPR (17%), MS не е достигната към момента на анализа.

4. Прогностични фактори за преживяемостта

на пациенти, лекувани с Bortezomib - съдържащи режими.

Не се установява достоверна разлика в MS на болните в зависимост от пола и възрастта, нивото на хемоглобина, тромбоцитите, албумина, β_2 -микроглобулин, серумен Ca, AP и LDH. В еднофакторния анализ качеството на терапевтичния отговор ($p=0.0017$), клиничния стадий ($p=0.001$) и БН ($p=0.007$) имат достоверно прогностично значение (табл. 4 фиг 2, 3).

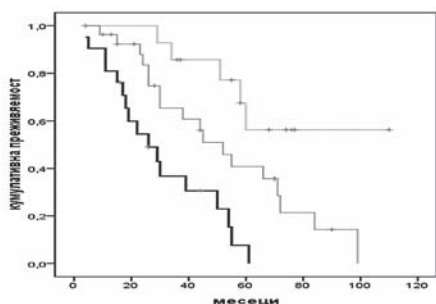
Показателите, които повлияват статистически значимо MS в еднофакторния анализ, бяха включени в многофакторен Cox – регресионен анализ. Качеството на терапевтичния отговор е единственият показател, който запазва значението си и представлява независим прогностичен фактор за преживяемостта на пациенти, лекувани с Bortezomib (табл.5)

8. Нежелани лекарствени реакции и редукция на дозата.

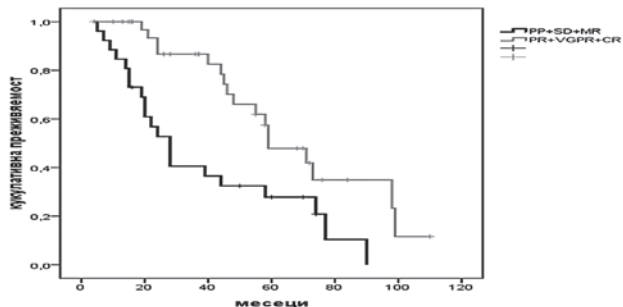
Най-честите хематологични усложнения, свързани с приложението на Bortezomib са тромбоцитопенията - 30,6%, а сред нехематологичната токсичност – полиневропатията - 45,9% (фиг. 5). Редукцията на дозата до 1.0 mg/m² е била необходима при 24,3% от пациентите, а до 0.7 mg/m² - при 7 (6,3%)

Табл 4. Прогностични фактори за преживяемостта при лечение с Bortezomib – еднофакторен анализ

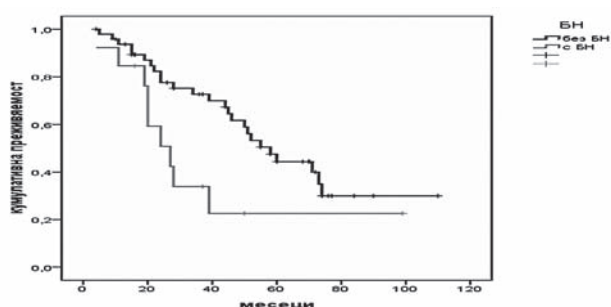
ПОКАЗАТЕЛ	MS (мес)	95% ИД	P
Терапевтичен отговор			
Прогресия	20±7.5	5.3-34.7	0.0017
SD	20±0.82	18.4-21.6	
MR	39±11.4	16.6-61.4	
PR	55±8.9	37.6-72.4	
VGPR	58±8.2	42.0-74.0	
CR	-	-	
Клиничен стадий			
ISS-I	-		P<0.001
ISS-II	52±7.77	36.8-67.2	
ISS-III	26±6.7	12.8-39.18	
Без БН	58±12.2	34.0-82.0	P=0.007
С БН	28±6.5	9.3-46.7	



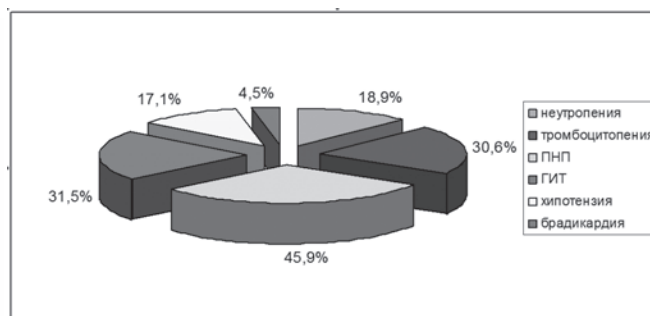
Фиг 2. MS в зависимост от клиничния стадий



Фиг 3. MS в зависимост от терапевтичния отговор



Фиг 4. MS в зависимост от БН



Фиг 5. Хематологична и нехематологична токсичност при лечение с Velcade® - свързващи режими

Табл 5. Прогностични фактори – многофакторен анализ

ПОКАЗАТЕЛ	B	SE	Exp B	P
Бъбречна недостатъчност	-0.372	0.451	0.690	0.41 (NS)
Клиничен стадий по ISS	-0.180	0.102	0.836	0.07 (NS)
Терапевтичен отговор	1.117	0.304	3.054	<0.001

Обсъждане

Bortezomib е първият протеазомен инхибитор с уникален механизъм на действие, който не само атакува директно миеломните клетки, но и изключително важните взаимоотношения между малигнената клетъчна линия и костномозъчната микро-среда. Един от основните механизми на действие на Bortezomib, свързан с неговия противотуморен ефект е активирането на NOXA – проапоптозен протеин, който на свой ред взаимодейства със субфамилията Bcl-X_L и Bcl-2 и индуцират клетъчната смърт. Друг паралелен важен механизъм на действие е потискането на свръхекспресията на NF-κB в бързо делящите се клетки с последващо инактивиране на антиапоптозните гени^{2,3}

Bortezomib не само промени двете основни характеристики на терапевтичния отговор при MM – честотата като цяло и неговото качество, но и преодолява негативния ефект на прогностично неблагоприятните рискови фактори. По данни на кооперативна група IFM режимът VelDex в сравнение с VAD показва достоверно по-добри резултати по отношение на CR- 14.8% v 6.4%; VGPR - 37.7% v 15.1% и PFS - 36.0 мес vs 29.7 мес (P = 0.064)⁴. В същото проучване, както и в резултатите на Avet-Louiseau и съавт, Bortezomib - режимите са еднакво ефективни и показват независимост на терапевтичния отговор от клиничния стадий (ISS), възрастта над/под 65г или наличието на неблагоприятните цитогенетични нарушения - t (4;14) и del13q (с изключение на

del17p)⁵. Интенифициране на схемите с добавяне на имуномодулатори е друга атрактивна съвременна опция. Режимът Bortezomib + Thalidomide + Dexamethason в италианското проучване на GIMEMMA също показва по – добри резултати: CR/CRn 31% vs 11%, PFS (2г) - 82% vs 73%, както и по-добри пострасплатационни резултати в сравнение с рамото Thalidomide + Dexamethazone⁶. Подобни са данните за комбинацията Bortezomib + Cyclophosphamide + Dexamethazone на Reeder и съавт. и на немската група за MM – DSMM с терапевтичен отговор 77% и CR 10 %, а проучването EVOLUTION, на клиниката Mayo съобщава за CR 47% с режим VDCmod и 100% EFS на 1г^{7,8,9}

Тези данни показват, че Bortezomib е не само показан за приложение във всички фази от еволюцията на процеса, но проявява синергизъм и активност в комбинация с ГКС, конвенционални цитостатици и имуномодулаторите Thalidomide и Lenalidomide по отношение на всички показатели, оценяващи качеството на терапевтичния отговор и преживяемостта на пациентите. Нашите данни са аналогични с резултатите в литературата. Анализирахме резултати от основните режими с Bortezomib, тествани в различни проучвания: като монотерапия (13.0%), в комбинация с Dexamethasone (37.8%), с Cyclophosphamide + Dexamethasone (37.8%) и с Doxorubicin + Dexamethasone (10.8%). Пациентите в групите на отделните режими са сравнително малко за рандомизация и

недостатъчни за самостоятелен анализ. Поради това сравняваме общия терапевтичен ефект на инкорпорирания в стандартни схеми Bortezomib. За контрола използвахме средния терапевтичен отговор от класическите конвенционални режими Melphalan или Cyclophosphamide + ГКС и VAD и VAD – подобни комбинации в историческа група от 425 пациенти. По този начин добре проличава неговия ефект в анализираните групи. Получените резултати са в съответствие с литературните данни от последните години и данните от първите, класическите проучвания за Bortezomib - CREST, SUMMIT, VISTA и APEX¹⁰⁻¹³. MS на лекуваните с Bortezomib е значимо по-висока в сравнение с предишни наши ретроспективни анализи. Установихме, че възрастта, множествените костни лезии и бъбречната недостатъчност не оказват достоверно влияние върху MS. В многофакторния анализ намерихме, че единствен самостоятелен прогностичен фактор е качеството на терапевтичния отговор. В анализ на прогностичните фактори при лечение с Bortezomib, Moreau P et al за IFM установяват, че напредалият клиничен стадий ISS-II и III, и постигането на по-малко от VGPR са прогностично неблагоприятни фактори за EFS, а в групата с неблагоприятни цитогенетични нарушения единствения независим прогностичен фактор е вида на терапевтичния отговор¹⁴.

Заклучение

Първият проеазомин инхибитор превърна класическите режими в исторически, като скъси времето за постигане на ремисия и доведе до честота и качество на терапевтичен отговор, непознати досега в клиничната хематология. Нещо повече, терапевтичният отговор се доближава или е аналогичен на посттрансплантационните резултати. Появиха се нови лечебни схеми с инкорпорирани на имуномодулаторите Thalidomide и Lenalidomide, интензивни протоколи по типа „triple therapy“, водещи при някои пациенти до още по-добри резултати. Bortezomib съдържащите режими, не само изравниха шансовете на високорисковите пациенти до тези със стандартен риск, но и промениха цялостната терапевтична стратегия. Качественият терапевтичен отговор вече не е единствената и основна цел на лечението, а неговата консолидация с трансплантационни програми. Подобен подход е засега единствената възможност за подобряване прогнозата и преживяемостта на пациентите с MM.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Blade J, Samson D, Reece D et al. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and hematopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow transplantation. *Br J Haematol* 1998; 102:1115-23
2. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61(7):3071-6
3. Qin JZ, Ziffra J, Stennett L, et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 2005; 65(14):6282-93.
4. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial *J Clin Oncol*. 2010;28(30):4621-9
5. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14)myeloma but not outcome of patients with del(17p) *J Clin Oncol* 2010; 28(30):4630-4
6. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F et al. GIMEMA Italian Myeloma Network. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet*. 2010;376(9758):2075-85.
7. Reeder CB, Reece DE, Kukreti V et al. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia* 2009 23(7):1337-41
8. Kropff M, Liebisch P, Knop S et al. DSMM XI study: dose definition for intravenous cyclophosphamide in combination with bortezomib/dexamethasone for remission induction in patients with newly diagnosed myeloma *Ann Hematol* 2009 88(11):1125-30.
9. Kumar S, Flinn I, Richardson PG, et al. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood*. 2012;119(19):4375-82.
10. Harousseau JL, Palumbo A, Richardson PG et al. Superior outcomes associated with complete response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone. *Blood*. 2010;116(19) : 3743-50
11. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J et al. Extended follow-up of a phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma: final time-to-event results from the SUMMIT trial. *Cancer*. 2006;106(6):1316-9
12. Jagannath S, Barlogie B, Berenson JR et al. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the

phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma Br J Haematol. 2008;143(4):537-40.

13. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster Met al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. Blood. 2007 15;110(10):3557-60
14. Moreau P, Attal M, Pégourié B, at al. Achievement of VGPR to induction therapy is an important prognostic factor for longer PFS in the IFM 2005-01 trial. Blood 2011; 117(11):3041-4.

Адрес за кореспонденция:

Веселина Горанова-Маринова
Клиника по клинична хематология
УМБАЛ „Св. Георги“, МУ- Пловдив
Бул ” Васил Априлов” 15А
Гр Пловдив 4002
Тел: 032 602 298
e-mail: vesselina_goranova@yahoo.com

ВЛИЯНИЕ НА KIR И HLA КЛАС I ЛИГАНДНИЯ ГЕНЕН ПОЛИМОРФИЗЪМ НА ДОНОРА И РЕЦИПИЕНТА ЗА ИЗХОДА ОТ АЛОГЕННА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

В. Върбанова¹, Г. Михайлов¹, А. Георгиева², Цв. Луканов², Н. Стоянов¹, П. Ганева¹, Г. Арnaudov¹, С. Тошков¹, Е. Наумова² и А. Михайлова²

¹ Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания (НСБАЛХЗ), София

² Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ „Александровска“ - София

INFLUENCE OF DONOR AND RECIPIENT KIR AND HLA CLASS I LIGAND GENE POLYMORPHISM ON ALLOGENETIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION OUTCOME

V. Varbanova¹, G. Mihaylov¹, A. Georgieva², Ts. Lukanov², N. Stojanov¹, P. Ganeva¹, G. Arnaudov¹, S. Toshkov¹, E. Naumova² and A. Mihaylova²

¹ National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

² Department of Clinical Immunology, University Hospital “Alexandrovskia”, Sofia, Bulgaria

Резюме. През последните години изследванията върху Killer Ig-like receptors (KIR) и техните специфични HLA лиганди от главния комплекс на тъканна съвместимост все повече са насочени върху двойки за алогенна трансплантация на стволови клетки (ало-СКТ). В настоящето проучване беше изследван HLA и KIR генотипа на 20 двойки за ало-СКТ, за да се проучи наличието на асоциативна връзка между NK-клетъчния генотип на донора/реципиента и изхода от приложената трансплантационна процедура. Допълнителен инхибиторен KIR в донора и носителство на HLA-A^{Bw4} лиганд от реципиента бяха намерени като независими рискови фактори за възникването на посттрансплантационни инфекциозни усложнения ($p=0.049$; $HR=0.2$ и $p=0.013$, $HR=0.2$ съответно). Наличието на “missing KIR” лиганд констелация в двойката за ало-СКТ сигнификантно намалява риска от рецидив ($p=0.021$, $HR=10.3$) и подобрява продължителността на свободната от болест преживяемост (disease free survival, DFS) (log rank $p=0.04$). Допълнително донор с активиращи KIR гени, различни от тези на реципиента е негативно асоцииран с CMV инфекция ($p=0.028$; $HR=0.2$) и DFS (log rank $p=0.016$). Изнесените данни демонстрират роля на KIR/HLA клас I лигандния генен полиморфизъм при ало-СКТ, освен в контекста на очаквания алореактивен NK-клетъчен антилевкемичен ефект (graft versus leukemia effect, GvL), но и значението му за посттрансплантационния антиинфекциозен имунен отговор и дългосрочната прогноза за тази група болни.

Ключови думи: NK клетки, килърни имуноглобулин-подобни рецептори (KIRs), HLA лиганди, алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки

Abstract. The role of killer Ig-like receptor (KIR) and their cognate human leukocyte antigen (HLA) class I ligands genes polymorphisms in donor-recipient pairs for patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (allo-SCT) has recently gained considerable interest. In the present study HLA and KIR genotypes were determined in 20 pairs from allo-SCT to assess the existence of association between donor/recipient NK cell genotypes and the transplantation outcome. We found that the presence of additional inhibitory KIR in the donor genotype and HLA-A^{Bw4} positive recipient were risk factors for posttransplantation infection complications ($p=0.049$; $HR=0.2$ and $p=0.013$, $HR=0.2$ respectively). The “missing KIR” ligand constellation significantly reduced relapse rate ($p=0.021$, $HR=10.3$) and improved disease free survival (DFS) (log rank $p=0.04$). Additionally donor possessing activating KIRs different from recipient aKIR genotype was negatively associated both with CMV infection ($p=0.028$; $HR=0.2$) and DFS (log rank $p=0.016$). These data demonstrate the role of KIR/HLA class I gene polymorphism in the setting of allo-SCT not only in the context of graft versus leukemia (GvL) effect, but also in the posttransplant immune response to infections and long-term prognosis in this group of patients.

Key words: NK cells, killer immunoglobuline-like receptors (KIRs), HLA ligands, allogeneic stem cell transplantation

Въведение

Алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки (ало-СКТ) е метод за лечение на пациенти с хематологични неоплазии, при които ефектът от приложената стандартна антитуморна терапия не е задоволителен, както и в някои случаи на солидни тумори или други немалигнени хематологични заболявания [25]. Данните на Европейската група за трансплантация на стволови клетки (The European Group of Blood and Marrow Transplantation, EBMT) посочват заболяването левкемия като най-честа индикация за провеждане на ало-СКТ (71% от всички алогенни трансплантации на стволови клетки за 2010 г.), като броят на алогенно трансплантираните за 2010 г. достига 13 345. Същевременно, с очаквания благоприятен ефект, ало-СКТ е съпътствана и със значим риск от различни компликации асоциирани с процедурата (non-relapse mortality - NRM, acute Graft versus Host Disease - aGvHD и chronic Graft versus Host Disease - cGvHD, инфекциозни усложнения, неуспех на присадката, рецидив на заболяването). Въпреки, че с най-голяма значимост за изхода от ало-СКТ и дългосрочната прогноза е степента на HLA (Human Leucocyte Antigens) клас I и клас II съвместимост между донора и реципиента, съществуват и допълнителни фактори с доказано влияние при подбора на най-подходящ донор: съвместимост по пол, възраст, CMV статус [19]. Друг фактор, асоцииран с алогرافта е потенциала на донорните NK клетки (natural killers, клетки естествени убийци) [5, 7, 12, 13].

NK клетките са описани през 1970 г. като клетъчна популация, способна да лизира туморни клетки без предварителна сенсibiliзация [16]. Днес е известно, че те са част от естествения имунен отговор и участват предимно в защитата на организма срещу вирусно инфектирани и претърпели туморна трансформация собствени клетки [22, 15, 24]. До 1986 г. се приемаше, че NK-клетъчната функция е MHC (Major Histocompatibility Complex, Главен комплекс на тъканна съвместимост) независима, но фундаменталните открития на Karre и сътр. [14] промениха това схващане и доказаха, че основен регулатор на NK-медиацията имунен отговор е специфичното взаимодействие между молекулите на две силно полиморфни генни системи: Killer immunoglobulin (Ig)-like receptors (KIRs) и HLA клас I.

KIRs са тип I интегрални протеини с имуноглобулин-подобни домени, кодирани от гени, разположени върху дългото рамо на хромозома 19 (19q13.4) [32, 33]. До момента са известни 14 KIR гени и 2 псевдогена, които се обозначават съобразно структурната характеристика на кодираните протеини [21]. В зависимост от броя на екстрацелуларни Ig-подобни домени се разделят на

2D (два) или 3D (три), а според цитоплазмената част на молекулата на L (long, дълъг) или S (short, къс) (2DL/3DL или 2DS/3DS съответно) [14]. Дължината на интрацитоплазмената част определя функцията на съответния рецептор: инхибиторни (iKIRs) с дълга цитоплазмена част и активиращи (aKIRs) с къса цитоплазмена "опашка" кореспондиращи на активираща сигнална трансдукция [18]. Лиганди за повечето KIRs са специфични мотиви на HLA клас I молекулите, експресирани от почти всички клетки на организма. Група 1 HLA-C молекули (C1) включва алелите със серин и аспаргин на позиции 77 и 80 (Ser77 и Asn80) и свързват специфично инхибиторните KIR2DL2/3, а група 2 (C2) алелите с аспаргин и лизин (Asn77 и Lys80) на посочените позиции са лиганди за KIR2DL1 [1, 34]. Специфичен лиганд за KIR3DL1 са HLA-A и HLA-B молекули с Bw4 мотив [11, 29], докато някои HLA-A3 и -A11 алели се свързват специфично с друг представител на KIR3D рецепторите - KIR3DL2 [26]. Механизмът, чрез който KIR-HLA клас I лигандното взаимодействие регулира функцията на клетките естествени убийци е познат като „missing-self“ хипотезата [20]. Тя предполага, че клетки, експресирани собствени MHC клас I молекули са защитени от NK-клетъчна атака, като NK разпознават и разрушават автоложни клетки, само ако последните са загубили или са с намалена експресия на собствени MHC клас I продукти. KIRs - разположени на хромозома 19q13.4 и HLA - на хромозома 6p21.3 се унаследяват независимо, което определя възможността "missing self" разпознаването да се прояви в NK-клетъчна алореактивност при трансплантация на стволови клетки дори при HLA идентични двойки. KIR/HLA лигандна несъвместимост между донор и реципиент на ало-СКТ се приема, когато в генотипа на реципиента липсват HLA клас I лиганди, специфично свързващи донорните инхибиторни KIRs [13]. Теоретично се допуска, че алогенните NK клетки ще проявят цитотоксична активност срещу антиген представящите клетки на реципиента и резидуални левкемични клетки в случай, че последните не експресират HLA клас I лиганди, които могат да свързват специфично донорните инхибиторни KIRs. В допълнение, не е известен точният механизъм, чрез който се регулира реактивността на донорните NK клетки, но изглежда, че тя е насочена само срещу хемопоеичните клетки на реципиента (левкемични и антиген представящи), но не и срещу други клетки на организма [23]. Следователно, NK-рецепторната несъвместимост в посока присадка срещу приемател ще намали риска от GvHD и рецидив на основното заболяване и ще подобри преживяемостта и прогнозата при трансплантираните пациенти [23]. В подкрепа са данните от няколко независими проучвания доказващи негативна корелация

между риска от рецидив на основното заболяване и отхвърляне на присадката и наличието на KIR/HLA лигандна несъвместимост в посока донор срещу реципиент, както и протективният му ефект за развитието на GvHD [5, 12, 13], но други автори не описват подобни асоциации [2, 3, 9, 17]. Трябва да се отбележи обаче, че различните проучвания са върху хетерогенна група пациенти с разнородни нозологични единици и трансплантационен режим. Може да се предположи, че туморният контрол в организма зависи от комплексното действие на различни имуногенетични фактори в допълнение на KIRs и техните HLA клас I лиганди и различни други фактори, като нозологичната единица и статуса преди KMT [13], кондициониращия режим [12] и количеството Т и NK клетки в трансплантата [5]. Допълнително в последните години KIRs и HLA лигандния генотип на донора и реципиента се обсъждат в контекста на ало-СКТ извън рамките само на наличната KIR/HLA лигандна съвместимост/несъвместимост. Установена е например намалена обща преживяемост (overall survival, OS) на реципиенти хомозиготни по HLA група C2 лиганди, особено при едновременно наличие на KIR2DS2 позитивен донор, поради увеличен риск от инфекции и/или рецидив [7]. Тези резултати заедно с данните, показващи

пряко участие на активиращите KIRs в имунологичния отговор срещу вирусни инфекции [15, 22] дават основание да се предположи, че KIRs и KIR/HLA лигандните генотипи на донора и реципиента може да благоприятстват освен унищожаването на неопластични клетки, така и на вирус инфектирани клетки на реципиента в следтрансплантационния период.

В настоящото проучване изследвахме клиничната значимост на KIR и HLA клас I лигандния генен полиморфизъм при пациенти след алогенна трансплантация на стволови клетки и техните донори и потърсихме корелационна връзка с риска от възникване на трансплантационно-свързани усложнения (aGvHD, cGvHD, рецидив и инфекциозно усложнение), както и влиянието им за дългосрочната прогноза след ало-СКТ (OS, NRM, disease free survival, DFS).

Материал и методи

Групи изследвани.

Двадесет пациента с хематологично заболяване, трансплантирани в Националната специализирана болница за лечение на хематологични заболявания, Р. България (НСБАЛХЗ) в периода ноември 2010г.- октомври 2012г. и съответните им донори бяха включени в проучването.

Таблица 1. Характеристика на пациентите и донорите, и на приложената трансплантационна процедура

Реципиенти (n=20)	
➤ възраст	36.8 ± 8.7
➤ пол – жени/мъже	10/10
➤ позитивен CMV статус	1 (5%)
➤ предхождаща авто/алогенна СКТ	1 (5%)
➤ Диагноза	
миелоидна неоплазия - МН (n=9)	
ОМЛ	9 (45%)
лимфоидна неоплазия - ЛН (n=8)	
ОЛЛ	6 (30%)
НХЛ	1 (5%)
плазмноклетъчна левкемия	1 (5%)
Апластична анемия - АА	3 (15%)
➤ Статус преди ало-СКТ	
ремисия	11 (55%)
прогресия/рефрактерност	9 (45%)
➤ Донор	
възраст	34.3 ± 12.3
пол - женски/мъжки	10/10
съвместимост по пол	12 (60%)
10/10 HLA съвместимост	18 (90%)
позитивен CMV статус	0 (0%)
➤ Кондициониращ режим	
миелоаблативен	18 (95%)
RIC	1 (5%)

Острата и хронична GvHD и GvHD бяха диагностирани съобразно стандартните критерии [31]. Клинично значима aGvHD беше приета единствено при пациенти, когато се е налагало прилагането на системни глюкокортикостероиди. Като рецидив са определени случаите, в които след алотрансплантация цитоморфологично или хистологично е доказан субстрат на хематологичното заболяване. DFS е времето от трансплантация на стволови клетки до цитоморфологично или хистологично регистриран рецидив или летален изход. NRM е дефинирана във всеки случай на летален изход без доказан рецидив след ало-СКТ. OS включва периода от трансплантация на алогенни стволови клетки до летален изход, независимо от причината или крайната дата на изследването. Като инфекциозно усложнение е приет всеки случай на микробиологично доказана (микробно число >10⁵) бактериална или гъбична инфекция, или вирусна инфекция (CMV/EBV), доказана чрез Real time-PCR методика. CMV инфекция е приета при доказана антигенемия ($\geq 10\,000$ CMV copies/ml) или в редки случаи при по-ниска вирусемия, но допълнителни клинични индикации изискващи започване на терапия с противовирусни медикаменти. Характеристиката на включените в проучването индивиди е представена в табл. 1.

KIR генотипизиране.

ДНК беше изолирана от периферна венозна кръв на всеки от включените в проучването индивиди чрез автоматична система за ДНК изолиране - iPrep™ Purification Instrument (Invitrogen, USA) и iPrep PureLink® gDNA™ Blood kit (Invitrogen, USA), след подписване на информирано съгласие. KIR генотипизиране беше извършено чрез PCR-SSP метод с търговски набор Olerup SSP® KIR genotyping kit (Olerup SSP AB, Sweden), включващ 23 праймерни смеси за определянето на 15 KIR специфичности: 13 гена (2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL4, 2DL5, 3DL1/3DS1, 3DL2, 3DL3, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5) и 2 псевдогена (2DP1, 3DP1) съобразно инструкциите на производителя.

HLA клас I лиганд генотипизиране.

За определяне на KIR HLA лигандните специфичности беше приложен индиректен подход – определяне на HLA клас I лигандни групи, чрез програма “KIR ligand calculator” (http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/ligand_calculator.cgi), използвайки данните от HLA клас I генотипизирането с висока разграничителна способност (PCR-SBT метод) при изследване HLA съвместимостта между донора и реципиента.

KIR-HLA клас I лигандна съвместимост и “missing KIR-ligand” алгоритъм.

KIR-HLA клас I лигандна съвместимост/несъвместимост между реципиента и донора при ало-СКТ беше определяна въз основа на “missing KIR-ligand” модела предложен от Hsu и сътр. [13].

Общо пет KIR лигандни групи бяха включени в анализа - HLA-C1, -C2, -B^{Bw4}, -A^{Bw4} и A3/11. Допълнително донорите на ало-СКТ бяха разделени в четири групи в зависимост от съвместимостта между aKIR генотипи на донора и реципиента по подобие на проучването на Chen и сътр. [4]: група 1 - aKIR генотипи на донора и реципиента са еднакви, група 2 - наличие на допълнителен aKIR в генотипа на донора, група 3 - наличие на допълнителен aKIR в генотипа на реципиента, група 4 - aKIR генотипи на донора и реципиента се различават по състав.

Статистически методи.

За изчисляване на вероятността за OS и DFS беше използван методът на Kaplan и Meier. Сравнителен анализ между групите в модела на Kaplan-Meier (time-to-event models) в зависимост от фактора за стратификация беше извършен чрез логаритмична статистика (еднофакторна зависимост, log rank). Оценка на риска за възникване на постратрансплантационни компликации (инфекциозни усложнения, aGvHD и cGvHD, NRM, рецидив) беше извършен чрез еднофакторен Cox-регресионен анализ и измерване на Hazard ratio (HR). При наличие на повече от една значими променливи за дадено събитие (инфекциозни усложнения, aGvHD и cGvHD, NRM, рецидив), допълнително беше приложен многофакторен стъпков регресионен анализ (Forward Stepwise Likelihood Ratio) за оценка на съвместното им влияние. Всички описани методи бяха осъществени с програмата SPSS for Windows v.16.0.

Резултати

Средният период на проследяване на реципиентите беше 263 ± 186 дни. Отнесено към крайната дата на проследяване (17.11.2012г.) 5 пациента (25%) бяха рецидивирали и 5 пациента (25%) бяха починали от причини свързани с трансплантацията (NRM). Остра GvHD (III-IV степен) бе доказана в 5 случаи (25%) и cGvHD (II-IV степен) в 7 (35%). При трима от алотрансплантираните пациенти cGvHD не е анализирана - при двама поради по-къс от + 100 дни период на проследяване и при един, поради много кратка преживяемост след ало-СКТ (+20дни).

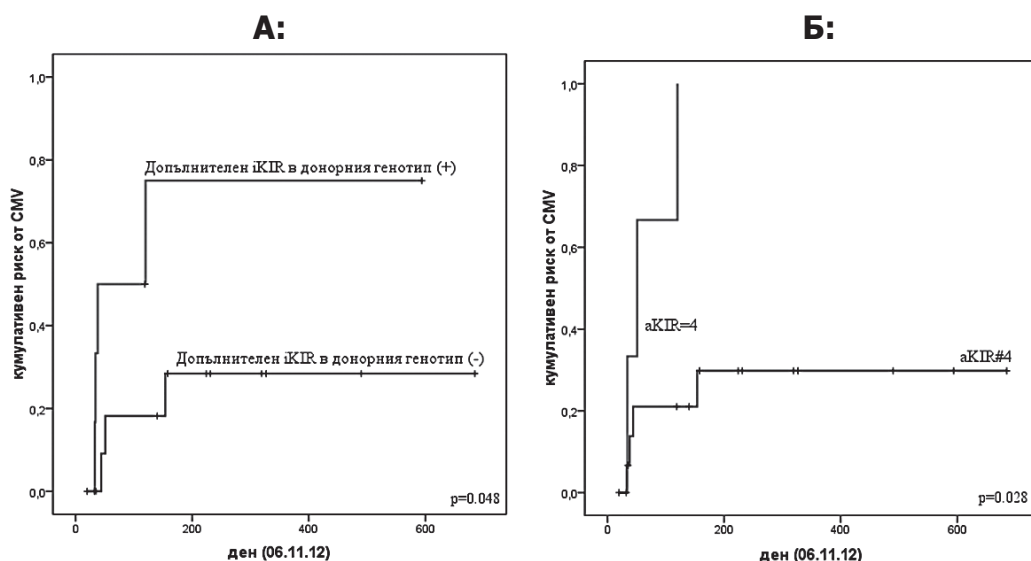
1. Риск от посттрансплантационни инфекциозни усложнения

1.1 Риск от вирусни инфекции

Най-честата и с клинично значение в следтрансплантационния период вирусна инфекция е цитомегаловирусната (CMV). Пациенти, получили алографт от донори с по-висок брой инхибиторни KIRs в сравнение с реципиента, се асоциират с повишен риск от CMV инфекции [$p=0.049$; HR 0.2 (95%CI 0.05-0.99), фиг. 1A]. Подобно негативно влияние беше установено в случаите, когато

донорът и реципиентът са носители на различен набор активиращи KIRs [“група 4”, $p=0.028$; HR 0.2 (95%CI 0.03-0.8)], както и когато донорният акти-

виращ KIR генотип е съставен от четири aKIRs [$p=0.049$; HR 0.2 (95%CI 0.05-0.99), фиг. 1Б].



Фигура 1. Криви на Kaplan-Meier, изразяващи кумулативния риск от посттрансплантационна CMV инфекция. А: в зависимост от донор/реципиент инхибиторен KIR генотип. Б: в зависимост от донорния активиращ KIR генотип (брой aKIRs).

При оценка на съвкупната значимост на трите описани фактори за възникването на CMV при мултивариационен стъпков регресионен анализ, с най-силно и значимо влияние беше демонстриран “група 4” фактор [$p=0.048$, HR 0.61 (95%CI 0.004-0.97)], докато aKIRs=4 и допълнителен iKIR са без статистическа достоверност ($p=0.069$ и $p=0.083$ съответно).

1.2 Риск от бактериални инфекции

Чрез еднофакторен регресионен анализ (Cox-regression) установихме по-висока вероятност за развитие на бактериални усложнения, дефинирани като позитивна микробиологична посявка (микробно число $>10^5$) на кръв/урина/секрет от ЦВК/анален/гърлен секрет изискващо прилагането на системна антимикробна терапия, при пациенти носители на група HLA-A^{Bw4} KIR лиганди [$p=0.013$, HR 0.2 (95% CI 0.01-0.7), фиг. 2].

1.3 Риск от микотични инфекции

По отношение на възникването на микотични инфекции в следтрансплантационния период никоя от анализирани променливи не беше асоциирана със значимо влияние.

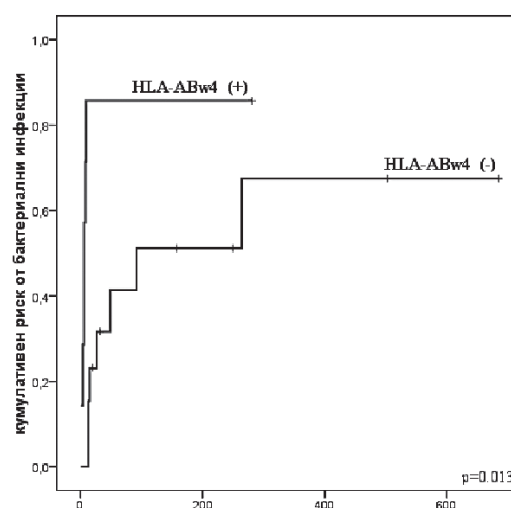
Риск от aGvHD и cGvHD

Донорен генотип с 3 активиращи KIR гени (aKIRs=3) беше намерен като рисков [$p=0.01$, HR 0.1 (95%CI 0.01-0.53)] за развитието на клинично значима aGvHD (степен III-IV). Не беше установена значима връзка между cGvHD и изследваните имуногенетични фактори ($p>0.05$).

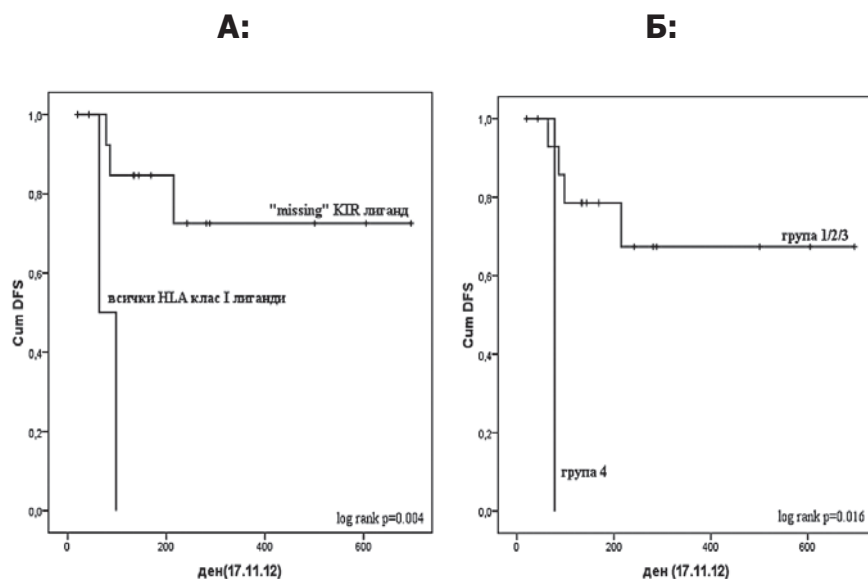
DFS и риск от рецидив

При изчисляване на DFS и измерване на значимите зависимости, свързани със случаите на рецидив, пациентите с апластична анемия бяха изклю-

чени от анализа. Със статистическа достоверност ($p=0.021$) липсата на лиганд за донорните инхибиторни KIRs (“missing” KIR лиганд) беше намерена с протективен ефект за рецидив на основното заболяване [HR 10.3 (95% CI 1.4-74.3)] и удължен безболезнен период в сравнение с реципиентите, при които са представени всички HLA клас I лигандни групи (“missing” KIR лиганд vs. всички HLA клас I лиганди, 567.8 vs. 81.0 дни, фиг. 3А). Друг фактор с негативен прогностичен ефект за продължителността на DFS е „група 4” aKIR генотип на донора (различен набор от активиращи KIRs в генотипите на донора и реципиента) (фиг. 3Б).



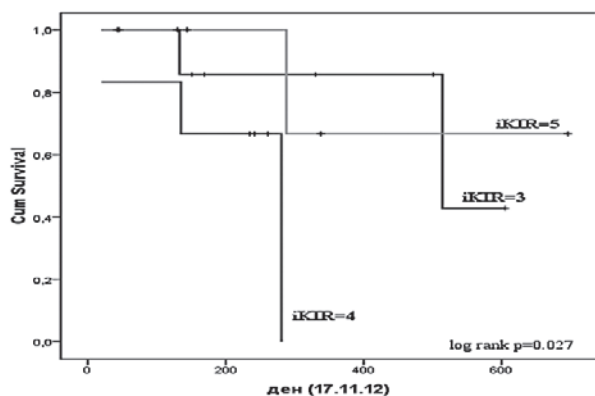
Фигура 2. Криви на Kaplan-Meier, изразяващи кумулативния риск от посттрансплантационна бактериална инфекция в зависимост от HLA-A^{Bw4} генотипа на реципиента.



Фигура 3. Kaplan-Meier диаграма за оценка на DFS в зависимост от
А: KIR-HLA клас I лигандната съвместимост между донора и реципиента,
Б: донор/реципиент aKIR генотип съвместимост.

OS и NRM

Единствено броят на инхибиторните KIRs в донорния генотип показва сигнификантно ниво на значимост за общата преживяемост в следтрансплантационния период (фиг. 4). По-ниска преживяемост във всички изследвани групи се асоциира с едновременно присъствие на четири iKIRs в сравнение с донорни генотипи притежаващи три или пет iKIRs (iKIR=4 vs. iKIR=5/3, 213.2 vs. 544.6 дни, log rank $p=0.026$).



Фигура 4. Kaplan-Meier диаграма за оценка на OS в зависимост от aKIR генотип на донора.

Само при един реципиент с остра лимфобластна левкемия беше регистриран летален изход поради рецидив на заболяването, което не доведе до съществени различия между NRM и OS в групите като цяло и рисковите фактори за NRM са идентични с тези при OS. Наличието на 4 iKIRs на донора е рисков фактор [HR=0.1 (95% CI 0.1-1.1)] за настъпване на NRM в следтрансплантационния период, въпреки че статистическата раз-

ликата беше наблюдавана само като тенденция ($p=0.061$).

Обсъждане

Предложената от Kalle и сътр. [14] преди повече от 10 години "missing self" хипотеза, обясняваща функция на NK клетките в зависимост от лиганд-специфичното свързване на iKIRs, е анализирана в контекста на ало-СКТ от различни изследвателски групи, а резултатите са противоречиви. В настоящето проучване липсата на лиганд в генотипа на реципиента за донорните инхибиторни KIR ("missing" KIR лиганд) се асоциира с по-дълъг безболестен период и намален риск от рецидив. В здрави индивиди, взаимодействието между инхибиторни KIRs и съответния им HLA клас I лиганд предпазва организма от NK-клетъчна автодеструкция [20]. При алогенна трансплантация на стволови клетки лиганди за донорните iKIRs са HLA клас I молекулите експресирани от клетките на трансплантирания, т. е. при липсата на лиганд в генотипа на реципиента отпада инхибиторния сигнал проведен от HLA-KIR взаимодействието, състояние при което донорните NK клетки са с повишена способност да изпълняват физиологичната си функция - антитуморна и антивирусна цитотоксичност. В подкрепата на тази теория е установената негативна асоциация на HLA-A^{Bw4} лигандна група в генотипа на реципиента с развитието на бактериални усложнения в посттрансплантационния период. Вероятно носителството на HLA-A^{Bw4} е асоциирано с по-силна инхибция на донорните NK клетки опосредствено от KIR3DL1 свързване. Въпреки, че не съществуват доказателства за пряко участие на клетките естествени убийци

при елиминирането на бактерии, ние допускаме, че в тази ситуация (реципиент A^{Bw4+} vs. A^{Bw4-}) намалената активизираща функция на алореактивните NK клетки резултира в намален потенциал за активиране и усилване на дендритните клетки и Т клетките на адаптивния имунен отговор [23]. В съответствие с работната хипотеза за влияние на генетично предетерминиран NK-клетъчен потенциал, е намереният предразполагащ ефект за развитие на пострасплатационна CMV инфекция на донорен генотип, различаващ се от този на реципиента по наличие на по-висок брой инхибиторни KIRs (допълнителен iKIR), който вероятно води до по-силна инхибция и понижена донорна NK антивирусна цитотоксичност. В подкрепа на това са и литературните данни на други изследователски колективи [4, 6, 35]. Cook и сътр. [6] например установяват 65% намаление на CMV усложненията след ало-СКТ от донор, притежаващ повече от един aKIR и същият ефект е докладван и при бъбречни трансплантации [30]. Допълнително Zaia и сътр. [35] доказват, че протективният ефект на донорните активизиращи KIRs е дозо-зависим, като най-изразен е при генотипи, съдържащи повече от пет aKIRs. За разлика от тях в изследваната от нас група, негативен ефект беше отбелязан при донори, притежаващи четири активизиращи KIR гена. Същевременно, независимият благоприятен ефект на комбинацията от KIR2DS2 и KIR2DS4 в донорния генотип установен от Zaia и сътр. [35] поставя въпроса за ролята на индивидуалните KIR гени и KIR генотипната съвместимост в двойките на ало-СКТ за развитието на вирусни усложнения в следтрансплантационния период, в допълнение на простата сума от броя на активизиращи KIRs. За значението на съвместимостта между KIR генотипите на донора и реципиента в двойките ало-СКТ свидетелства намереното от нас статистически значимо влияние на "група 4" донорен aKIR генотип (различен набор aKIRs идентифицирани при реципиента и неговия донор) за риска от CMV и DFS. Chen и сътр. [4] също установяват негативен ефект на "група 4" донорен aKIR, но по отношение на общата преживяемост и TRM. За разликата от нас, те не намират сигнификантна значимост на изследвания фактор за DFS, а понижен риск от CMV асоциират с "група 2" донорен aKIR (допълнителен aKIR в донора в сравнение с реципиента). Установеното идентично независимо влияние на общ фактор ("група 4" донор) за различни видове посттрансплантационни компликации (вирусни инфекции и DFS), подсказва че донорните NK клетки използват сходни механизми за осъществяване на двете си основни функции - антитуморна и антивирусна активност. Нито един от установените протективни или предразполагащи фактори за възникване на трансплантационно свързани компликации (инфекци-

озни усложнения, aGvHD, cGvHD и рецидив на заболяването) не е свързан с промяна в общата преживяемост и трансплантационно-свързаната смъртност. Единствено донорен генотип с четири инхибиторни KIRs (iKIRs=4) е негативно асоцииран с NRM и скъсен OS. Нашите резултати са в противоречие с данните на Santis и сътр. [28], които доказват, че по-високият брой инхибиторни или активизиращи KIRs в донора подобряват OS, както и с тези на Cooley и сътр. [8], посочващи група B KIR донорен хаплогенотип за протективен.

Заклучение

Проведеното от нас проучване показва, че генетични полиморфизми в KIR и KIR HLA лигандите на донора и реципиента изпълняват важна роля в регулирането на NK-клетъчната активност в следтрансплантационния период. Освен значението на "missing" KIR лиганд за NK-медиация антилевкемичен (graft versus leukemia, GvL) ефект, в настоящото изследване беше показана и ролята на донорния KIR генотип за развитието на вирусни компликации и aGvHD през първите няколко месеца след трансплантационната процедура, както и ефектът от KIR генотипната съвместимост. След ало-СКТ, NK са първия клетъчен клон, който се възстановява до нормален брой, понякога, дори, в рамките на няколко седмици [10, 27]. През този период NK-клетъчният репертоар се реконструира с цел индуциране на авто-толерантност. Това е съответно и периодът, в който се очаква и най-мощен алореактивен NK-клетъчен потенциал. Нашите данни по отношение на активизиращите и инхибиторните донорни KIR генотипи се отличават от тези в достъпната ни литература, но трябва да се има в предвид, че анализираната от нас група пациенти е малобройна и силно хетерогенна – различни нозологични единици с различен статус на заболяването (с/без ремисия) и рискова група, различни донори (родствен/неродствен, HLA-съвместим/HLA-несъвместим), както и кондициониращ режим (миелоаблативен/немиелоаблативен). За детайлно анализиране ролята на донорния aKIR и iKIR генотип и възможното влияние на изграждащите ги индивидуалните KIRs, е необходимо сепарирано изследване на влиянието на индивидуалните KIR генни комбинации, но възможните многобройни вариации и малкият брой изследвани не позволиха извършването на подобен анализ. Независимо, че представените резултати са предварителни за нашата популация, те убедително демонстрират роля на KIR/HLA клас I лигандния полиморфизъм при ало-СКТ, освен в контекста на очаквания алореактивен NK-клетъчен антилевкемичен ефект, но и за пострасплатационния антиинфекциозен имунен отговор и дългосрочната прогноза за тази група болни.

Необходимо е увеличаване броя на изследваните и унифициране на групите болни съобразно диагноза, вид на донора и използван кондициониращ режим за по-детайлно изясняване значението на KIR и HLA лигандния генен полиморфизъм при алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Biassoni R, Falco M, Cambiaggi A et al. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by 'group 2' or 'group 1' NK clones. *J Exp Med* 1995; 182:605–609
2. Bishara A., De Santis D., Witt CC. et al. The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens* 2004; 63:204-211
3. Bourhauser M., Schwerdtfeger R., Martin H., Frank KH., Theuser C., Ehninger G. Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donor. *Blood* 2004; 103:2860-2861
4. Chen C., Busson M., Rocha V., Appert M-L. et al. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non- T- cell depleted HLA- identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorder. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 38: 437-444
5. Clausen J., Wolf D., Petzer A., Gonsilius E. et. al. Impact of natural killer cell dose and donor killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype on outcome following human leucocyte antigen-identical haematopoietic stem cell transplantation. *Cl. Ex. Immunol* 2007; 148: 520-528
6. Cook M., Briggs D., Craddock C., Mahendra P., Miligan D, et al. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 2006; 107: 1230-1232
7. Cook M., Miligan D, Fegan C., Darbyshire P., Mahendra P., Craddock C. et al. The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood* 2004; 103: 1521-1526
8. Cooley S., Trachtenberg E., Bergemann T. et al. Donor with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2009; 113: 726-732
9. Davies SM., Ruggieri L., DeFor T. et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. *Killer immunoglobulin-like receptors. Blood* 2002; 100:3825-3827
10. Dolstra H., Preijers F, Van de Wiel-van Kemenade E Expansion of CD8+CD57+ T cells after allogeneic BMT is related with a low incidence of relapse and with cytomegalovirus infection. *Br. J. Haematol.* 1995;90: 300-307
11. Foley B., De Santis D., Van Beelen E., Lathbury L., et al. The reactivity of Bw4+ HLA-B and HLA-A alleles with KIR3DL1: implications for patient and donor suitability for haploidentical stem cell transplants. *Blood* 2008; 112: 435–443
12. Giebel S., Locatelli F., Lamparelli T., Velardi A., Davies S. et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood* 2003; 102: 814-819
13. Hsu K., Keever-Taylor C., Wilton A., Pinto CL., Heller GL., Arkun KI. et. al. Improve outcome in HLA- identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 2005; 105: 4878-4884
14. Karre K., Ljunggren H., Piontek G., Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319: 675-678
15. Khakoo S., Thio C., Martin MP., Brooks C., Gao X., As-temborski J. et. al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305: 872-874
16. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. 'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975; 5:112–117
17. Kroger N., Binder T., Zabelina T. Et al. Low number of donor activating killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) genes but not KIR-ligand mismatch prevents relapse and improves disease-free survival in leukemia patients after in vivo T-cell depleted unrelated stem cell transplantation. *Transplantation* 2006; 82:1024-1030
18. Lanier L. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 359-393., Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 217-251
19. Lee SJ., Klein J., Haagenson M., Baxter-Lowe L., Confer D. et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation *Blood* 2007; 110: 4576-4583
20. Ljunggren H., Karre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-244
21. Marsh SGE, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) nomenclature report, 2002. *Immunogenetics* 2003; 55: 220–226
22. Martin MP, Gao X., Lee J., Nelson G., Detels R., Goedert J. et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31: 429–434
23. Moretta A., Bottino C., Mingari MC., Biassoni R., Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 2002; 3: 6-8
24. Naumova E., Mihaylova A., Stoitchkov K. et al. Genetic polymorphism of NK receptors and their ligand in melanoma patients: Prevalance of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol. Immunother* 2005; 54: 172-178
25. Passweg JR., Baldomero H., Gratwohl A., Bregni M., Cesaro S., P Dreger P., De Witte T., Farge-Bancel D.,

- Gaspar B., Marsh J., Mohty M., Peters C., Tichelli A., Velardi A., C Ruiz de Elvira C., Falkenburg F., Sureda A., Madrigal A. et al. The EBMT activity survey: 1990–2010. *Bone Marrow Transplantation* 2012;1–18
26. Pende D., Biasson R., Cantoni C., Verdiani S, Falco M. et. al. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes- A novel member of the p58-p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140 kD disulfide-linked dimer. *J. Exp. Med* 1996; 184: 505-518
 27. Ruggeri L., Capanni M., Casucci M., Volpi I. et al Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999; 94: 333-339
 28. Santis D., Bishara A., Witt S., Nagler A., Brautbar C., Slavin S., Christiansen F. T. Natural killer cell HLA-C epitopes and killer cell immunoglobulin-like receptors both influence outcome of mismatched unrelated donor bone marrow transplants. *Tissue Antigens* 2005; 65: 519-528
 29. Stern M. Elsaasser H., Honger G., Steiger J. et. al. The Number of Activating KIR Genes Inversely Correlates with the Rate of CMV Infection/Reactivation in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2008; 8:1312–1317
 30. Stern M., Ruggeri L., Capanni M., Mancusi A. and Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 2008; 112: 708-710
 31. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1975;292: 895-902,
 - Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al.: National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 945–956
 32. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:217– 251
 33. Wende H., Colonna M., Ziegler A., and Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mamm. Genome* 1999; 10: 154-160
 34. Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* 1997; 158:4026–4028
 35. Zaia JA, Sun JY, Gallez-Hawkins GM, et al. The effect of single and combined activating killer immunoglobulin-like receptor genotypes on cytomegalovirus infection and immunity after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15: 315-325

Адрес за кореспонденция:

Виктория Върбанова
НСБАЛХЗ, София
ул. „Пловдивско поле” №6
София 1156
тел: 0884674160
e-mail: v.varbanova@dir.bg

ПРИЛОЖЕНИЕ НА ВИСОКОДОЗОВА ИНДУКЦИОННА ТЕРАПИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИ С РЕЗИСТЕНТНИ ОСТРИ МИЕЛОИДНИ ЛЕВКЕМИИ ПОД 60-ГОДИШНА ВЪЗРАСТ

Б. Спасов¹, П. Ганева¹, М. Дончев¹, К. Игнатова¹, Г. Арnaudov¹, Г. Балаценко³,
М. Генова², Св. Ангелова³, Ст. Тошков³, Г. Михайлов¹

¹ Отделение по клинична хематология, ² Лаборатория по хематопатология и имунология,

³ Лаборатория по цитогенетика и молекулярна биология - София, към

Национална специализирана болница за активно лечение на хематологичните заболявания

HIGH DOSE INDUCTION THERAPY IN PATIENTS WITH REFRACTORY ACUTE MYELOID LEUKEMIAS UNDER 60 YEARS

B. Spassov¹, P. Ganeva¹, M. Donchev¹, K. Ignatova¹, G. Arnaudov¹, G. Balatzenko³,
M. Guenova², Sv. Angelova³, S. Toshkov³, G. Michailov¹

¹ Department of Clinical Hematology, ² Laboratory of Haematopathology and Immunology,

³ Laboratory of Cytogenetics and Molecular Biology,

National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Резюме: Пълна ремисия (ПР) може да се постигне при 50-80% от пациентите с de novo остра миелоидна левкемия (ОМЛ), като невъзможността за постигането ѝ корелира по правило с неблагоприятна прогноза. Прилагането на високодозова спасителна терапия (СТ) позволява при част от тези болни да се постигне дълготрайна ПР и да се създаде възможност за провеждане на трансплантация на хемопоеични стволови клетки (ТХСК). Тъй като в нашата страна липсват системни наблюдения, целта на настоящото проучване е да се оцени ефикасността от прилагането на високи дози цитозин арабинозид, флударабин, идарубицин/митоксантрон и гранулоцитен колонио-стимулиращ фактор като СТ при пациенти с ОМЛ, резистентни на стандартно индукционно лечение, като получените резултати се съпоставят с данните от други водещи хематологични центрове. В изследването бяха включени 36 пациенти с de novo ОМЛ на възраст между 24 и 59 години. Посредством СТ беше постигната ПР при 50% от пациентите, индукционна смъртност (ИС) беше установена при 5,6% от случаите, като медианата на обща преживяемост (ОП) беше 11,83 месеца. Медианата на преживяемостта, свободна от заболяване (ПСЗ), беше 4,9 месеца. ТХСК беше приложена при 33,3% от пациентите. Получените резултати по отношение честотата на постигане на ПР и ИС, както и продължителността на ОП, не се различават значително от тези, получени в други европейски центрове. По-краткотрайната ПСЗ в проучването ни най-вероятно се дължи на ограниченото прилагане на ТХСК в нашия център. Необходимо е да бъде проведено проспективно проучване върху по-голям брой болни за валидиране на получените резултати.

Ключови думи: остра миелоидна левкемия, високодозова терапия

Summary: Complete remission (CR) could be established in 50-80% patients with de novo acute myeloid leukemia (AML) and failure to achieve CR correlates with poor prognosis. High-dose salvage therapy could establish long-term CR in these patients and provide a bridge to hemopoietic stem cell transplantation (HSCT). The aim of the present study is to establish the effectiveness of application of fludarabine, high doses cytosin arabinosid (Ara C), idarubicin/mitoxantrone and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) as salvage therapy (ST) in resistant to conventional induction AML patients and compare the results with those of clinical trials, performed in other leading hematological centers. The clinical follow up was carried out upon 36 patients with de novo AML, aged 24-59, treated in NSBALHZ – Sofia. A complete remission was induced in 50% of the patients, the median of estimated overall survival was 11.83 months, whereas induction death was registered in 5.6% of the cases. The median of estimated disease-free survival was 4.9 months and HSCT was performed in 33.3% of the patients. Comparing the data gathered from our and other european hematological centers, it was observed that our therapeutic results didn't differ significantly regarding

complete remission and induction death rates and overall survival. Disease-free survival was much shorter which was most probably due to low transplantation activity in our center. A larger prospective study is necessary to be carried out to confirm these results.

Keywords: acute myeloid leukemia, high dose therapy

ВЪВЕДЕНИЕ

Независимо от значителния напредък в разбирането на биологията на острата миелоидна левкемия (ОМЛ) през последните години, лечението на заболяването продължава да бъде предизвикателство за клиничните хематолози, тъй като с конвенционалните индукционни протоколи, включващи антрациклини и цитарабин, пълна ремисия (ПР) може да се постигне само при 50-80% от пациентите с de novo ОМЛ (Berman et al, 1991; Wiernick et al, 1992). Невъзможността да се постигне ПР корелира по правило с неблагоприятна прогноза. През последните години редица наблюдения подкрепят идеята, че прилагането на високодозова спасителна терапия позволява при част от тези болни да се постигне дълготрайна ПР или да се създаде възможност за провеждане на хемопоеична стволовоклетъчна трансплантация (ХСКТ). Според някои изследователски колективи, прилагането на високи дози цитарабин (AraC) е ефективен подход при спасителните терапевтични режими (Ferra et al, 2000; Kern et al, 2001). Някои in vitro проучвания предполагат, че добавянето на пуриновия аналог флударабин към AraC повишава няколкократно вътреклетъчните нива и вътреклетъчната ретенция на активния метаболит AraC-5'-трифосфат (AraCTP) в левкемичните бласти (Ferrara et al, 1999; Montillo et al, 1998). Способността на левкемичните бласти да превръщат AraC в AraCTP корелира в значителна степен с терапевтичния отговор при прилагането на високи дози AraC. Терапевтичният отговор може да бъде подобрен допълнително чрез включване и на ида-

рубицин или митоксантрон, представляващи антрациклини с ниска кардиотоксичност, имаща значение при пациентите с резистентна ОМЛ, които често са претретирани (De la Rubia et al, 2002; Neil et al, 2002; Hänel et al, 2001). В нашата страна липсват системни наблюдения, поради което ние поставихме за цел да се оцени ефикасността от прилагането на високи дози цитозар, флударабин и идарубицин (IDA-FLAG) или митоксандрон (MITO-FLAG) при пациенти с резистентна ОМЛ.

МЕТОДИ

Пациенти

В настоящото проучване са включени 36 пациенти с ОМЛ, диагностицирана съгласно критериите на Френско-Американско-Британска (ФАБ) класификационна система (Bennett et al, 1976; Bennett et al, 1985). Двама от пациентите (5,6%) страдаха от ОМЛ, развила се на базата на предшестваш миелодиспластичен синдром (МДС), докато при останалите болни (94,3%) беше установена de novo ОМЛ. Заболените индивиди са лекувани в Националната болница за активно лечение на хематологични заболявания (НСБАЛХЗ) – София в периода между м. септември 2003 г. и м. декември 2012 г. Всички болни са на възраст между 24 и 59 години, в добро общо състояние [Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status score ≤ 2], без органна недостатъчност. Пациенти с ОМЛ-М3 (съгласно ФАБ) са изключени от това проучване. Основните характеристики на пациентите са обобщени в табл. 1.

Таблица 1 Характеристики на пациентите с ОМЛ, включени в настоящото проучване

Пациенти	
Възраст - години (n=36)	
Медиана	49
Обхват	24-59
Пол – брой пациенти (%)	
Мъже	13 (36,1%)
Жени	23 (63,9%)
Тип ОМЛ - брой пациенти (%)	
De novo ОМЛ	34 (94,4%)
ОМЛ след МДС	2 (5,6%)
Брой левкоцити ($\times 10^9/l$) (n=34)	
Медиана	14
Обхват	0,95-300

Таблица 1 - Продължение

Пациенти	
<i>Ниво на хемоглобина (гр/л) (n=35)</i>	
Медиана	89,55
Обхват	59-145
<i>Брой тромбоцити ($\times 10^9/\text{л}$) (n=33)</i>	
Медиана	66,95
Обхват	20,6-397
<i>Ниво на лактат дехидрогеназа (Е/л) (n=34)</i>	
Медиана	712
Обхват	158-4033
<i>Бластни клетки в костния мозък (%) (n=32)</i>	
Медиана	86
Обхват	20,6-99
<i>Бластни клетки в периферната кръв (%) (n=31)</i>	
Медиана	62
Обхват	0-100
<i>ФАБ класификация – брой пациенти (%)</i>	
M0	1 (2,8%)
M1	3 (8,3%)
M2	4 (11,1%)
M4	13 (36,1%)
M5	8 (22,2%)
M6	2 (5,6%)
M7	1 (2,8%)
Липсващи данни	4 (11,1%)
Пациенти с резистентна ОМЛ	
	36 (100%)
Пациенти с приложен MITO-FLAG	
	11 (30,6%)
Пациенти с приложен IDA-FLAG	
	25 (69,4%)

Цитогенетичен и молекулярно-биологичен анализ

Хромозомният и молекулярно-биологичният анализ към момента на поставяне на диагнозата бяха проведени в лабораторията по цитогенетика и молекулярна биология към НСБАЛХЗ, съгласно утвърдени стандартни оперативни протоколи. Хромозомните аномалии бяха представени в съответствие с препоръките на International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2009). Успоредно с цитогенетичния анализ беше проведена и обратно транскриптазна полимеразно-верижна реакция (RT-PCR) за установяване на най-честите хромозомни аберации при пациентите с ОМЛ - *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*, *M-BCR-ABL* и *m-BCR-ABL*, съгласно програмата BIOMED-I (van Dongen et al, 1999) и вътрешни тандемни дупликации на гена на *fms*-подобна тирозин киназа 3 (*FLT3-ITD*).

Цитостатична терапия

При тридесет и шест пациенти с ОМЛ беше при-

ложено високодозово индукционно лечение. При 69,4% (25/36) от болните беше проведена терапия по схема IDA-FLAG, докато при останалите 30,6% (11/36) лечението беше по схема MITO-FLAG. Всички пациенти бяха резистентни на конвенционалната индукционна терапия, която включваше прилагане на един или два курса - комбинация на Цитозин-арабинозид (Cytosar – 100 mg/m²/ден; в продължение на пет или седем дни; двукратно на ден в продължение на 3 часа); антрациклинов антибиотик – [Idarubicin (12 mg/m²/ден), Farmorubicin (45 mg/m²/ден) или Mitoxantrone 10 mg/m²/ден в продължение на два или три дни]; с или без приложение на Etoposide (100 mg/m²/ден); в продължение на три или пет дни).

Лечението с IDA-FLAG включваше прилагане на флударабин 30 mg/m² i.v. за 30 минути в продължение на четири последователни дни; цитозар 1000 mg/m² i.v. за четири часа в продължение на четири последователни дни, като приложението му започваше четири часа след началото на флударабина; идарубицин 8 mg/m² за 10 минути на първия и третия ден от курса, като приложението му за-

почваше 30 минути преди началото на цитозара и колонио-стимулиращ фактор 5 µg/kg подкожно, като приложението му започваше един ден преди началото на полихимиотерапията и приключваше след възстановяването на неутрофилния брой ($>0.5 \times 10^9/l$) – Heil et al, 2002.

Лечението с MITO-FLAG включваше прилагане на флударабин 15 мг/м² i.v. за 30 минути през 12 часа в продължение на пет последователни дни; цитозар 1000 мг/м² i.v. през 12 часа за един час в продължение на пет последователни дни; митоксантрон 7 мг/м² за 10 минути на първия, третия и петия ден от курса и колонио-стимулиращ фактор 5 µg/kg подкожно, като приложението му започваше един ден преди началото на полихимиотерапията и приключваше след възстановяването на неутрофилния брой ($>0.5 \times 10^9/l$) – Hänel et al, 2001. Консолидираща терапия беше проведена при 94,4% (17/18) от пациентите с постигната пълна ремисия. Тя включваше прилагане на интермедиерни или високи дози Цитозар. Един болен отказа приложението на консолидиращото лечение. При шестима от пациентите (33,3%) с постигната пълна ремисия (ПР) беше осъществена алогенна ХСКТ.

Критерии за терапевтичен отговор

Състоянията на ПР и рецидив бяха дефинирани съгласно критериите, предложени от Cheson et al, 2003. Общата преживяемост (ОП) е изчислена от датата на стартиране на високодозовата индукционна терапия до датата на настъпване на летален изход на пациента по каквато и да е причина, или последния контролен преглед на

пациента. Преживяемостта, свободна от заболяване (ПСЗ), е изчислена от датата на постигане на пълна ремисия след прилагане на високодозовата индукционна терапия до настъпване на рецидив или летален изход на пациента по каквато и да е причина, или последния контролен преглед на пациента.

Стратифициране на пациентите според риска

Стратификацията на пациентите беше осъществена въз основа на критериите, възприети от Холандско-Белгийско-Швейцарска Хематологична група (HOVON-SAKK). – Cornelissen et al, 2007. Пациентите бяха стратифицирани в група с добър, интермедиерен и лош риск в зависимост от цитогенетичните и молекулярните отклонения (табл. 2).

Цитогенетичните аберации t(8;21), inv(16) или t(16;16)(p13;q22), както и молекулярните маркери *AML1-ETO* или *CBFb-MYH11*, бяха считани за благоприятни.

Наличието на комплексен кариотип (наличие на 3 или повече хромозомни аномалии), -5q, -7q, abn(3q), t(6;9)(q23;q34), abn(11q23), t(9;22)(q34;q11) или *FLT3-ITD* - бяха считани за неблагоприятни цитогенетичните или молекулярни маркери.

Пациенти, при които не бяха установени благоприятни или неблагоприятни цитогенетични отклонения или при които кариотипът към момента на диагнозата беше неизвестен, бяха класифицирани към интермедиерен цитогенетичен риск.

Табл. 2 Цитогенетична/ молекулярна класификация

	Цитогенетични n(%)	Молекулярни n(%)	Общо n(%)
Благоприятни аномалии	1 (2,8)		1 (2,8)
Интермедиерни аномалии	19 (52,8)		19 (52,8)
Неблагоприятни аномалии	5 (13,8)	11 (30,6)	16 (44,4)

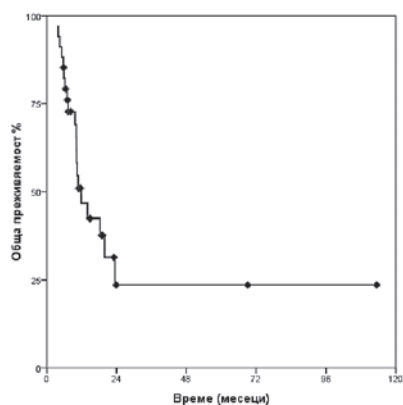
Статистически методи

Статистическата обработка на получените резултати е извършена с помощта на готови програмни продукти Microsoft Excel 2007 и SPSS for Windows, версия 13 (Chicago, IL, USA). Крайната дата на статистическото наблюдение на болните беше 24 януари 2013 година. Кривите за ОП и ПСЗ бяха изчислявани по метода на Kaplan-Meier.

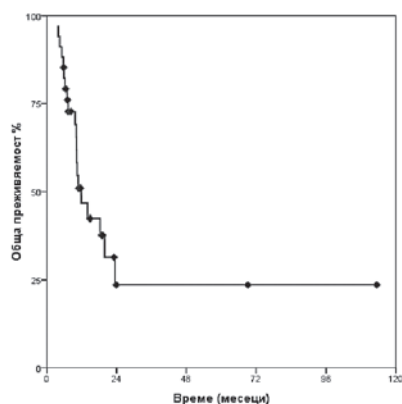
РЕЗУЛТАТИ

Посредством прилагането на високодозови спасителни режими в нашето проучване ПР беше постигната при 50% (18/36) от пациентите. Инду-

кционна смъртност беше регистрирана при 5,6% (2/36), докато резистентно заболяване беше наблюдавано при 44,4% (16/36) от болните (табл. 3). През периода на наблюдения, средно в продължение на 10,25 месеца (3,7-113,4 месеца), при 58,3% (21/36) от пациентите настъпи летален изход. Изчислената медиана на ОП беше 11,83 месеца (фиг. 1). Рецидив на заболяването беше регистриран при 61,1% (11/18) от пациентите, при които беше постигната пълна ремисия, като изчислената медиана на ПСЗ беше 4,9 месеца (фиг. 2).



Фиг. 1. Изчислена обща преживяемост на пациентите с резистентна ОМЛ, лекувани с високодозова индукционна терапия в НСБАЛХЗ



Фиг. 2. Изчислена преживяемост, свободна от заболяване на пациентите с резистентна ОМЛ, лекувани с високодозова индукционна терапия в НСБАЛХЗ

ОБСЪЖДАНЕ

Отсъствието на ПР при пациенти с ОМЛ по правило корелира с неблагоприятна прогноза. От друга страна, постигането на ПР при тези пациенти създава възможност за провеждане на допълнително лечение, в т.ч. и трансплантационна терапия, при условие, че токсичността на спасителния терапевтичен режим е приемлива. Множество

изследователски групи са проучвали ефикасността от приложението на Цитозар в комбинация с други цитостатични препарати, като флударабин с или без антрациклини (идарубицин или митоксантрон) - De la Rubia et al, 2002; Neil et al, 2002; Hänel et al, 2001; Pastore et al, 2003.

В настоящото проучване бяха включени 36 пациенти с резистентни ОМЛ под 60-годишна възраст, лекувани с високодозова индукционна терапия. Честотата на постигане на пълна ремисия в нашето проучване (50%) е сходна с тази, съобщавана от други изследователски екипи (De la Rubia et al, 2002; Hänel et al, 2001; Pastore et al, 2003; Virchis et al, 2004), което подкрепя идеята, че високодозовата индукционна терапия по схема IDA/MITO-FLAG представлява ефективно лечение с добър антилевкемичен ефект (табл. 4). Значими различия с данните от други европейски центрове не бяха наблюдавани и по отношение на индукционната смъртност и продължителността на общата преживяемост. Беше установена по-краткотрайна преживяемост, свободна от заболяване, което най-вероятно се дължи на ниската честота на прилагане на трансплантираща терапия в нашия център.

В заключение, спасителните терапевтични режими IDA/MITO-FLAG се характеризират с изразена антилевкемична ефективност, която позволява постигане на пълна ремисия при пациенти с резистентна на конвенционална индукционна химиотерапия ОМЛ. Това от своя страна води до създаване на предпоставка за прилагане на ТХСК при тези пациенти. Нашите данни по отношение постигане на ПР, честота на индукционна смъртност и продължителност на ОП не се различават значително от тези на други хематологични центрове.

Благодарности и коментари:

Изследванията бяха осъществени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ към Министерството на образованието и науката (договор № Д 02-35/2009).

Табл. 4 Сравнителен анализ на терапевтични резултати, получени в НСБАЛХЗ и други европейски хематологични центрове

Показател	НСБАЛХЗ n=36	Фоджа n=46	Кемниц n=29	Лондон n=105
Пълна ремисия	50%	52,1%	58,6%	59%
Резистентна левкемия	44,4%	41,3 %	-	-
Индукционна смъртност	5,6%	6,6%	-	17%
Трансплантационна активност	33,3%	45,8%	29,4%	-
Медиана на OS	11,83 мес.	11 мес.	6,8 мес.	
Медиана на DFS	4,9 мес.	12 мес.	3,2 мес.	8 мес.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Berman E, Heller G, Santorsa J, McKenzie S, Gee T, Kempin S, Gulati S, Andreeff M, Kolitz J, Gabrilove J (1991) Results of randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood* 77:1666–1671
2. Wiernick PH, Banks PL, Case DC, Arlin ZA, Periman PO, Todd MB, Ritch PS, Ence RE, Weitberg AB (1992) Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 79:313–320
3. Ferra C, Berlanga J, Gallardo D, Ancin I, Marin D, Gonzales J, Peris J, Munoz J, Sarra J, Granena A (2000) Mitoxantrone, etoposide, carboplatinum and ARA-C combination therapy (MECA) in refractory and relapsed acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 39:583–590
4. Kern W, Schleyer E, Braess J, Wittmer E, Ohnesorge J, Unterhalt M, Wormann B, Buchner T, Hiddemann W (2001) Efficacy of fludarabine, intermittent sequential high-dose cytosine arabinoside, and mitoxantrone (FIS-HAM) salvage therapy in highly resistant acute leukemias. *Ann Hematol* 80:334–339
5. Ferrara F, Melillo L, Montillo M, Leoni F, Pinto A, Mele G, Mirto S (1999) Fludarabine, cytarabine, and G-CSF (FLAG) for the treatment of acute myeloid leukemia relapsing after autologous stem cell transplantation. *Ann Hematol* 78:380–384
6. Montillo M, Mirto S, Petti MC, Latagliata R, Magrin S, Pinto A, Zagonel V, Mele G, Tedeschi A, Ferrara F (1998) Fludarabine, cytarabine and G-CSF for the treatment of poor risk acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 58:105–109
7. De la Rubia J, Regadera A, Martin G, Cervera J, Sanz G, Martinez J, Garcia I, Andreu R, Moscardo F, Jimenez C, Molla S, Benlloch L, Sanz M (2002) FLAG-IDA regimen (fludarabine, cytarabine, idarubicin and G-CSF) in the treatment of patients with high-risk myeloid malignancies. *Leuk Res* 26:725–730
8. Heil et al., *Blood*, 2002; 100(suppl.1):342a; siehe "Multi-zentrische Studie zur Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) o. RAEB-t < 60J" (AML 1/99 Prot.)
9. Hänel M, Friedrichsen K, Hänel A, Herbst R, Morgner A, Naser S, Nicklisch M, Teich M, Ehninger G, Fiedler F. Mito-flag as salvage therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Onkologie*. 2001 Aug;24(4):356–60.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 1976; 33: 451.
11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med* 1985; 103: 626.
12. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Löwenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD; International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003 Dec 15;21(24):4642–9.
13. Pastore D, Specchia G, Carluccio P, Liso A, Mestice A, Rizzi R, Greco G, Buquicchio C, Liso V. FLAG-IDA in the treatment of refractory/relapsed acute myeloid leukemia: single-center experience. *Ann Hematol*. 2003 Apr;82(4):231–5
14. Virchis A, Koh M, Rankin P, Mehta A, Potter M, Hoffbrand AV, Prentice HG. Fludarabine, cytosine arabinoside, granulocyte-colony stimulating factor with or without idarubicin in the treatment of high risk acute leukaemia or myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2004 Jan;124(1):26–32.
15. Cornelissen JJ, van Putten WL, Verdonck LF, Theobald M, Jacky E, Daenen SM, van Marwijk Kooy M, Wijermans P, Schouten H, Huijgens PC, van der Lelie H, Fey M, Ferrant A, Maertens J, Gratwohl A, Lowenberg B. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? *Blood*. 2007 May 1;109(9):3658–66.

Адрес за контакти:

Бранимир Спасов
Клиника по хематология,
Национална специализирана болница за активно
лечение на хематологични заболявания,
ул. "Пловдивско поле" № 6, 1756 София
факс: +359 2 9701115
e-mail: branispasov@gmail.com

КЛИНИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРЕЖИВЯЕМОСТ НА ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕН СИНДРОМ.

ПРЕОЦЕНКА СПОРЕД WHO КЛАСИФИКАЦИЯТА, IPSS И WPSS

И. Мичева, В. Геров, Р. Рачев, Х. Върбанов, Н. Ставрев, Л. Герчева

Клиника по хематология към УМБАЛ „Света Марина“, Варна

CLINICAL CHARACTERISTIC AND OVERALL SURVIVAL OF PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME. REASSESSMENT ACCORDING TO WHO CLASSIFICATION, IPSS AND WPSS

I. Micheva, V. Gerov, R. Rachev, H. Varbanov, N. Stavrev, L. Gercheva

Clinic of Hematology, UMHAT "St. Marina", Varna

Резюме. Целта на проучването е да се представят FAB, WHO и IPSS разпределението, честотата на цитогенетичните аномалии, еволюцията в остра левкемия и преживяемостта на пациентите с миелодиспластичен синдром (МДС), диагностицирани и лекувани в клиниката в периода 2005-2010. Всички случаи са ревизирани и рекласифицирани, използвайки установените критерии и препоръки на Международната работна група по морфология на МДС. Проучването включва 81 пациента с МДС (43 мъже и 38 жени) със средна възраст 71 (от 20 до 88 години). Между пациентите 78 са с първичен и 3 с вторичен (след предхождаща химиотерапия) МДС. Според WHO критериите, разпределението на МДС пациентите е: RA-41.6%, RCMD-14.3%, RARS-5.2%, RAEB I-9.1%, RAEB II-15.6%, 5q синдром-5.2%, MDS/MPS-2.6%. Двама са с МДС и фиброза. Три случая покриват критериите за ОМЛ. Цитогенетично изследване е осъществено при 50.6% от пациентите, като при 36% са намерени нарушения в кариотипа: del-5q, -Y, del-20q, + 21, del-10q, +8, комплексен кариотип. Еволюция в остра левкемия (ОЛ) е наблюдавана при 21.3%, като 70.3% от тях са с RAEBI и RAEB II. IPSS е нисък при 32.5% от пациентите, среден-1-при 41.6%, среден-2-при 20.8% и висок-при 3.9%. Според WPSS, 6.5% от пациентите са с много нисък риск, 42.9%-нисък, 20.8%-среден, 24.7%-висок и 1.3%-много висок риск. Съществува корелация между групата риск и вероятността за развитие на остра левкемия. Медианата на преживяемост е 42.5 месеца за пациентите с 5q синдром, 21.5 месеца за RA, RCMD-28, RARS- 24.3, RAEBI-20.5, RAEBII-11.3, MPD/MDS-4, МДС с фиброза-9.5 месеца. Общата 5 годишна преживяемост е 5,0 %, като всички пациенти са с RA. Намерена е значима корелация между WHO, IPSS, WPSS и общата преживяемост.

Ключови думи: МДС, прогностичен индекс, преживяемост

Summary. The purpose of this study was to evaluate the incidence, FAB, WHO, IPSS, and WPSS distribution, frequency of cytogenetic abnormalities, evolution to AML and the overall survival of the patients diagnosed with MDS in the Hematology Department, University Hospital, Varna during the period 2005-2010. The MDS patient files at diagnosis and during the treatment period represented the primary database. All cases were revised and reclassified according to WHO classification, IPSS and WPSS, using the established theoretical criteria and the recommendation of the International Working Group on Morphology of MDS.

The study includes 81 patients with MDS (43 males and 38 females) with mean age of 71 and an age range between 20 and 88 years. 68.8% of the patients were at age between 60 and 80. Among patients 74 have a primary and 3 a secondary (treatment related) MDS. According to WHO criteria, the distribution of MDS was: RA-41.6%, RCMD-14.3%, RARS-5.2%, RAEBI-9.1%, RAEBII-15.6%, 5q syndrome-5.2%, MDS/MPS-2.6%. Two patients had fibrotic bone marrow. Three cases met the criteria for AML. Cytogenetic study was performed in 50.6% of patients and karyotype abnormalities were found in 36% of MDS cases. Del-5q, -Y, del-20q, + 21, del-10q, +8, complex karyotype were the abnormalities found in the group. Evolution to AML was documented in 21.3%, 70.3% of them with RAEBI and RAEBII. IPSS was low in 32.5% of the patients, Int-1 in 41.6%, Int-2 in 20.8% and high in 3.9%. According to WPSS 6.5% of the patients had very low risk, 42.9%-low risk, 20.8%-intermediate, 24.7%-high, and 1.3%-very high risk. There was a correlation between high IPSS and WPSS score and the probability to develop acute leukemia. The average survival was 42.5 months for 5q syndrome, 21.5 months for RA, RCMD-28, RARS- 24.3, RAEBI-20.5, RAEBII – 11.3, MPD/MDS-4,

MDS/fibrosis-9.5 months. At 5 years the overall survival was 6.4%. A significant correlation was found between WHO subtypes, IPSS and WPSS score and overall survival.

Keywords: MDS, prognostic score, survival

Въведение

Миелодиспластичните синдроми (МДС) представляват хетерогенна група от неопластични клонални заболявания на хемопоетичната стволова клетка. Характеризират се с костномозъчна недостатъчност, изразяваща се с цитопении в периферната кръв и процент на миелобласти в костния мозък до 19%. Рискът от трансформация в остра левкемия е голям и зависи главно от процента миелобласти в костния мозък при диагностицирането. МДС е заболяване на възрастните и по последни данни на SEER заболяемостта нараства от 5/100 000 за пациенти под 60 години до 36.2/100 000, при възраст над 80 години (1). От 1997 Международната прогностична скоринг система (IPSS) се превърна в златен стандарт за стратификация на риска и вземане на подходящо терапевтично решение (2). През 2001 Световната Здравна Организация (СЗО) формулира нова класификация на МДС, основаваща се на морфологичните белези на дисплазия в една или повече линии, броя миелобласти в костния мозък и цитогенетичния профил (3). През 2008г. е публикувана ревизираната версия, която в редица ретроспективни и проспективни проучвания доказва прогностична си значимост (4). Това дава основание да се дефинира нова, базирана на СЗО критериите прогностична скоринг система (WPSS), включваща СЗО подгрупата, нарушенията в кариотипа според IPSS, и трансфузионните нужди (5). Съществуват и други показатели, като LDH, които със своята прогностична значимост са кандидати за включване в score – системите (6). В IPSS пациентите са стратифицирани в 5 рискови групи с различна преживяемост и вероятност за левкемична еволюция, а цитогенетичните аномалии са разделени в три подгрупи. Първата е с нисък риск където се установява нормален кариотип, 5q-, 20q-, -Y. Третата група е с висок риск със следните цитогенетични нарушения -комплексен кариотип (≥ 3 аномалии), аномалии на 7 хромозома. Втората група е с интермедиерен риск и включва всички останали аномалии. В опит да се подобрят цитогенетичните основи за прогностичната оценка са събрани и анализирани три големи бази данни (GA, Spanish MDS registry, IMRAW) и предложени 4 прогностични подгрупи със статистически значима разлика в средната преживяемост - благоприятен: 5q-, 12p-, 20q-, +21, -Y, 11q-, t(11)(q23), нормален, 2 дефекта 5q- (MS 51мес), инт-1+1q,3q21/q26, +8, t(7q), +19, -21, други единични или двойни структурни и бройни дефекти

(MS 29мес), инт-2 -X, -7/7q-, комплексен кариотип -3 дефекта (MS 15.6мес), и неблагоприятен комплексен кариотип >3 дефекта (MS 5.9мес) (7).

Цел

Да се проучи клиничната характеристика, FAB, WHO и IPSS разпределението, честотата на цитогенетичните аномалии, еволюцията в остра левкемия и преживяемостта на пациентите с МДС, диагностицирани и лекувани в клиниката по клинична хематология към УМБАЛ „Света Марина“, Варна в периода 2005-2010 година.

Методи и пациенти

Всички пациенти, диагностицирани в клиниката в периода 2005-2010 г, бяха ретроспективно анализирани и оценени по анамnestични и физикални данни, кръвна картина, биохимия, костен мозък, флуоцитометрия, цитогенетика. Цитологичната диагноза бе поставена първоначално според FAB критериите. За да се рекласифицират случаите на МДС, според WHO класификацията бяха реанализирани костномозъчните аспирати на всички пациенти при диагнозата според критериите и препоръките на Международната работна група по морфология на МДС (8). За всички пациенти бяха определени IPSS и WPSS група риск. Статистическият анализ е осъществен с SPSS v17.0. За оценка на медианата на преживяемост е приложен методът на Kaplan-Meier с log rank test. Общата преживяемост (OS) е определена като времето от поставяне на диагнозата до смърт.

Резултати

В анализа са включени 81 пациента - 43 мъже и 38 жени със средна възраст 71г и възрастов диапазон от 20 до 88 г. Разпределени са в четири възрастови групи. Най-голям процент пациенти (68,8%) са в диапазона 60-79 г., 15,6% са над 80 г, 11,9% са между 40 и 59г, и само 9,0% - под 39 г. От тях 78 са с първичен и 3 с вторичен МДС (след предхождаща химиотерапия). При 67 пациенти е провеждана заместителна терапия, 2 са отговорили на лечение с растежни фактори, при 9 от случаите е провеждана химиотерапия (7+3, TAD, 6-MP, Azacytidine, Cytarabine-ниски дози), а 5 са без терапия и се проследяват. Най-честите усложнения са инфекции и хеморагии. При двама от пациентите е диагностицирана пароксизмална нощна хемоглобинурия, а при други двама - втора неоплазия.

1a)

фиброза. Три случая покриха критериите за ОМЛ.



(6)

Цитогенетичен анализ.

Разпределението според цитогенетичния риск,

3.4% и висок - 3.4%.



(6)

Рискови групи

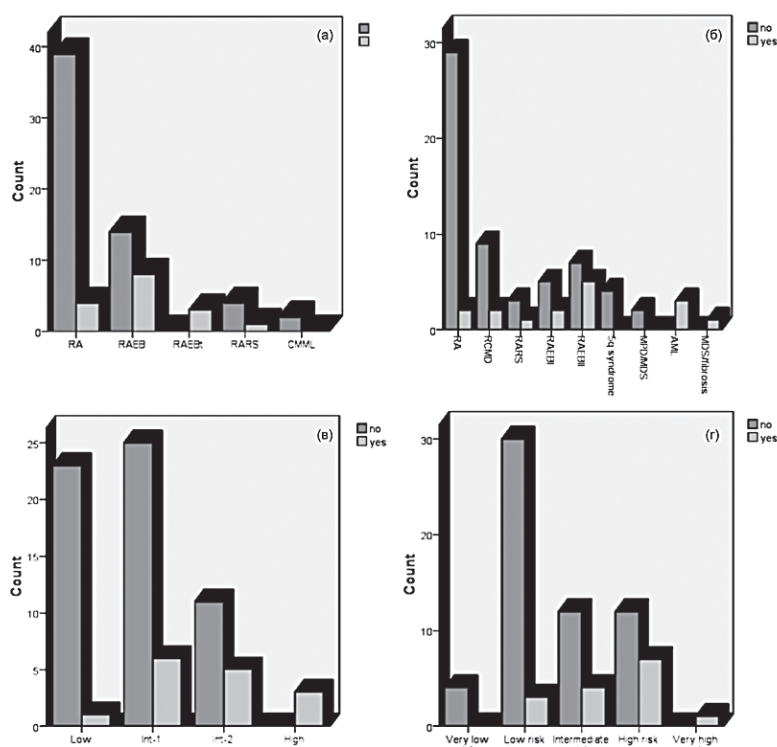
Според IPSS пациентите бяха разпределени в четири групи : с нисък риск - 32.5%, среден-1- 41.6%, среден-2- 20.8% и висок риск- 3.9% (Фиг 1в). Като се взе под внимание подтипа МДС според СЗО класификацията, нарушенията в кариотипа според IPSS, и трансфузионните нужди, бе определен риска по WPSS. Пациентите са разпределени в пет групи. С много нисък риск са 6.5%, с нисък-42.9%, със среден-20.8%, с висок-24.2%, и с много висок-1.3% от пациентите (Фиг.1г).

Трансформация в остра левкемия (ОЛ) според подтипа МДС и групата риск според IPSS и WPSS.

Еволюция в ОЛ е наблюдавана при 21.3% от пациентите. Съществува статистически значима корелация между подтипа МДС според FAB и вероятността за развитие на остра

левкемия ($p < 0.0001$). Всички случаи с РАЕБ-т и 42% от тези с РАЕБ са еволюирали в ОМЛ. Трансформиралите в групата с РА са само 10%. Подобна статистически значима зависимост бе установена между трансформацията в ОМЛ и подтипа според СЗО класификацията ($p = 0.003$). Трансформацията в ОЛ корелира също и с групата риск според IPSS ($p = 0.001$) и според WPSS ($p = 0.002$). 100% от пациентите с висок риск, 31.3% от тези със среден-2, 13.4% от тези със среден-1 и 4% от пациентите с нисък риск са развили остра левкемия (Фиг.3)

Нивото на ЛДХ при диагностицирането се явява независим прогностичен критерий за пациентите с МДС. Ние установихме по-висок риск от трансформация в ОМЛ при пациентите с повишено ниво на ЛДХ при диагностицирането, но без статистическа значимост ($p = 0.183$).



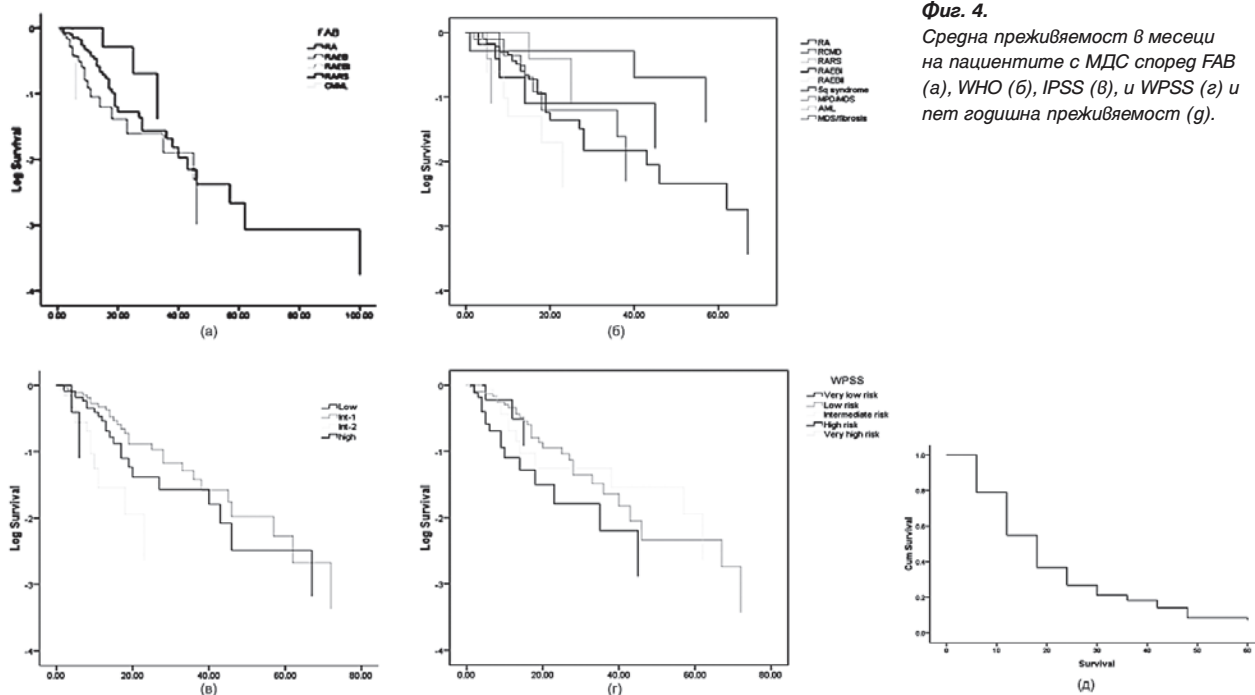
Фиг. 3. Еволюция в остра левкемия според FAB (а), WHO (б), IPSS (в), и WPSS (г).

Анализ на преживяемостта

Установи се сигнификантна разлика ($p = 0.01$) в медианата на преживяемост (МП) между различните FAB подтипове (Фиг.4). При РА МП е 22.9м., при РАЕБ- 16.5м., при РАЕБ-т-7.0м., при РАРС-35.0м., и при ХММЛ-4.0м.

Не бе установена значима разлика в МП между субтиповете по СЗО Най-дълга е преживяемостта при пациенти с 5q синдром (42.5м.), а най- ниска- при РАЕБ-II (11.3м.) , МДС с фиброза (9.5м.) и МДС/МПС (4.0м.).

Установи се статистически значима разлика в МП на пациентите с различен риск според IPSS ($p = 0.001$). МП в групата с нисък риск е 21. 7м., среден-1- 27.2м., среден-2- 10.3м. и висок риск- 6.6м. Не бе намерена сигнификантна разлика в преживяемостта на различните възрастови групи ($p = 0.185$), с изключение на пациентите под 39г. където МП е 70м. Пет годишната обща преживяемост в анализиранията група е 6.4%.



Фиг. 4.

Средна преживяемост в месеци на пациентите с МДС според FAB (a), WHO (б), IPSS (в), и WPSS (г) и пет годишна преживяемост (г).

Обсъждане

Проведеният анализ установи, че WHO, IPSS, WPSS разпределят пациентите с МДС в диагностични категории с голяма прогностична информативност. Установи се значението на WHO подтипа, IPSS и WPSS скоринга за риска от трансформация в остра левкемия и общата преживяемост. Данните от нашия анализ са съпоставими с резултатите от Dusseldorf MDS registry и тези, публикувани от Greenberg (2).

Най-широко използваната в клиничната практика прогностична скоринг система е IPSS - все още е златен стандарт в определянето на риска при МДС. Възникналите с годините ограничения, като неприложимост при вторичен или вече лекуван МДС, неотчитане на степента на периферна цитопения, ограничения брой кариотипи, се оказаха стимул за редица изследователи да предложат нови стратификационни системи. Бетърсено прогностичното значение на различни биомаркери като фиброзата в костния мозък и високите серумен феритин. Така възниква предложението за WPSS (5). Този модел отчита не само новата СЗО класификация, но и трансфузионните нужди, като осигурява динамична прогностична информация не само при диагностицирането, но и в хода на заболяването. Не по-малко интересен е и предложението от

Kantarjian H, et al. модел (9), който се базира на определени чрез мултивариационен анализ рискови фактори с прогностично значение: влошено общо състояние, напреднала възраст, тромбоцитопения, анемия, повишен брой бласти в костния мозък, левкоцитоза, аномалии на хромозома 7 или комплексен кариотип, трансфузионна зависимост.

Последната прогностична скоринг система - ревизираната IPSS (R-IPSS е публикуваната през 2012 г. (10). За разлика от IPSS, новата система включва 5, вместо 3 цитогенетични прогностични групи (Schanz et al (11), отчита ниския процент бласти и тежестта на цитопениите. Тази система интегрира различни клинични параметри в метод, анализиращ прогнозата на пациентите с МДС много по-точно от IPSS.

Заклучение

Въвеждането в клиничната практика на новата класификация и прогностични модели за оценка на риска дават възможност за точно диагностициране и стадиране на пациентите с МДС, респективно за правилен и риск-адаптиран терапевтичен избор.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Rollison DE, Howlader N, Strom SS, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*, 2008 1;112(1):45-52.
2. Greenberg P, Cox C, Le Beau MM et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-88.
3. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-2302.
4. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition EDS
5. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2007; 25(23):3503-10.
6. Germing U, Hildebrandt B, Pfeilstöcker M, et al. Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia* 2005;19(12):2223-31.
7. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110(13):4385-95.
8. P. Valent, H. Horny, J. Bennett, et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference, 2007; 31(6):727-36.
9. Kantarjian H, O'Brien S, Ravandi F, et al. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. *Cancer* 2008; 113(6):1351-61.
10. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012; 120(12):2454-65.
11. Schanz J, Tuechler H, Sole F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol* 2012; 30:820-29

Адрес за кореспонденция:

Илина Мичева
МБАЛ „Света Марина“
Клиника по Хематология
Ул. „Христо Смирненски“ 1
Варна, 9010
ilinamicheva@gmail.com
Тел: 0896 262300

ПРОГНОСТИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ВЪТРЕШНИТЕ ТАНДЕМНИ ДУПЛИКАЦИИ НА ГЕНА НА FMS-ПОДОБНА ТИРОЗИН КИНАЗА 3 (FLT3-ITD) ПРИ ПАЦИЕНТИ С ОСТРИ МИЕЛОИДНИ ЛЕВКЕМИИ ПОД 60-ГОДИШНА ВЪЗРАСТ

Б. Спасов¹, Г. Балаценко³, П. Ганева¹, М. Генова², Св. Ангелова³,
Ст. Тошков³, Г. Михайлов¹

¹ Отделение по клинична хематология, ²Лаборатория по хематопатология и имунология,

³ Лаборатория по цитогенетика и молекулярна биология,

Национална специализирана болница за активно лечение на хематологичните заболявания, София

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INTERNAL TANDEM DUPLICATIONS OF FMS-LIKE TYROSIN KINASE 3 GENE (FLT3-ITD) IN PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIAS UNDER 60 YEARS OF AGE

B. Spassov¹, G. Balatzenko³, P. Ganeva¹, M. Guenova², S. Angelova³,
S. Toshkov³, G. Michailov¹

¹ Department of Clinical Hematology, ² Laboratory of Haematopathology and Immunology,

³ Laboratory of Cytogenetics and Molecular Biology,

National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

Резюме: Вътрешните тандемни дупликации на гена на FMS-подобната тирозин киназа 3 (FLT3-ITD) са най-честите молекулярни аномалии при пациенти с остри миелоидни левкемии (ОМЛ), които се срещат при около 20-30% от случаите. Тези генетични аномалии се срещат в значителна степен при ОМЛ-пациенти с интермедиерен цитогенетичен риск, което позволява да се прецизира прогнозата при част от случаите. Тъй като в нашата страна липсват системни наблюдения, целта на настоящото проучване е да се оцени прогностичното значение на FLT3-ITD по отношение на постигане на пълна ремисия (ПР), продължителност на обща преживяемост (ОП) и преживяемост, свободна от заболяване (ПСЗ) при пациенти с ОМЛ под 60-годишна възраст. Бяха изследвани 71 пациенти с ОМЛ и интермедиерен цитогенетичен риск на възраст между 19 и 59 години. Наличието на FLT3-ITD беше установено при 40,8% (29/71) от изследваните болни. При пациенти с FLT3-ITD беше установен по-висок брой левкоцити ($p < 0,001$), по-висок % бласти в костния мозък ($p = 0,009$) и периферната кръв ($p < 0,001$), както и по-високо ниво на LDH ($p = 0,016$). При пациенти с FLT3-ITD, ПР беше постигната значително по-трудно ($p = 0,014$) и беше наблюдавана тенденция на по-висока честота на индукционна смъртност ($p = 0,056$). При тези болни беше установена значително по-краткотрайна ОС ($p < 0,001$) и ПСЗ ($p = 0,001$). Наличието на FLT3-ITD има неблагоприятно прогностично значение при пациенти с ОМЛ, като установяването на този маркер към момента на диагнозата е от съществено значение за интензифициране на индукционната и постремисионната терапии, както и за бързото включване на тези болни в трансплантационни програми.

Ключови думи: остра миелоидна левкемия, FLT3-ITD

Abstract: The internal tandem duplications of FMS-like tyrosine kinase 3 gene (FLT3-ITD) are the most frequent molecular abnormalities in acute myeloid leukemia (AML) patients that are present in 20-30% of the cases. These genetic aberrations are found in AML patients with intermediate cytogenetic risk. The aim of the present study is establish the prognostic significance of FLT3-ITD regarding complete remission (CR) rate, overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) in AML patients under 60 years of age. The clinical follow up was carried out upon 71 AML patients with intermediate cytogenetic risk, aged 19-59. FLT3-ITD was present in 40.8% (29/71) of the patients and was associated with higher leukocyte count ($p < 0,001$), higher percentage of bone marrow ($p = 0,009$) and peripheral blood blast cells ($p < 0,001$), and higher LDH level ($p = 0,016$). The presence of FLT3-ITD was associated with lower CR rate ($p = 0,014$) and had a borderline association with higher induction death rate ($p = 0,056$). OS ($p < 0,001$) and DFS ($p = 0,001$) were significantly shorter for AML patients with FLT3-ITD. The presence of FLT3-ITD has an unfavorable prognostic significance in AML patients and the establishment of the molecular marker is of great significance for intensification of the

ВЪВЕДЕНИЕ

Острата миелоидна левкемия (ОМЛ) е клонално, малигнено заболяване на хематопоеичната тъкан, което се характеризира с пролиферация на патологични бласти, предимно в костния мозък и нарушено образуване на нормални кръвни клетки. Кариотипът към момента на диагнозата е един от най-важните прогностични фактори при пациенти с ОМЛ (Byrd et al, 2002; Mrozek et al, 2004), като при 40-50% от тези болни не се установяват клонални хромозомни аберации. Понастоящем тези пациенти се включват в групата на интермедиерния цитогенетичен риск, въпреки че тази група болни е много хетерогенна. Това налага откриване на нови молекулярни маркери с цел по-добро стратифициране на пациентите с ОМЛ и интермедиерен цитогенетичен риск. Особено перспективни в тази насока са генетични аберации с висока честота на разпространение.

FMS-подобната тирозин киназа 3 (FLT3) се експресира предимно върху хематопоеичните прогениторни клетки и участва в множество вътреклетъчни сигнални пътища, които играят важна роля в диференциацията и пролиферацията на стволовите клетки (McKenna et al, 2000). Генът, кодиращ синтезата на FLT3, е разположен върху дългото рамо на 13-та хромозома (13q12) и се състои от 24 екзона.

Вътрешните тандемни дупликации на FLT3 (FLT3-ITD) са молекулярни аномалии, които засягат FLT3 и се срещат при около 20-30% от болните с остри миелоидни левкемии (ОМЛ) – Rombouts et al, 2000; Kottaridis et al, 2001; Fröhling et al, 2002. Тези мутации се локализируют предимно в 14 и 15-ти екзон на гена и се установяват най-често при пациенти с ОМЛ и интермедиерен цитогенетичен риск (Rombouts et al, 2000). Въпреки че според някои изследователски екипи наличието на FLT3-ITD има неблагоприятно прогностично значение (Kottaridis et al, 2001; Fröhling et al, 2002), други автори не подкрепят тези данни (Boissel et al, 2002). Тъй като понастоящем липсват данни от системно проучване за честотата на FLT3-ITD при български пациенти, целта на настоящото проучване е да се оцени прогностичното значение на този молекулярен маркер по отношение постигане на пълна ремисия (ПР), продължителност на обща преживяемост (ОП) и преживяемост, свободна от заболяване (ПСЗ) при пациенти с ОМЛ и интермедиерен цитогенетичен риск под 60-годишна възраст.

МЕТОДИ

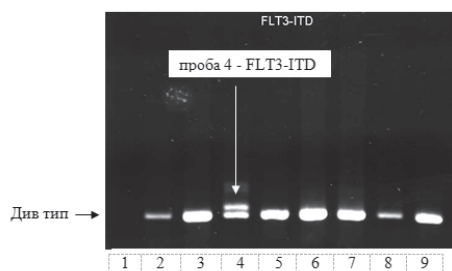
Пациенти

В настоящото проучване са включени 71 пациенти с ОМЛ, диагностицирана съгласно критериите на Френско-Американско-Британска (ФАБ) класификационна система (Bennett et al, 1976; Bennett et al, 1985). Двама от пациентите (2,8%) страдаха от ОМЛ, развила се на базата на предшестваш миелодиспластичен синдром (МДС), докато при останалите болни (97,3%) беше установена де novo ОМЛ. Заболелите индивиди са лекувани в Националната болница за активно лечение на хематологични заболявания (НСБАЛХЗ) – София в периода между м. септември 2003 г. и м. декември 2012 г. Всички болни са на възраст между 19 и 59 години, в добро общо състояние [Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) score ≤ 2], без органна недостатъчност. Пациенти с ОМЛ-М3 (съгласно ФАБ) са изключени от това проучване.

Цитогенетичен и молекулярно-биологичен анализи

Хромозомният и молекулярно-биологичният анализ към момента на поставяне на диагнозата бяха проведени в лабораторията по цитогенетика и молекулярна биология към НСБАЛХЗ, съгласно утвърдени стандартни оперативни протоколи. Хромозомните аномалии бяха представени в съответствие с препоръките на International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2009). Наличието на интермедиерен цитогенетичен риск беше определено съгласно критериите, предложени от Grimwade et al, 2010.

Успоредно с цитогенетичния анализ беше проведена и обратно транскриптазна полимеразно-верижна реакция (RT-PCR) за установяване наличието на FLT3-ITD (Фиг.1).



Проба 1 представлява отрицателна контрола, докато проби 2-9 са получени от различни пациенти с ОМЛ. Високо-молекулярният банд в проба 4 представлява FLT3-ITD (мутирал ген FLT3). При същия болен беше установена и експресия на нормалния ген FLT3.

Фиг. 1 RT-PCR амплификация на FLT3 и FLT3-ITD при пациенти с ОМЛ

Изследване наличието на FLT3-ITD беше осъществено съгласно протокола, предложен от Nakao et al, 1996. Пет микролитра кДНК бяха подложени на амплификация в 25 µl реакционна среда, която съдържа: 1 x PCR буфер; 1,5 mM MgCl₂; 0,8 U Taq полимераза (ABgene, Epsom, UK); 200 µM от всяко dNTP (Promega) и по 0.4 pM от следните праймери: R5, 5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3' и R6, 5'-ATC-CTAGTACCTTCCCAAACCTC-3'. PCR-реакцията беше проведена в термосайкълър Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) при следните температурни режими: [1] Начална денатурация в продължение на 5 минути при 94°C, [2] 37 цикъла на амплификация: денатурация при 94°C в продължение на 60 секунди; хибридизация при 59°C в продължение на 60 секунди; екстензия при 72°C в продължение на 60 секунди и [3] Финална екстензия: 72°C в продължение на 10 минути. Продуктите на реакцията бяха анализирани чрез електрофореза в 2.5% агарозен гел (Amresco, Solon, OH, USA), оцветен с етидиев бромид, и визуализирани с ултравиолетова светлина.

Цитостатична терапия

Индукционното лечение на пациентите с ОМЛ включваше прилагане на един или два курса - комбинация на Цитозин-арабинозид (Cytosar – 100 mg/m²/ден; в продължение на пет или седем дни; двукратно на ден в продължение на 3 часа); антрациклинов антибиотик – Idarubicin (12 mg/m²/ден), Flomurubicin (45 mg/m²/ден) или Mitoxantrone 10 mg/m²/ден в продължение на два или три дни]; с или без приложение на Etoposide (100 mg/m²/ден); в продължение на три или пет дни). При болните с ОМЛ, резистентна на конвенционалната индукционна терапия (n=27), беше проведено високодозово индукционно лечение с различни „спасителни“ терапевтични курсове: FLAG, IDA-FLAG, MITO-FLAG, HAM или интермедиерни дози Cytosar в комбинация с Митоксантрон (Hänel et al, 2001; Heil et al, 2002; Hiddemann et al, 1990). Пациенти, при които не беше постигната пълна ремисия след индукционна терапия (стандартна и високодозова), бяха проследявани само по отношение на общата преживяемост. Консолидираща терапия беше проведена при па-

циентите с постигната пълна ремисия и включваше прилагане на интермедиерни или високи дози Цитозар (Mayer et al, 1984). При девет от пациентите (14,3%) беше осъществена трансплантация на хемопоеетични стволови клетки (СКТ).

Критерии за терапевтичен отговор

Състоянията на пълна ремисия и рецидив бяха дефинирани съгласно критериите, предложени от Cheson et al, 2003. Общата преживяемост (OS) е изчислена от датата на диагностициране на заболяването до датата на настъпване на летален изход на пациента по каквато и да е причина или до датата на последния контролен преглед на пациента. Преживяемостта, свободна от заболяване (DFS), е изчислена от датата на постигане на пълна ремисия до настъпване на рецидив или летален изход на пациента по каквато и да е причина или до датата на последния контролен преглед на пациента.

Статистически методи

Статистическата обработка на получените резултати е извършена с помощта на готови програмни продукти Microsoft Excel 2007 и SPSS for Windows, версия 13 (Chicago, IL, USA). Крайната дата на статистическото наблюдение на болните беше 24 януари 2013 година. За сравнение на разпределението на дискретните клинични и биологични характеристики на изследваните подгрупи болни беше използван Fisher's exact test. За сравнение на разпределението на непрекъснати величини между двете групи заболяли беше приложен непараметричен анализ по метода на Mann Whitney's U test. Кривите за OS и DFS бяха изчислявани по метода на Kaplan-Meier, като различията между отделните групи пациенти статистически бяха оценени чрез log rank теста. За ниво на статистическа значимост бе приета p-value <0,05.

РЕЗУЛТАТИ

Наличието на FLT3-ITD беше установено при 40,8% (29/71) от изследваните болни с ОМЛ. Характеристиките на пациентите, при които се установява молекулярният маркер [FLT3-ITD (+) пол] и тези, при които липсва молекулярната аберация [FLT3-ITD (-) отр], са представени в табл.1.

Табл. 1 Сравнителен анализ на лабораторните показатели:

FLT3-ITD (-) omp. vs FLT3-ITD (+) пол. пациенти			
Показател	FLT3-ITD (-) (n=42)	FLT3-ITD (+) (n=29)	Статистическа значимост (p)
Мъжки пол %	61,9	44,8	ns [#]
Възраст (год.)	49,5	49	ns
Левкоцити (Г/л)	7,5	63,3	<0,001
Хемоглобин (гр/л)	91,65	88	ns
Тромбоцити (Г/л)	60	73	ns
ЛДХ (Е/л)	439	865	0,016
% бласти в костния мозък	69,25	88	0,009
% бласти в периферната кръв	43	72	<0,001

[#] ns – несигнификантна стойност

Медианната стойност на левкоцитния брой при FLT3-ITD(+) пациенти беше значително по-висока в сравнение с останалите болни (63,3 Г/л vs 7,5 Г/л; $p<0,001$). Значително по-ниска медианна стойност на лактатдехидрогеназа (ЛДХ) беше установена при FLT3-ITD (-) болни (439 Е/л vs 865 Е/л; $p=0,016$). При пациентите с наличие на молекулярния маркер беше установена значително

по-висок % бластни клетки в периферната кръв (72% vs 43%; $p<0,001$) и костния мозък (88% vs 69,25%; $p=0,009$).

Не бяха наблюдавани статистически значими различия във възрастта, пола, тромбоцитния брой и нивото на хемоглобина между отделните групи пациенти.

Табл. 2 Сравнителен анализ на терапевтичните резултати:

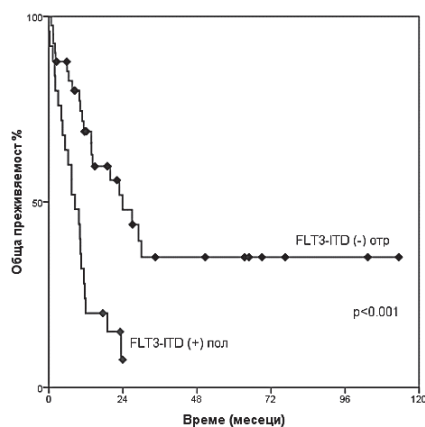
FLT3-ITD (-) vs FLT3-ITD (+) пациенти

Показател	FLT3-ITD (-) (n=42)	FLT3-ITD (+) (n=29)	Статистическа значимост (p)
Пълна ремисия %	69 (29/42)	37,9 (11/29)	0,014
Високодозна индукционна терапия %	33,3 (14/42)	55,2 (16/29)	0,088
Резистентна левкемия %	26,2 (11/42)	41,4 (12/29)	ns [#]
Индукционна смъртност %	4,8 (2/42)	20,7 (6/29)	0,056

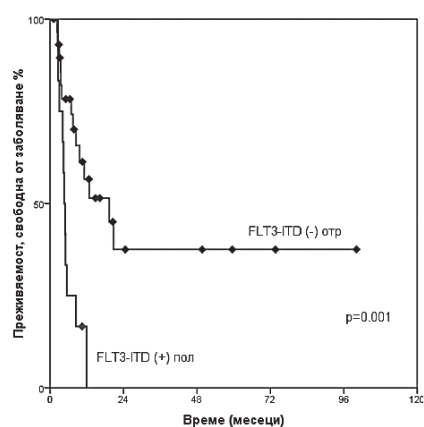
[#] ns – несигнификантна стойност

ПР беше постигната значително по-често при FLT3-ITD (-) отр. пациенти (69% vs 37,9%; $p=0,014$) (Табл. 2). Беше наблюдавана тенденция към по-висока честота на индукционна смъртност при пациентите с наличие на FLT3-ITD (20,7% vs 4,8%; $p=0,056$), както и тенденция към по-често прилагане на високодозна индукционна терапия при

FLT3-ITD (+) пол. болни (33,3% vs 55,2%; $p=0,088$). При FLT3-ITD(+) пол. пациенти беше установено достоверно по-краткотрайна ОП (8,4 месеца vs 23,9 месеца; log rank $p<0,001$) и ПСЗ (4,5 месеца vs 19,3 месеца; log rank $p=0,001$) (фиг 2,3).



Фиг. 2 Обща преживяемост при пациенти с ОМЛ [FLT3-ITD (-) vs FLT3-ITD (+)]



Фиг. 3 Преживяемост, свободна от заболяване при пациенти с ОМЛ, [FLT3-ITD (-) vs FLT3-ITD (+)]

ОБСЪЖДАНЕ

В настоящото проучване беше установено, че честотата на FLT3-ITD сред българските пациенти с ОМЛ и интермедиерен цитогенетичен риск е 40,8% към момента на диагнозата. Нашите данни показват незначително по-висока честота на молекулярната аберация в сравнение с резултатите от английски (34%), германски (32%) и френски (35%) изследователски екипи (Kottaridis et al, 2001; Fröhling et al, 2002; Boissel et al, 2002). Това най-вероятно се дължи на относително по-ниския брой изследвани пациенти в настоящото проучване, както и на включването на пациенти с други хромозомни аберации, характерни за интермеди-

ерния цитогенетичен риск.

Ние установихме, че при FLT3-ITD (+) пол. пациенти се установява значително по-често повишен левкоцитен брой, повишено ниво на ЛДХ, по-висок % бластни клетки в костния мозък и периферната кръв, като нашите данни потвърждават резултатите на други автори (Fröhling et al, 2002). Тези данни могат да бъдат частично обяснени с факта, че FLT3-ITD активира различни сигнални молекули, като митоген активирания протеин (MAP), STAT5 и серин-треониновите кинази Akt, които имат важна роля в процесите на клетъчна пролиферация (Hayakawa et al, 2000; Rosnik et al, 2006).

Подобно на други изследователски колективи (Rombouts et al, 2000) не беше установена корелация между FLT3-ITD статуса и пола и възрастта на пациентите.

Според някои предишни проучвания наличието на FLT3-ITD няма прогностично значение за постигането на ПР и продължителността на ОП (Boissel et al, 2002; Whitman et al, 2001). Други изследователски екипи установяват неблагоприятно прогностично значение на FLT3-ITD по отношение на постигане на ПР и продължителността на ОП и ПСЗ (Kottaridis et al, 2001; Fröhling et al, 2002). Различията в постигнатите терапевтични резултати най-вероятно се дължат на различните дози Цитозар, приложени в хода на лечение на пациентите. Изследователският екип от ALFA-9000 е използвал значително по-ниска обща кумулативна доза на Цитозар 4700-6300 мг/м² (Boissel et al, 2002) в сравнение с изследователите от AMLSG, които са прилагали Цитозар в кумулативни дози 38000-50000 мг/м² (Fröhling et al, 2002) при пациентите с ОМЛ. Тези данни показват, че прилагането на повтарящи се консолидиращи курсове с високи дози Цитозар води до значително удължаване на ОП и ПСЗ при FLT3-ITD (-) отр. пациенти с ОМЛ, което вероятно е и причината за изразените различия между FLT3-ITD (+) пол. и FLT3-ITD (-) отр. болни. За съжаление, най-вероятно използването на високи дози не променя прогнозата при пациенти с наличие на FLT3-ITD.

Нашите данни показват, че наличието на FLT3-ITD има неблагоприятно прогностично значение към момента на диагнозата. При пациентите, които са FLT3-ITD (+) пол., се постига значително по-рядко пълна ремисия и продължителността на ОП и ПСЗ са достоверно по-краткотрайни. Освен това, при пациенти с наличие на този молекулярен маркер се установява тенденция към по-често настъпване на индукционна смърт и по-често използване на високодозова индукционна терапия.

В заключение, наличието на FLT3-ITD има неблагоприятно прогностично значение към момента на поставяне на диагнозата при пациенти с ОМЛ и интермедиерен цитогенетичен риск. Това налага включване на FLT3-ITD към цялостния диагностичен панел на пациентите с ОМЛ към момента на диагнозата с цел по-добро стратифициране на болните с интермедиерен цитогенетичен риск, интензифициране на индукционната и консолидираща терапия и бързо включване FLT3-ITD (+) пациенти в трансплантационни програми.

Благодарности и коментари:

Изследванията бяха осъществени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни изследвания“ към Министерството на образованието и науката (договор № Д 02-35/2009).

БИБЛИОГРАФИЯ

1. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood*. 2000;95: 3489-3497.
2. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98:1752-1759.
3. Rombouts, W. J. C., Blokland, I., Löwenburg, B., and Ploemacher, R. E. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the *Flt3* gene. *Leukemia*, 14: 675–683, 2000.
4. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010 Jul 22;116(3):354-65.
5. Hiddemann W, Schleyer E, Uhrmeister C, Aul CH, Maschmeyer G, Heinecke A, Büchner T. High-dose versus intermediate-dose cytosine arabinoside in combination with mitoxantrone for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia—preliminary clinical and pharmacological data of a randomized comparison. *Cancer Treat Rev*. 1990 Sep;17(2-3):279-85.
6. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, et al. Intensive post-remission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1994;331(14): 896-903.
7. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996 Dec;10(12):1911-8.
8. Cheson BD, et al; International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003 Dec 15;21(24):4642-9.
9. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002;100:4325-36.
10. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115-36.

11. Boissel N, Cayuela JM, Preudhomme C, Thomas X, Grardel N, Fund X, Tigaud I, Raffoux E, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Castaigne S, Fenaux P, Dombret H. Prognostic significance of FLT3 internal tandem repeat in patients with de novo acute myeloid leukemia treated with reinforced courses of chemotherapy. *Leukemia*. 2002 Sep;16(9):1699-704.
12. Fröhling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, Döhner H, Döhner K; AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4372-80.
13. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, Naoe T. (2000): Tandem duplicated *FLT3* constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3- dependent cell lines. *Oncogene* 19:624-631.
14. Rocnik JL, Okabe R, Yu JC, Lee BH, Giese N, Schenkein DP, Gilliland DG. (2006) : Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 108:1339-1345.
15. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, Carroll AJ, Mrózek K, Vardiman JW, George SL, Kolitz JE, Larson RA, Bloomfield CD, Caligiuri MA. (2001): Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res.*, 61:7233-9.

Адрес за контакти:

Бранимир Спасов
Клиника по хематология,
Национална специализирана болница за
активно лечение на хематологични заболявания,
ул."Пловдивско поле" № 6, 1756 гр. София
branispasov@gmail.com
факс: +35929701115

ТРОМБОФИЛНА ДИАТЕЗА ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС СОЛИДНИ ТУМОРИ: VTE SCORE, КЛИНИЧНИ И ПРОГНОСТИЧНИ КОРЕЛАЦИИ

Е. Белева, Ц. Пейчева, В. Попов, Ж. Грудева

Клиника по Онкология и Хематология, УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив

Медицински Университет - Пловдив

THROMBOPHILIC DIATHESIS IN PATIENTS WITH SOLID TUMORS: VTE SCORE, CLINICAL AND PROGNOSTIC IMPLICATIONS

E. Beleva, C. Peicheva, V. Popov, J. Grudeva

Clinic of Oncology and Hematology, University Hospital “St. George” – Plovdiv

Medical University – Plovdiv

Резюме. **Увод:** Малигненият процес е един от най-честите преграждащи фактори за придобита тромбофилия. Приблизително 0.8-8% от пациентите с онкологични заболявания изживяват клинично тромбоза в хода на заболяването. **Цел** на изследването е да се оцени рискът от изява на венозен тромбоемболизъм (VTE) при онкологични пациенти въз основа на валидирана скала (VTE score) и да се установят клиничните и прогностични корелации. **Материал и методи:** Ретроспективно са анализирани 477 пациенти със солидни тумори, лекувани в Клиника по Онкология и Хематология, УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, за периода 2009-2012 г. Регистрирани са новопоявилите се случаи на тромбоемболична болест (ТЕБ) и случаите с предшестваща анамнеза. За оценка на риска от VTE в хода на химиотерапия е използвана валидирана оценъчна скала – VTE score като за всеки пациент рискът е калкулиран индивидуално. **Резултати:** Новите случаи на ТЕБ в хода на лечението са общо 31 (6,5%). Няма разлика в разпределението им по пол и възраст >60 г. ($p=0.21$, $p=0.50$). Случаите на ТЕБ, изявили се в хода на системната химиотерапия са 25, като най-много са регистрирани след първи ($n=7$) и четвърти ($n=7$) химиотерапевтичен курс. Установява се, че химиотерапията не повлиява съществено честотата на изява на ТЕБ ($p=0.20$). Няма разлика в честотата на изява на ТЕБ според стадия на заболяването ($p=0.39$). Полът влияе съществено върху разпределението на пациентите според VTE score: в групата с нисък риск преобладават жените ($\chi^2= 12.984$, $p= 0.002$), докато възрастта не оказва влияние ($p=0.13$). **Дискусия:** Имайки предвид, че локализацията на туморния процес влияе на честотата на ТЕБ, следва да се обмисли хипотезата за протромботичния фенотип като „специфичен“ феномен при определени туморни локализации. Като потенциални кандидат-биомаркери за VTE при онкологични пациенти могат да се обсъждат P-selectin, тъканен фактор (ТФ), микрочастици, експресиращи ТФ и протромбиновите фрагменти 1+2. С оглед индивидуализиран подход за профилактика и терапия на ТЕБ при малигнени заболявания е уместно обсъждане на панел хемостазни биомаркери в клиничната практика, които отразяват специфично настъпилите нарушения.

Ключови думи: тромбоемболична болест, солидни тумори, тромботичен риск, хемостазни биомаркери

Summary. Introduction: Cancer is one of the commonest causes for acquired thrombophilia. Approximately 0.8-8% of all cancer patients develop thrombosis during the disease course. Aim of study is to evaluate the VTE risk among cancer patients utilizing a validated risk predictive model (VTE score) and to determine the clinical and prognostic implications. **Material and methods:** Retrospective analysis was performed on 477 patients with solid tumors, who were treated at the Clinic of Oncology and Hematology, University Hospital “Sv. Georgi” EAD, in the period 2009-2012. New cases with thromboembolic disease (TED), as well as those with positive history for TED were registered. VTE risk was assessed individually for each patient on the basis of a recently validated predictive model for VTE in cancer patients. Statistics analysis was performed on SPSSv.20 for Windows. **Results:** A total of 31 new TED cases were registered with no significant difference in distribution according to sex and age > 60 years ($p=0.21$, $p= 0.50$). During systemic polychemotherapy 25 TED cases occurred, mostly after the first ($n=7$) and the fourth ($n=7$) course of systemic treatment. Administration of chemotherapy did not associate with TED incidence ($p=0.20$). There was no significant association between TED incidence and disease stage ($p=0.39$). According to VTE risk score high risk patients comprised 10 % ($N=46$), intermediate risk patients – 46% ($N=222$) of the patients population. Distribution of patients according to VTE risk profile did not associate with age ($p=0.13$), while a significant female preponderance

was observed in the low risk group ($\chi^2 = 12.984$, $p = 0.002$). **Discussion:** Considering the fact that site of disease is significantly associated with TED incidence, one could argue that procoagulant phenotype reflects “specific” properties of certain tumors. Under investigation is the potential role of P-selectin, tissue factor (TF), microparticles, bearing TF and prothrombin fragments 1+2 as candidate biomarkers for VTE occurrence in cancer patients. In order to individualize prophylaxis and therapy of TED among cancer patients the introduction of novel specific hemostatic biomarkers into clinical practice is justified.

Key words: thromboembolic disease, solid tumors, VTE risk, hemostatic biomarkers

Въведение

Малигненият процес е един от най-честите предразполагащи фактори за придобита тромбоза. Приблизително 0.8-8% от пациентите с онкологични заболявания изявяват клинична тромбоза в хода на заболяването (11). Пациентите с идиопатична тромбоза са изложени на 12 пъти по-висок риск за развитие на злокачествено новообразоване в следващите 6-12 месеца от диагнозата спрямо тромбоза при известни причини (1). Повишеният потенциал за кръвосъсирване се определя от патогенетични механизми, интимни за туморния процес. В контекста на триадата на Вирхов хемостазният дисбаланс се причинява от: 1) нарушена ендотелна хомеостаза поради: свръхекспресия на прокоагуланти (тъканен фактор) и проангиогенни фактори (VEGF, bFGF), дисрегулация на ангиопоетин/Tie2 рецепторната система, понижена експресия на вещества с антикоагулантни свойства (тромбомодулин); 2) секреция на прокоагулантни субстанции от туморните клетки (тъканен фактор, цистеинпротеиназа); 3) инфилтриращи/компресиращи съдовата стена туморни маси (10).

В допълнение, терапевтични фактори потенцират склонността към хиперкоагулация: наличие на централен венозен достъп, приложение на цитостатици, антиангиогенна терапия, лъчелечение, имобилизация и др. (6). Тромбоемболичната болест (ТЕБ) е водеща причина за морбидност и смъртност сред онкологичните пациенти. Възможността да се идентифицират пациентите с повишен риск за изява на ТЕБ и установяване на тромбофилното предразположение в субклиничен стадий е от значение за редуциране на негативните последици и усложненията от ТЕБ.

Цел

Целта на изследването е да се установи честотата на клинично-изявените тромбоемболични инциденти при пациенти със солидни тумори в хода на системна химиотерапия; да се оцени риска от изява на венозен тромбоемболизъм (ВТЕ) при онкологични пациенти въз основа на валидирана скала (VTE score) и да се установят клинични и прогностични корелации; да се потърси зависимост на риска от изява на ВТЕ и честотата на ТЕБ

от клиничните характеристики на пациентите и вида на приложената терапия.

Материал и методи

Ретроспективно са анализирани 477 пациенти със солидни тумори, лекувани в Клиника по Онкология и Хематология, УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, за периода 2009-2012 г. Регистрирани са новопоявилите се случаи на ТЕБ и случаите с предшестваща анамнеза. Пациентите са разделени на групи според стадия на заболяването: локален, локално-авансирал и метастазирал стадий. За оценка на риска от ВТЕ в хода на химиотерапия е използвана валидирана оценъчна скала – VTE score, предложена от Khorana et al (Таблица 1), (8). За всеки пациент рискът е калкулиран индивидуално според представения предиктивен модел. Според получения VTE score, пациентите са обособени в три групи на риск: нисък риск – 0 т., междинен – 1-2 т., висок риск – при ≥ 3 т. Категорийните променливи за трите групи са сравнени чрез непараметричен анализ – Pearson's chi-squared test и Fisher's exact test, за анализ на зависимост между променливите е изчислен корелационен коефициент на Spearman, стойности на $p < 0.05$ са приети за статистически значими. Статистическата обработка на данните е извършена на програмен продукт SPSSv.20 за Windows (Chicago II, USA).

Таблица 1. Предиктивен модел за ВТЕ при пациенти, подложени на химиотерапия, (8):

Показатели	VTE score*
1. Локализация	
- Много висок риск (стомах, панкреас)	2
- Висок риск (бял дроб, лимфом, женска полова система, пикочен мехур, тестис)	1
Прехимиотерапевтични стойности:	
2. Тромбоцитен брой $\geq 350 \times 10^9/L$	1
3. Хемоглобин $< 100 \text{ g/L}$ или лечение с еритропоеза-стимулиращи агенти	1
4. Левкоцити $> 11 \times 10^9/L$	1
5. BMI $\geq 35 \text{ kg/m}^2$	1

VTE score*: нисък риск = 0 т., междинен = 1-2 т., висок риск > 3 т.

Резултати

Според локализацията на малигнения процес проследените пациенти се представят както следва: стомах (N=26), панкреас (N=9), бял дроб (N=84), яйчник (N=37), тестис (N=16), дебело черво (N=193), простата (N=29) и млечна жлеза (N=83). В зависимост от стадия, пациентите са обособени в три групи: локализиран – 161 (34%), локално-авансирал – 149 (31%), метастазирал – 167 (35%). Средната възраст на изследвания контингент е $58,13 \pm 11,7$ г. ($18 \div 81$ г.), съотношение м/ж = 1/1.01. Пациентите с позитивна анамнеза за ТЕБ са 45 (9,4%), от тях 6 (четири в метастатичен стадий) са изяви нов тромботичен епизод по време на терапията.

Регистрираните нови случаи с изява на ТЕБ в хода на лечението са общо 31 (6,5%), като не се открива разлика в разпределението по пол и възраст ($p_{\text{пол}} = 0.21$, $p_{\text{възраст}} = 0.50$). От новорегистрираните случаи с ТЕБ венозните тромбози са 68 % (n=21). Най-висок е броят на случаите с тромбофлебит (n=13). Изявата на ТЕБ сигнификантно се асоциира с локализацията на туморния процес ($\chi^2 = 14,361$, $p = 0.04$). Най-висок брой случаи са регистрирани при пациентите с карцином на млечна жлеза (n=10), но процентното съотношение на брой случаи към общ брой пациенти с дадена диагноза е най-високо за тестикуларен карцином – 12,5%, (Таблица 2).

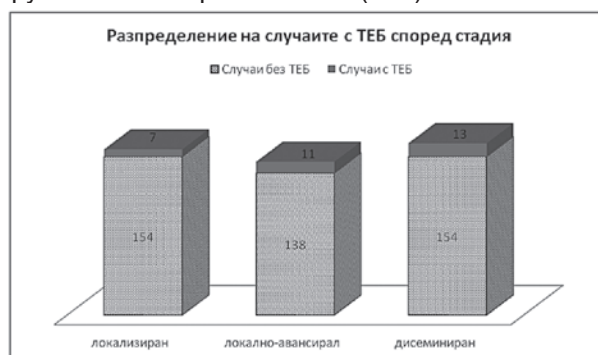
Табл. 2. Честота на ТЕБ според локализацията на малигнения процес

ТЕБ локализация	Случаи с ТЕБ	%	Случаи без ТЕБ	Общ брой
Стомах	3	11.53	23	26
Панкреас	0	0	9	9
Бял дроб	8	9.52	76	84
Яйчник	0	0	37	37
Тестис	2	12.5	14	16
Дебело черво	6	3.1	187	193
Простата	2	6.89	27	29
Млечна жлеза	10	12.04	73	83
Общ брой	31		446	477

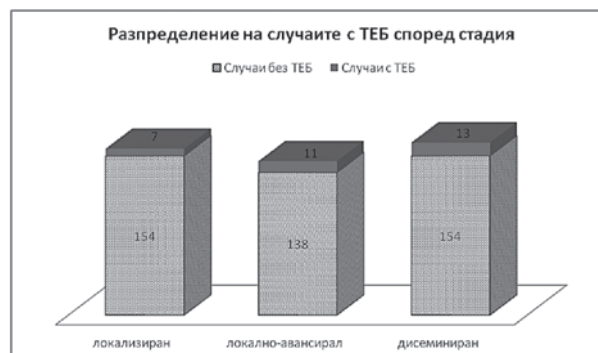
От всички случаи на ТЕБ 25 са се изяви в хода на системната химиотерапия и 6 – при пациенти, провеждали само бифосфонато- (n=2), хормоно- (n=2), таргетна терапия (n=1) или симптоматично лечение (n=1). В хода на лечението най-много случаи са регистрирани след първи (n=7) и след четвърти (n=7) химиотерапевтичен курс. Установява се, че химиотерапията не повлиява съществено честотата на изява на ТЕБ ($p=0.20$). Не се открива разлика в честотата на изява на ТЕБ в зависимост от стадия на заболяването ($p=0.39$), Фиг.1.

Според VTE score, пациентите с нисък риск са 44% (N=209) от общия брой пациенти, тези с ин-

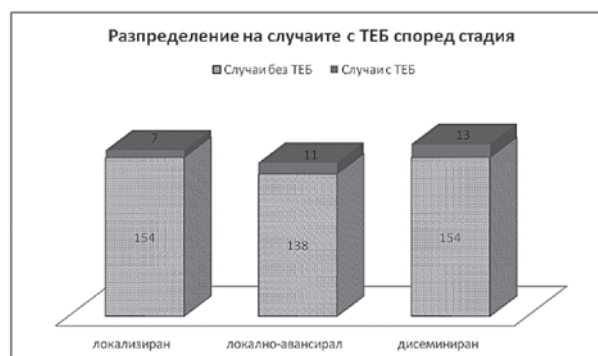
термедиерен риск съставляват 46% (N=222), а с висок риск – 10% (N=46), Фиг. 2. Полът влияе съществено върху разпределението на пациентите, според VTE score: в групата с нисък риск преобладават жените, докато в групите с интермедиерен и висок риск преобладават пациентите от мъжки пол ($\chi^2 = 12.984$, $p = 0.002$), Фиг. 3. Възрастта не оказва влияние върху разпределението на пациентите, според VTE score ($p=0.13$). Открива се съществена разлика в разпределението на пациентите по стадии в зависимост от рисковия профил: пациентите с нисък риск са предимно с локализирана болест, а в групата с далечни метастази броят на пациентите с висок риск е най-голям ($\chi^2 = 10.329$, $p=0.035$) Фиг. 4. Изявата на ВТЕ не се асоциира с рисковия профил ($p=0.78$). В групите с нисък и интермедиерен риск честотата на случаите с ВТЕ е съответно 4,3 % (n=9) и 4 % (n=9), а в групата с висок риск – 6.5 % (n=3).



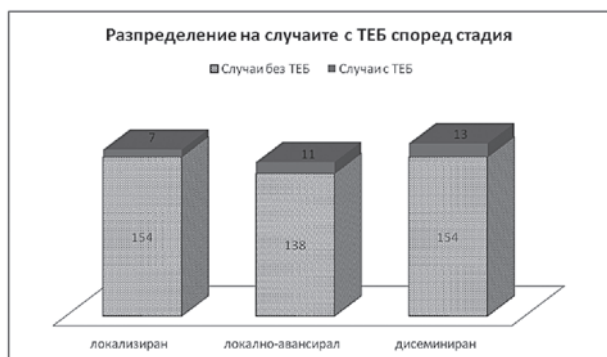
Фиг. 1. Разпределение на случаите с ТЕБ според стадия



Фиг. 2. Разпределение на пациентите според рисков профил



Фиг. 3. Разпределение на пациентите по пол според рисковия профил



Фиг. 4. Рисков профил на изследвания контингент според стадия

Дискусия

Феноменът на тромбофилна диатеза при пациентите с малигнен заболявания е наблюдаван за пръв път преди повече от 150 г., а съвременните изследвания в тази област разкриват интересни корелации, които променят представата за клиничното измерение на връзката между прокоагулантен фенотип и малигнен процес.

Известно е че пациентите със злокачествени новообразувания са изложени на повишен риск от тромбози – до 4.1 пъти повече от общата популация (8). Като основни рискови фактори се посочват такива, свързани със самото заболяване, напр. дадена локализация и фактори, свързани с терапията – прилагането на антинеопластични медикаменти и имобилизация (6). Докладваната от нас честота на изява на ТЕБ (6.5%) съответства на литературните данни, но за разлика от други проучвания, заболяемостта от ТЕБ не се асоциира с прилаганата терапия. Имайки предвид, че локализацията на туморния процес влияе на честотата на ТЕБ, следва да се обмисли хипотезата за тромбофилното предразположение като „специфичен“ феномен при дадени туморни локализации.

Промененият хемостазен потенциал се дължи на комплексни отклонения вследствие взаимодействието между различни компоненти на хемостазната система и туморния процес, в различни етапи на онкогенезата. Така например, свърхекспресията на тъканен фактор се асоциира с повишената склонност към тромбогенеза при карцином на панкреаса, глиобластома, стомашен и белодробен карцином (4). От друга страна при пациенти с множествен миелом се установява нарушен фибринолитичен потенциал по време на лечение с талидомид и винкристин-базирани режими, с което се свързва повишеният риск от тромбози през първите месеци от лечението (9). Съществуват данни, че наличието на фактор V Leiden се асоциира с приблизително 6 пъти по-висок риск от развитие на колоректален карцином (5). Сле-

дователно карциномната тромбофилия не е неспецифична характеристика на малигнения процес и възможността тя да се дължи на конкретни първични и вторични нарушения изисква целенасочен и индивидуализиран анализ в контекста на дадена локализация.

Тромбоемболизъмът при онкологичните пациенти се асоциира с авансираната болест, повишена болестност и смъртност. При пациентите с карцином и с ВТЕ смъртността е два пъти по-висока в сравнение с тези без ВТЕ, независимо от стадия (8). Развитието на ВТЕ се свързва с риск от рецидивиращи тромбози, влошено качество на живот и забавяне прилагането на пореден курс химиотерапия. Неблагоприятните последици от ВТЕ оправдават необходимостта от разработването и прилагането на методики за оценка на тромбофилния риск при онкологичните пациенти. Следваща рискова стратификация, идентифициране на пациентите с висок риск и прилагане на антикоагулантна профилактика при необходимост.

Предложеният предиктивен модел за оценка на риска от ВТЕ при онкологични пациенти е валидиран в няколко проспективни и ретроспективни проучвания като демонстрира статистически значима асоциация с изявата на ВТЕ (2, 8). Базирайки се на пет леснодостъпни в практиката клинично-лабораторни показатели моделът позволява рискова стратификация на пациентите в три групи на риск. Включването на допълнителни хемостазни биомаркери като P-selectin и D-димери може да подобри диагностичната надеждност на предиктивния модел съответно за VTE score ≥ 3 чувствителността е 64 % (вероятност за висок риск при пациенти с ВТЕ), специфичността – 81 % (вероятност за нисък риск при пациенти без ВТЕ), положителната предиктивна стойност – 19.7 % (вероятност за ВТЕ при пациенти с висок риск), негативната предиктивна стойност – 96.9 % (вероятност за липса на ВТЕ при пациенти с нисък риск) (2). При всички стойности на VTE score в разширения модел НПС е между 94.4 % и 99 %, докато ППС е между 8.9 % и 42.9%, т.е. моделът идентифицира пациентите с нисък риск, при които антикоагулантна профилактика не се налага и тези с много висок риск (VTE score ≥ 5), при които антикоагулантната профилактика е оправдана. Предвид липсата на асоциация между изявата на ВТЕ и рисков профил в нашата популация пациенти и факта, че пациентите с висок риск са само 10 % от общия брой, ние смятаме, че диагностичната надеждност на VTE score по отношение на пациентите с междинен риск не е удовлетворяваща. Това налага търсенето и въвеждането в клиничната практика на специфични хемостазни биомаркери с добра дискриминативна способност спрямо риска от изява както на венозни, така и на артериални тромботични инциденти. Като потен-

циални кандидат-биомаркери за ВТЕ при онкологични пациенти могат да се обсъждат P-selectin, тъканен фактор, микрочастици, експресиращи ТФ и протромбиновите фрагменти 1 + 2. При пациенти със солидни тумори повишените нива на разтворимия P-selectin са независимо асоциирани с 2.6 пъти по-висок риск за изява на ВТЕ. Докладваната честота на ВТЕ е 4 пъти по-висока при ТФ свръхекспресиращи тумори в сравнение с тези с ниска експресия. Повишени нива на микрочастици, експресиращи ТФ са установени при пациенти със солидни тумори и ВТЕ спрямо тези без ВТЕ. Въпреки това, прокагулантни микрочастици, не експресиращи ТФ, не са предиктивни за изява на ВТЕ при онкологични пациенти. Повишени нива на D-димери и протромбинови фрагменти 1+2 са идентифицирани като предиктори за риска от ВТЕ (3).

Заклучение

За индивидуализиран подход в профилактиката и терапията на ТЕБ при малигнени заболявания е оправдано въвеждането в клиничната практика на хемостазни биомаркери, които специфично да отразяват настъпилите нарушения. Уместно е провеждането на проспективни проучвания с хомогенни популации онкологични пациенти за да се потвърди клиничната приложимост и информативна стойност на потенциалните биомаркери.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Adcock, D. M., L. M. Fink, R. A. Marlar et al. The hemostatic system and malignancy. Clin Lymphoma Myeloma 8, 2008, 4:230-6
- Ay, C., D. Dunkler, C. Marosi, A. L. Chiriac et al. Prediction of venous thromboembolism in cancer patients. Blood 116, 2010, 24:5377-82
- Ay, C., I. Pabinger. Predictive potential of haemostatic biomarkers for venous thromboembolism in cancer patients. Thromb Res 129, 2012, Suppl 1: S6-S9
- Chu, A. J. Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview. Int J Inflam 2011 2011:367284. Published online 2011 / 09/ 20, doi: 10.4061/2011/ 367284
- Garnier, D., N. Magnus, E. D'Asti, M. Hashemi et al. Genetic pathways linking hemostasis and cancer. Thromb Res 129, 2012, Suppl 1: S22-9
- Grudeva-Popova, J. Cancer and venous thromboembolism. J BUON, 10, 2005, 4:483-9
- Khorana, A. A. Risk assessment for cancer-associated thrombosis: what is the best approach. Thromb Res 129, 2012, Suppl 1:S10-15
- Khorana, A. A., N. M. Kuderer, E. Culakova et al. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. Blood 111, 2008, 10:4902-7
- Leebeek, F. W., M. J. Kruip and P. Sonneveld. Risk and management of thrombosis in multiple myeloma. Thromb Res 129, 2012, Suppl 1: S88-92
- Lugassy, G. Thrombosis and cancer. London, New York. 2004
- Mandala, M., A. Falanga, F. Roila et al. Management of venous thromboembolism (VTE) in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol 22, 2011, (S)6, vi85-vi92

Адрес за кореспонденция:

Елина Белева
Клиника по Онкология и Хематология
УМБАЛ "Св. Георги" ЕАД - Пловдив
Медицински Университет - Пловдив
Катедра "Клинична Онкология"
бул. Васил Априлов 15А, гр. Пловдив, 4002
България
тел./факс: +359 32 602 880
e-mail: elina_beleva@yahoo.de

ХРОМОЗОМНИ АБЕРАЦИИ В 14Q32 ЛОКУСА ПРИ МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ

Т. Бонева, Л. Митев

Секция по Цитогенетика, Катедра по Клинична лаборатория и имунология,
ВМА, София

14Q32 REARRANGEMENTS IN MULTIPLE MYELOMA

T. Boneva, L. Mitev

Cytogenetic section in Department of Clinical Laboratory and Immunology,
Military Medical Academy, Sofia

Резюме: Мултипленият миелом (ММ) е заболяване, което се характеризира с клонална пролиферация на плазмоцитите в костният мозък. Едни от най-характерните аномалии при него са т. нар. 14q32 преобразувания. Те се откриват при около 50-70% от случаите с ММ и по правило се асоциират с нехипердиплоиден кариотип. Представяват транслокации, при които локализирания в 14q32 ген на тежките имуноглобулинови вериги (IgH) се преобразува с различни онкогени. Най-честите партньори на IgH са: FGFR3/MMSET при t(4;14)(p16;q32); CCND1 (Циклин D1) при t(11;14)(q13;q32); C-MAF при t(14;16)(q32;q23); MAFB при t(14;20)(q32;q11) и циклин D3 при t(6;14)(p21;q32). Целта на настоящето проучване е да се определи честотата и вътрешната структура на 14q32 преобразуванията. При 37 пациента с ММ беше проведена флуоресцентна *in situ* хибридизация на фиксирани препарати от костен мозък. Използван бе следният алгоритъм: Скрининг на 14q32 преобразуванията със сплит пробата за 14q32, определяне на вида на 14q32 преобразуването с двуцветните, двойнофузионни проби за BCL1/IGH t(11;14), FGFR3/IGH t(4;14) и MAF/IGH t(14;16) и потвърждаване на находката с конвенционалния цитогенетичен анализ. Проучването установи, че 59% (22 пациента) са с 14q32 преобразувания, като най-честото от тях е t(4;14) - (31%). При 9 пациента (24%) бе наблюдавана само делеция на локуса на IgH. При тези случаи транслокация не можа да бъде доказана с наличните лабораторни техники. Установените находки са съпоставени с данните от научната литература и е дискутирана тяхната връзка с патогенезата на ММ.

Ключови думи: мултиплен миелом, 14q32 преобразувания

Summary: Myeloma multiple (MM) is a disease, characterized with clonal proliferation of the plasmocytes in the bone marrow. One of the most significant anomalies associated to this disease are so called 14q32 rearrangements. They are present in about 50-70% of the cases with MM and are presented with nonhyperdiploid karyotype. They included translocations, by wich the localized in 14q32 heavy immunoglobulin chains (IgH) gene is translocated to different oncogenes. Most common partners of IgH are: FGFR3/MMSET by t(4;14)(p16;q32); CCND1(Cyclin D1) by t(11;14)(q13;q32); C-MAF by t(14;16)(q32;q23); MAFB by t(14;20)(q32;q11) and Cyclin D3 by t(6;14)(p21;q32). The aim of this study is to evaluate the frequency and the internal structure of 14q32 rearrangements. By 37 patients with MM we preformed fluorescent *in situ* hybridization of fixed bone marrow samples. The following algorithms was used: Screening of 14q32 transformations with split test for 14q32, evaluation of the type of 14q32 transformation by dual color dual fusion tests for BCL1/IGH t(11;14), FGFR3/IGH t(4;14), MAF/IGH t(14;16) and confirmation of the findings by conventional cytogenetic analysis. The study revealed that 59% (22 patients) have 14q32 rearrangements and most of them is t(4;14) – (31%). By 9 patients (24%) was observed only deletion of the IgH locus. In these cases we couldn't prove translocation by the use of available laboratory methods. The established findings are compared according to data from the literature and their connection with the pathogenesis of MM is discussed.

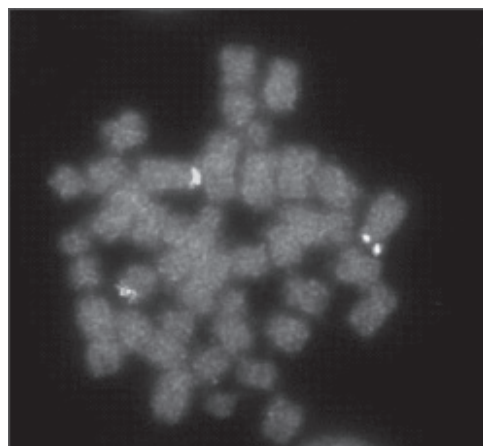
Keys words: myeloma multiple, 14q32 rearrangements

Въведение

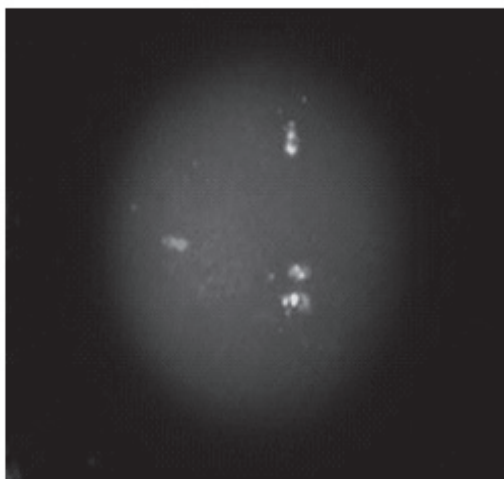
Мултипликният миелом (ММ) е заболяване, което се характеризира с клонална пролиферация на плазмочитите в костният мозък. Патогенезата на ММ е свързана с възникването на специфични хромозомни аномалии, чието откриване е важно както за доказването на диагнозата, така и за определянето на прогнозата на заболяването. Транслокациите, включващи гена на тежките имуноглобулинови вериги (IgH) се срещат при 50-70% от пациентите с новодиагностициран миелом и са асоциирани с нехипердиплоиден кариотип [2]. Те представляват транслокации, при които локализирания в 14q32 ген (IgH) се преобразува с различни онкогени. Генни партньори на IgH са: FGFR3/MMSET при t(4;14)(p16;q32); CCND1 (Циклин D1) при t(11;14)(q13;q32); C-MAF при t(14;16)(q32;q23); MAFB при t(14;20)(q32;q11) и циклин D3 при t(6;14)(p21;q32). [1] Най-често срещаните транслокации, които засягат локуса на IgH транслокации са t(4;14)(p16.3;q32) и t(11;14)(q13;q32) – фиг. 4б. Те се откриват при около 30-40% от пациентите с ММ. Транслокацията t(14;16)(q32;q23) се среща едва при 5% от пациентите [2]. Ние си поставихме за цел да проучим честотата на 14q32 преобразуванията и техните варианти: t(4;14); t(11;14); t(14;16) с оглед бъдеща терапия с тирозинкиназни инхибитори.

Материали и методи

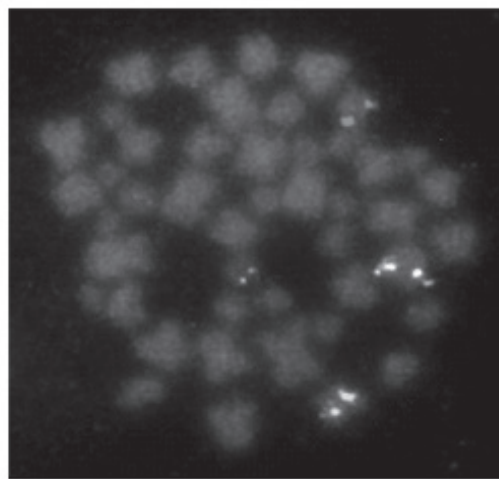
Бяха изследвани 37 пациенти с диагноза ММ, поставена спрямо критериите на СЗО. Цитогенетичният анализ бе проведен чрез флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) на интерфазни ядра и метафазни пластинки на препарати от костен мозък. Алгоритъмът на нашето изследване включваше два етапа: при първият бе извършван скрининг за 14q32 преобразуванията със сплит проба. При вторият етап случаите с положителен сигнал на сплит пробата бяха тествани с двуцветни, двойнофузионни проби за BCL1/IgH t(11;14), FGFR3/IgH t(4;14) и MAF/IgH t(14;16) (KREATECH).



Фиг. 3. FISH анализ. Метафазна пластинка от костен мозък, показваща t(4;14)(p16;q32)



Фиг. 4-а t(14;16)(q32;q23)



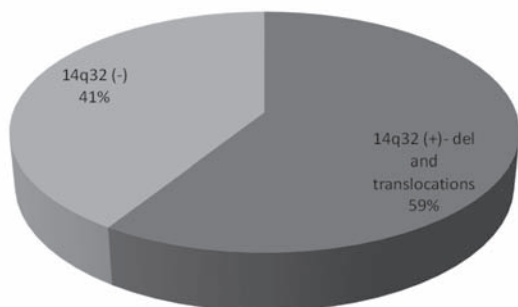
Фиг. 4-б t(11;14)(q13;q32)

Резултати

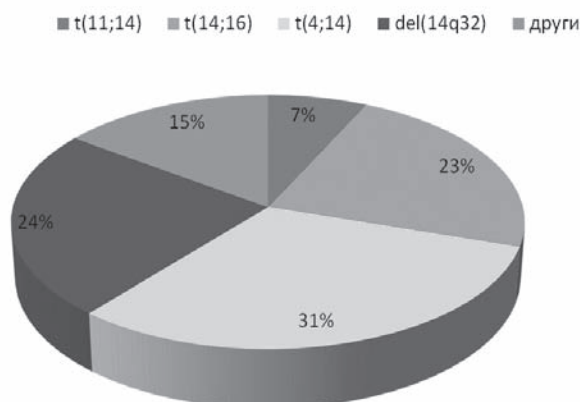
Проучването установи, че 59% от случаите (22 пациента) са с 14q32 преобразувания – фиг.1, като най-честото от тях е t(4;14)(p16.3;q32) - 31%

(фиг.2). Транслокация (14;16)(q32;q23) се установи при 23%, а t(11;14)(q13;q32) при 7% (фиг.2). При 24% (9 пациента) бяха доказани както терминални така и интерстициални делеции в локуса на IgH, с места на преобразуване в константната, вари-

абилната част на гена или между тях: 5 случая (56%) са с делеция на вариабилната област (V), 2 случая (22%) с делеция в свързващата (J) и константната (C) област на гена, 1 случай (11%) с биалелна делеция във вариабилната област и 1 случай (11%) с делеция във V, J и C областите. В значителна част от случаите с преобразуване в 14q32 (15%) пробите за t(11;14), t(4;14) и t(14;16) бяха негативни (фиг.2).



Фиг. 1. Процентно разпределение на 14q32 аберациите при пациенти с ММ



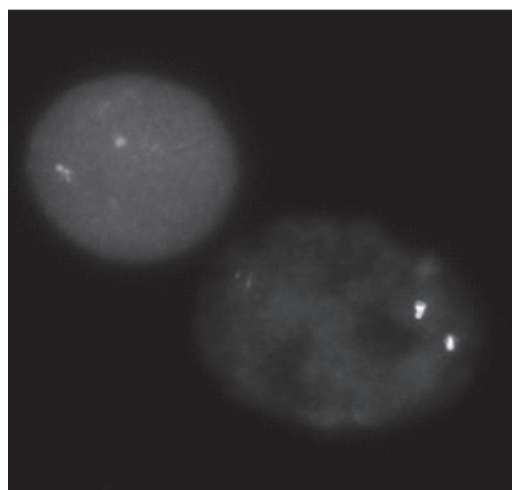
Фиг. 2. Процентно разпределение на най-честите 14q32 преобразувания

Дискусия

Определянето и прецизирането на делът на най-често срещаните 14q32 преобразувания е от съществено значение за бъдещето приложение на прицелна терапия с тирозинкиназни инхибитори при пациентите с ММ асоциирани t(4;14) – фиг.3 и t(14;16) - фиг.4а. Тази терапия се оказва изключително ефективна при онко-хематологичните заболявания, при които патогенезата е свързана с появата на специфичен онкопротеин с тирозинкиназна активност, какъвто е случаят, например, с хроничната миелоидна левкемия. Ние установихме, че делът на 14q32 преобразуванията в нашата група от пациенти е сходен със съобщения в научната литература. [1,2,3,4] Същото се отнася и за честотата на t(4;14). Интересна находка на настоящето проуч-

ване е, че t(14;16) се доказва в 23% от болните с ММ за разлика от данните, съобщени в световната литература, при които тази аномалия се открива едва в 5%. Тези резултати показват, че делът на пациентите нуждаещи се от тирозинкиназен инхибитор при ММ е значителен, тъй като общата честота от двете аномалии - t(4;14) и t(14;16) е общо 54% - фиг. 2.

Друга интересна находка е високата честота на делециите в локуса на IgH – фиг.5, които включват различни по вид и място на преобразуване делеционни нарушения. За сега няма яснота по отношение на клиничната значимост на тези аномалии и връзката им с патогенезата на заболяването. Интересното е, че най-често се делетира вариабилната област (56%). Не е малък и делът на транслокациите, които не могат да бъдат определени със сондите, които са използвани в проучването. Тези случаи вероятно представляват хетерогенна група от нарушения, които включват различни редки транслокации, засягащи локуса на IgH. Последната находка показва, че е необходимо въвеждането на нови диагностични тестове за тяхното откриване.



Фиг.5 del(14q32)

Изводи

1. Най-честите 14q32 преобразувания са t(4;14) и t(14;16).
2. Значителен е делът на редките 14q32 преобразувания и делеционните аномалии в локуса на тежките имуноглобулинови вериги.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. (Eds.):WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008
2. Clinical impact of chromosomal aberrations in multiple myeloma, journal of INTERNAL MEDICINE,2010,10.1111

3. Genetic Markers Used for Risk Stratification in Multiple Myeloma, Genetics Research International, 2011, 10.4061
4. The Use of Genetics Markers and Signatures in Multiple Myeloma Risk Stratification, American Society of Clinical Oncology, 2011, 1092-9118/10/1-10
5. Characterization of Oncogene Dysregulation in Multiple Myeloma by Combined FISH and DNA Microarray Analyses, Genes, Chromosomes & Cancer, 2005, 42:117-127

Адрес за кореспонденция:

Любомир Митев,
Лаборатория по цитогенетика и имунология,
Катедра по клинична лаборатория и имунология,
Военномедицинска академия
ул. "Св. Г. Софийски" №3
1431 София
e-mail: cytogen.vma@abv.bg

ИНТРАВАСКУЛАРЕН ДИФУЗЕН В-ЕДРОКЛЕТЪЧЕН ЛИМФОМ - ПРЕДСТАВЯНЕ НА СЛУЧАЙ И ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

В. Гръкланов, В. Горанова-Маринова, П. Георгиев, К. Сапунарова, М. Димитрова, С. Горанов
Клиника по клинична хематология МУ-Пловдив, УМБАЛ „Св.Георги“

INTRAVASCULAR DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA CASE - REPORT AND LITERATURE REVIEW

V. Graklanov, V. Goranova-Marinova, M. Dimitrova, K. Sapunarova, S. Goranov
Clinic of Clinic Hematology Medical University, UMHAT "St. George" - Plovdiv

Резюме. Интраваскуларният дифузен В-едроклетъчен лимфом (ИВЕБКЛ) е рядък подтип агресивен екстранодален В-едроклетъчен лимфом, характеризира се с пролиферация на клонални лимфоцити в малките и средните кръвоносни съдове. Честотата му е < 1/ 1 000 000 души, средната възраст на пациенти - 70 г. (34-90г) и се среща по-често в азиатската популация. Аберантната експресия при малигнените клетки на адхезионните молекули CD11a и CD49d (VLA-4) и липсата на CD29 (β 1 интегрин) и CD54 (ICAM-1), имащи огромно значение за лимфоцитния „homing“ и трансоваскуларната миграция, е предполагаем механизъм за предпочитанието на лимфомните клетки към капилярния ендотел. Класическият имунофенотип на интраваскуларния лимфом е с позитивни В-клетъчни антигени : CD19 +, CD20 +, CD22 +, CD79a +. В малкото описани серии са доказани структурни отклонения в 1, 6 и 18-та хромозоми. Заболяването протича изключително хетерогенно, поради ангажирането на малките съдове във всички органи и системи. Описани са два варианта на интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом: 1. Класически «западен» вариант (предимно кожа и ЦНС) и 2. Азиатски вариант (фебрилитет, анемия, тромбоцитопения, хепато-спленомегалия и хемофагоцитен синдром). Органно-съдовите биопсии са без алтернатива за поставянето на диагноза. Заболяването в повечето случаи е дисеминирано при поставянето на диагнозата и изисква системна терапия. Липсва терапевтичен консенсус, но се препоръчват CHOP и CHOP-like режими в комбинация с Rituximab. Лъчетерапията има място при кожно засягане. Средната преживяемост е само 13 месеца. Включването на аутоложна СКТ е съвременна опция в лечението, но все още с противоречиви резултати. Представя се пациентка на 67 г. с постоянна температура, червеникави и болезнени промени по кожата на двете бедра, миалгия, артралгия, изразени В-симптоми. След отрицателни многобройни изследвания, диагнозата е поставена след кожна биопсия с имунохистохимия. Започнато е лечение с режима R-CHOP, като на 4 –тия курс е без показатели за биологична и параклинична активност.

Ключови думи: неходжкинови лимфому, екстранодални лимфому, интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом

Summary. Intravascular diffuse large B-cell lymphoma (IVLBCL) is a rare subtype of aggressive extranodal B-large-cell lymphoma characterized by clonal proliferation of lymphocytes in the small and medium-sized blood vessels. Its incidence is < 1/1 000 000 people with average age of patients 70 years (34-90y) and it is more common in Asian population. The aberrant expression of adhesion molecules CD11a and CD49d (VLA-4) and the absence of CD29 (β 1 integrin) and CD54 (ICAM-1) affect the lymphocyte «homing» and transvasculare migration and is a probable mechanism for the preference of lymphoma cells to capillary endothelium. Classic immunophenotypes of intravascular lymphoma is a positivity for B-cell antigens: CD19 +, CD20 +, CD22 +, CD79a +. In small series of patients structural abnormalities in the 1st, 6th and 18th chromosomes are reported. The disease has an extremely heterogeneous clinical manifestation due to the involvement of small vessels in all organs and systems. Two variants of intravascular

diffuse large B-cell lymphoma are described: 1. Classic «Western» variant (affecting mainly skin and central nervous system) and 2. Asian variant (fever, anemia, thrombocytopenia, and hepatosplenomegaly, hemophagocytic syndrome). Vascular organ biopsies have no alternative to prove the diagnosis. In most cases the disease is disseminated at presentation and systemic chemotherapy is required. There is no consensus treatment but CHOP and CHOP-like regimens in combination with Rituximab are recommended. Radiation therapy is an option in the treatment of skin disease. Median survival of IVLBCL is only 13 months. The inclusion of autologous SCT is a modern treatment approach but yet with contradictory results.

We present a case of 67 year old woman with fever, erytemous and painful skin changes of both hips, myalgia, arthralgia and B-symptoms. After a long diagnostic searching and negative results from numerous test, patient was diagnosed after skin biopsy with immunohistochemistry. A treatment with R-CHOP was started and after the 4th cycle patient has no signs of paraclinical and biological activity.

Key words: nonhodgkins lymphomas, extranodal lymphoma, intravascular diffuse large B-cell lymphoma

Въведение

Интравакуларният дифузен В-едроклетъчен лимфом (ИВЕБКЛ) е рядък подтип агресивен екстранодален дифузен В-едроклетъчен лимфом, анатомично характеризиращ се с пролиферация на клонални лимфоцити в малките и средните кръвоносни съдове. Липсата на ангажиране на околните тъкани, както и липсата на лимфомни клетки в лимфните възли и ретикулоендотелната система е отличителен белег на заболяването (1). Интравакуларният лимфом е най-често заболяване на В-лимфоцитите, но са описани и редки случаи на Т-клетъчен (Т-лимфоцити) и NK

– клетъчен произход на малигнения лимфоцитен клон. За първи път Pfleger и Tarpeiner описват заболяването като „angioendotheliomatosis proliferans systemisata“, считайки ендотелен произход на болестта (2). В 1982 г., Ansell и сътр. предполагат лимфоиден произход на заболяването, доказвайки повърхностен имуноглобулин върху злокачествените клетки. Общият левкоцитен антиген на злокачествените клетки е открит в 1985г. Лимфоидният произход на заболяването се потвърждава и възприема окончателно от Wick и сътр. в 1986г (3,4,5,6). За заболяването са използвани най-различни термини (табл1). WHO класификация налага термина интравакуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом (7)

Таблица 1.

	Термини, използвани за интравакуларния лимфом
	Angioendotheliomatosis proliferans systemica
	Malignant angioendotheliomatosis
	Intravascular lymphomatosis
Kiell класификация	Angio-endotheliotropic (intravascular) lymphoma
Lukes- Collins класификация	Angiotropic large cell lymphoma
REAL класификация	Diffuse large B-cell lymphoma
WHO	Intravascular large B-cell lymphoma

Епидемиология и рискови фактори

Интравакуларният лимфом е рядко заболяване с честотата по-малко от 1/ 1 000 000 души. При средна възраст на пациентите около 70г възрастовият диапазон е от 34 до 90 г с еднаква честотата при мъжете и жените (8). Има известни доказателства, че болестта възниква по-често в азиатската популация (9). Не са известни рискови фактори. Има описани случаи на IVLBCL, предшестван от други лимфоидни неоплазии, включително след фоликуларен и дифузен В-едроклетъчен лимфом (10,11). Остава неясно дали това представлява емболизация на неопластични лимфоцити в съ-

довия лумен или е клонална еволюция на нодален лимфом със загуба на експресия на хемокинови рецептори, които са с критично значение за миграцията през съдовите стени (12).

Патогенеза и биология

Предпочитанието на туморните клетки към капилярния ендотел вероятно е свързана с експресията на определни молекули на повърхността на лимфоцитите, което дава възможност за преференциално свързване по съдовата стена. Към момента има няколко теории, опитващи се да обяснят патогенезата на интравакуларния лим-

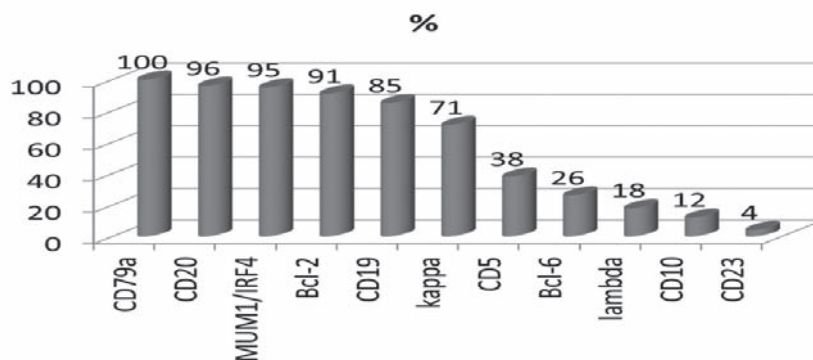
фом . Аберантната експресия на CD11a и CD49d (VLA-4) на малигнените клетки е един от предполагаемите механизми, тъй като тези адхезионни молекули дават възможност на туморните клетки да се свържат с CD54 (CD11a лиганд) и CD106 (CD49d лиганд), които са експресирани на ендотелната повърхност(13). По-скорошно проучване на шест случая обяснява друг възможен механизъм: установена е липса на CD29 ($\beta 1$ интегрин) и CD54 (ICAM-1) върху малигнените клетки, т.е. на молекули, имащи огромно значение за лимфоцитния „homing” и трансвакуларната миграция (12). Друга възможност е аберантната експресия на CXCR3 върху атипичните лимфоцити и на не-

говия лиганд CXCL9 върху ендотелните клетки на малките съдове, което може подпомага миграцията на атипичните лимфоцити в тези области (14).

Морфология и имунофенотип

Туморните клетки са големи, с проминиращи нуклеоли и чести митози. Характерно е синусоидално ангажиране в черния дроб, далака и костния мозък. Понякога атипични клетки се откриват и в периферната кръв (15). Класическият имунофенотип на интраваскуларния лимфом е с позитивни В-клетъчни антигени : CD19 +, CD20 +, CD22 +, CD79a +. Около 1/3 от случаите експресират и CD5 (Фиг 1) (13,16,17, 18, 19)

Фиг 1. Най-често експресирани маркери при интраваскуларен В-едроклътъчен лимфом.



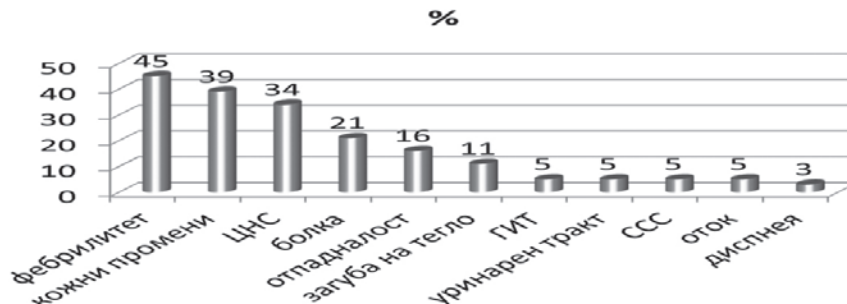
Цитогенетични отклонения

До момента липсват доказани патогномонични цитогенетични аномалии характерни за интраваскуларния лимфом. В малко на брой описани серии са доказани структурни отклонения в 1, 6 и 18-та хромозома, особено в късото рамо на 1-ва хромозома (в четири от шест пациенти) и тризомия 18 (в четири от шест пациенти) (20). Друго проучване съобщава за пациент с хромозомни аномалии, включително и транслокация t (11, 14) (q13 ; q32), показваща експресия на циклин D1, потвърдена и с FISH анализ (21).

Клинична картина

Интраваскуларният дифузен В-едроклътъчен лимфом се характеризира с особена хетерогенност в клиничната изява, ангажирайки малките съдове на почти всички органи. Въпреки че е заболяване с клонална пролиферация на лимфоцити, доста рядко се наблюдава лимфоаденомегалия, хепатоспленомегалия или циркулиращи атипични клетки в периферната кръв. Това затруднява ранното диагностициране на заболяването (1). На фиг 2. Ferreri AJ и сътр. посочват най-честите симптоми при 38 пациенти с интраваскуларен В-едроклътъчен лимфом (8).

Фигура 2. Най-чести симптоми на интраваскуларен –В едроклетъчен лимфом



По-голяма част от случаите могат да бъдат групирани в четири групи, в зависимост от клиничната изява: 1) с ангажиране на ЦНС; 2) с ангажиране на кожата; 3) с фебрилитет при неизяснена етиология; 4) с хемофагоцитен синдром. Най-вероятно клиничната изява ЦНС и кожни симптоми не се дължат на специфична предилекционност на основният процес, а може би са отражение на нетолерантността на ЦНС към всяко васкуларно увреждане и лесната проникваемост на кожата (1).

Ангажиране на ЦНС

Симптомите при ангажиране на ЦНС са най-разнообразни - фокални, сензорни или моторни дефицитни, менингоградикулити, обща слабост, бързо прогресираща деменция, афазия, дизартрия, хемипареза, гърчове, атаксия, миоклонус, световъртеж, транзиторна загуба на зрението (17). С помощта на ЯМР може да се видят кортикални или субкортикални лезии с хиперденсна характеристика на T2 (22,23). В по-големи серии от 7 пациенти с ЦНС ангажиране при 6 е наблюдавана лимфоцитоза в ликвора, при 1 - цитологично доказано наличие на атипични клетки в ликвора (23).

Ангажиране на кожата

Кожните лезии, отразяващи ангажирането на малките съдове в кожата имат най-различна клинична изява. Могат да се наблюдават както единични, така и множествени лезии с най-различен вид : индурирани еритематозни ерупции, слабо ограничени, различни по-големина, еритематозни или десквамозни плаки, промени по типа «кора на портокал», целулит, болезнени синьо-червени, палпиращи се нодуларни дисколорации, язвени нодули или малки палпиращи се червеникави петна (1,8,24,25). Кожната биопсия доста често е основния метод за диагностицирането на заболяването.

Фебрилитет с неизяснена етиология

Фебрилитетът е най-честият симптом - около 45% по литературни данни (8). Тук търсенето на инфекциозен причинител за фебрилитета най-често е причина за късното диагностициране на заболяването.

Хемофагоцитен синдром.

Ангажирането на костния мозък се характеризира с наличието на атипични лимфоцити в съдовете / синусоидалните пространства, както и хемофагоцитен синдром (.10,26). Хемофагоцитният синдром се наблюдава по-често при пациентите с азиатски произход, но са описани случаи и при

пациенти в САЩ и Франция (27, 28)

Варианти на интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом

В литературата са описани два варианта на интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом : 1) класически «западен» вариант и 2) азиатски вариант. Класическият «западен» вариант ангажира предимно кожата и ЦНС. Азиатският вариант се характеризира с фебрилитет, анемия, тромбоцитопения, хепато-спленомегалия и хемофагоцитен синдром (9,29,30). Предполага се връзка между инфекция с *Fasciola* и *Anisakis* и азиатския вариант на болестта, като ясна причинно-следствена връзка до момента не е открита (31). Интригуващо е различието в протичането на заболяването при пациенти от различни географски области. Хипотетично се смята, че причината може би е в етническото различие в продуциране на инфламаторни цитокини или във влиянието на факторите на околната среда (31,32,33).

Клинико-лабораторни изследвания

Най-често срещаните лабораторни отклонения, описани при интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом са увеличено ниво на ЛДХ (86%), учеличен β 2-микроглобулин (82%), анемия (63%), ускорено СУЕ (43%), тромбоцитопения (29%), левкопения (24%), хипоалбуминемия (18%) и наличие на серумен моноклонал компонент (14%) (34). В две серии от пациенти, всяка включваща по 5 пациенти, е изследвано потенциалното значение на простатната кисела фосфатаза като диагностичен маркер. Доказано е, че ензимът е както предиктор за наличието на заболяването при мъже и жени, така и за отговора към лечението (35).

Диагностициране на интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом

Органните биопсии са задължителни за точното и навременно диагностициране на заболяването. Времето до диагностициране, както и поставянето на точната диагноза са особено важни за пациентите, защото само адекватното и навременно лечение може да подобри клиничния изход от заболяването.

Лечение и прогноза на интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом

Липсват рандомизирани, контролирани проучвания, сравняващи ефекта от различни полихимиотерапевтични режими, използвани за лечение на интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом. Заболяването в повечето случаи е дисеминирано при поставянето на диагнозата и из-

исква системна терапия. Въз основа на данните от литературата, както и принадлежността на заболяването към субвариантите на дифузия В-едроклетъчен лимфом, се препоръчва използването на антрациклин-базирани режими. CHOP и CHOP-like режими са средство на избор, като добавянето на моноклонално антитяло Rituximab подобрява терапевтичния отговор (1). В литературата има описани случаи на дълготрайни ремисии при използване на комбинирана химиотерапия. Групата от Johns Hopkins съобщава, че всички 4 от 10 пациенти с интраваскуларен лимфом получили комбинирана ХТ (3 CHOP и 1 Pro-MACE-CytaBOM) са постигнали пълна ремисия и били живи в фазата на проследяване от 6-48 месеца (36). Лъчетерапията има място при пациенти с кожно засягане за лечение на единични кожни лезии, но с оглед факта, че заболяването е системно, задължителна е ХТ, като основен метод (8). Все още прогнозата на пациентите, лекувани с различните химиотерапевтични режими е еднакво разочароваща. Средната преживяемост при серия от 62 пациенти, лекувани с антрациклин-базирана ХТ е само 13 месеца (17). Включването на автоложна СКТ като част от лечението, значително подобрява изхода от заболяването с преживяемост от 39 до 99.5 месеца. За съжаление, броят пациенти, кандидати за АСКТ е ограничен - напреднала възраст, лош перформанс статус, различна органна дисфункция и значителна коморбидност при по-голямата част от засегнатата популация (17). Кожният вариант на класическия тип се асоциира с по-добра прогноза от некожните варианти на класическия или азиатски интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом (8). Наличието на хемофагоцитен синдром е лош прогностичен фактор.

Интраваскуларен дифузен В-едроклетъчен лимфом – представяне на случай

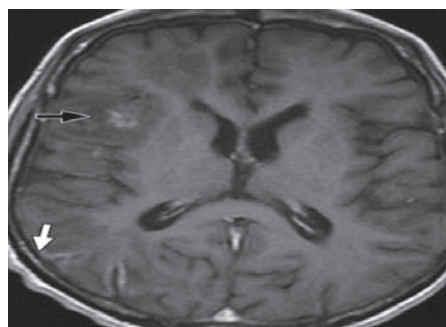
Жена на 67 години, без клинично значима придружаваща патология е с оплаквания от субфебрилна температура – 37.4 – 37.6 гр., предимно в следобедните часове, придружена от артралгии и миалгии. Започнато е амбулаторно лечение с антипиретик, по-късно е добавен антибиотик - липсва ефект, температурата персистира. Няколко дни по-късно се появяват червеникави петна по медиалната страна на двете бедра, повече в дясно, със среден размер 3-4 см, на места конфлуиращи, леко надигнати и болезнени при палпация (снимка 1). Консултирана е с дерматолог и е възприета диагнозата - атипична Erythema nodosum. Започнато е лечение с Prednison tabl 5.0 mg – 3 x 3tabl /24h. Температурата, миалгиите, артралгиите се овладяват, а кожните промени претърпяват обратно развитие и почти напълно изчезват. Последвало намаляване на дозата на Prednison'a - 20mg / 24h, при което отново се по-

явява субфебрилитет в следобедните часове.

Кръвни и биохимични изследвания: CRP – 70 mg/l; WBC $5.58.10^9$ /l; Hgb – 115 g/l, PLT 274.10^9 /l; ДКК-St 0,02; Sg 0,64; Eo 0,02; Mo 0,04; Ly 0,28; LDH-1446 U/l; ASAT – 64 U/l; **Миелограма и трепанобиопсия:** без данни за ангажиране на костния мозък от малигнен процес. **Вирусологични и микробиологични изследвания:** грипни, парагрипни вируси, Коксаки вирус, EBV, CMV, HSV, HIV1,2, HBsAg, HCV – отрицателни резултати. **Серологични изследвания** за трихинелоза, токсокароза, ехинокоза, токсоплазмоза, лайшманиоза, малария – (-) отр. Wassermann, Coxiella burnetii, ASO; Leptospira spp., Listeria monocytogenes – отрицателни резултати, Anti-Borrelia burgdorferi Ig M ELISA > 5.0 U/ml (+) пол. Anti-Borrelia burgdorferi Ig G ELISA 3.0 U/ml (-) отр. Borrelia burgdorferi Western blot (-) отр. Хемокултура (-) отр. – трикратно. **Имунологичен панел:** ANA 1:80, anti-DNA, C3, anti-Sm, anti-RNP; anti-SSA; anti-SSP – отр. **Туморни маркери** (CEA; CA 19-9; CA 72-4); Фиброгастро – и фиброколоскопия – б.о. **Образни изследвания:** КТ на бели дробове и медиастиnum без контраст – нормална находка. КТ на коремни органи и малък таз – лекостепенна хепатомегалия, с лекостепенна стеатоза, единичен конкремент в жлъчен мехур с размери – 8 mm, останалите структури – в норма. МРТ на главов мозък: хипоталамо – хипофизарна област с данни за васкуларна енцефалопатия с ангажиране на малките съдове (снимка 2.) Васкуларна инсуфициенция на средните мозъчни артерии. Микроаденом на хипофизната жлеза. **Биопсични находки:** на кожа – данни за периваскуларен дерматит; на ректална лигавица- (-) отр. за амилоид.



Снимка 1.

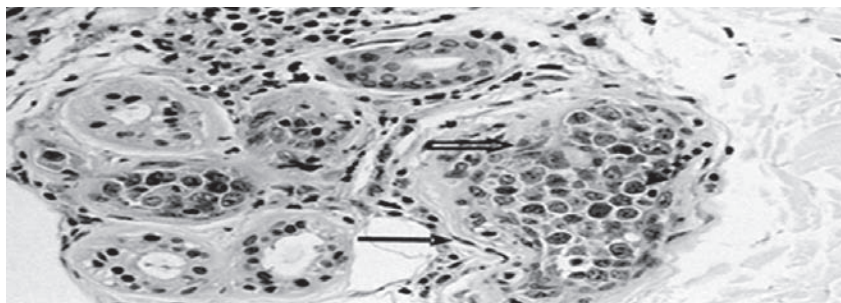


Снимка 2.

Повторна кожно-мускулна биопсия от m.deltoides: не се откриват данни за дегенеративни и денервационни промени в мускула. В кръвоносните съдове дълбоко в дермата се открива *интраваскуларен нехочкинов лимфом CD20/ +*. Ревизия на хистологичния резултат: 1. В малките съдове на подлежащата мастна тъкан се визуализират групи от средни по размер лимфоидни клетки с везикуларни ядра за сметка на млад хроматинов строеж и една до няколко нуклеоли и относително оскъдна цитоплазма. (снимка 3) 2. CD20 (+) пол.,

Bcl2 (+) пол., CD10 (-) отр., TdT (-) отр., CD5 (+) пол., Ki67 80-90% пол в интравасалните атипични лимфоидни клетки. *Заключение:* Морфологичните и имунохистохимичните данни съответстват на *интравасален едроклетъчен В-клетъчен лимфом.(IVLBCL със CD5 коекспресия).* *Лечение:* Проведени 4 курса R-CHOP. След 4-ти ПХТ курс, поради персистиране на биологичната и параклинична активност се продължава със „ salvage“ режими.

Снимка 3.



Проведени 4 курса R-ESHAP – предстои оценка на терапевтичния отговор. Към момента след 4 –ти курс пациентката е без „ В „ симптоми, но с персистиране на следните лабораторни отклонения: СУЕ 38 mm/h; CRP 38 mg/l ; LDH 1394 IU/ml, β 2mg 4107 ng/mL

Обсъждане и заключение

Интраваскуларният дифузен В-едроклетъчен лимфом е рядък, с агресивна клинична еволюция екстранодален В-клетъчен лимфом, ангажиращ лумена на малките съдове. С оглед редкостта на заболяването, както и разнообразната клинична изява поставянето на навременна и точна диагноза *antemortem* е особено трудно. Видно е и тук, че биопсията с имунохистохимично изследване на взетия материал са без алтернатива за поставяне на диагнозата. От описаните два клинични варианта на интраваскуларният дифузен В-едроклетъчен лимфом, нашият случай е близък до класическия „западен“. Поради трудностите за стадиране и динамична оценка на терапевтичния отговор липсата на консенсус за лечение не е изненада. Сегашните препоръки на базата на малкия опит се основават на химиотерапевтичните режими за лечение на нодалните форми на дифузен В-едроклетъчен лимфом – антрациклин-базираните режими в комбинация с МКА. Натрупването на случаи от тази рядка клинична патология е от значение за изграждането на бъдеща единна диагностична и терапевтична стратегия.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Zuckerman D, Seliem R, Hochberg E. Intravascular lymphoma: the oncologist's "great imitator." *Oncologist*. 2006;11(5):496–502.
2. Pfleger L, Tappeiner J. [On the recognition of systematized endotheliomatosis of the cutaneous blood vessels (reticuloendotheliosis?)]. *Hautarzt* 1959;10:359–363. German.
3. Ansell J, Bhawan J, Cohen S, Sullivan J, Sherman D. Histiocytic lymphoma and malignant angioendotheliomatosis: one disease or two? *Cancer* 1982; 50: 1506–12.
4. Bhawan J, Wolff SM, Ucci AA, Bhan AK. Malignant lymphoma and malignant angioendotheliomatosis: one disease. *Cancer* 1985; 55: 570–76.
5. Wrotnowski U, Mills SE, Cooper PH. Malignant angioendotheliomatosis. An angiotropic lymphoma? *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 244–48.
6. Wick MR, Mills SE, Scheithauer BW, Cooper PH, Davitz MA, Parkinson K. Reassessment of malignant "angioendotheliomatosis". Evidence in favor of its reclassification as "intravascular lymphomatosis". *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 112–23.
7. Gatter KC, Warnke RA. Intravascular large B-cell lymphoma. In: Jaffe EH, Harris NL, Stein H et al., eds. *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Volume 1. Lyon: IARC Press, 2001:177–178.
8. Ferreri AJ, Campo E, Seymour JF et al. Intravascular lymphoma: clinical presentation, natural history, management and prognostic factors in a series of 38 cases, with special emphasis on the 'cutaneous variant'. *Br J Haematol* 2004;127:173–183.
9. Murase T, Nakamura S, Kawauchi K et al. An Asian variant of intravascular large B-cell lymphoma: clinical, patho-

- logical and cytogenetic approaches to diffuse large B-cell lymphoma associated with haemophagocytic syndrome. *Br J Haematol* 2000;111:826–834.
10. Zhao XF, Sands AM, Ostrow PT et al. Recurrence of nodal diffuse large B-cell lymphoma as intravascular large B-cell lymphoma: is an intravascular component at initial diagnosis predictive? *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:391–394.
 11. Carter DK, Batts KP, de Groen PC et al. Angiotropic large cell lymphoma (intravascular lymphomatosis) occurring after follicular small cleaved cell lymphoma. *Mayo Clin Proc* 1996;71:869–873.
 12. Ponzoni M, Arrigoni G, Gould VE et al. Lack of CD 29 (beta1 integrin) and CD 54 (ICAM-1) adhesion molecules in intravascular lymphomatosis. *Hum Pathol* 2000;31:220–226.
 13. Kanda M, Suzumiya J, Ohshima K et al. Intravascular large cell lymphoma: clinicopathological, immuno-histochemical and molecular genetic studies. *Leuk Lymphoma* 1999;34:569–580.
 14. Kato M, Ohshima K, Mizuno M, et al. Analysis of CXCL9 and CXCR3 expression in a case of intravascular large B-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(5):888–891.
 15. Ponzoni M, Ferreri AJ, Campo E, et al. Definition, diagnosis, and management of intravascular large B-cell lymphoma: proposals and perspectives from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3168–73.
 16. Khalidi HS, Brynes RK, Browne P et al. Intravascular large B-cell lymphoma: the CD5 antigen is expressed by a subset of cases. *Mod Pathol* 1998;11:983–988.
 17. Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, et al. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood*. 2007;109(2):478–485.
 18. Molina A, Lombard C, Donlon T, Bangs CD, Dorfman RF. Immunohistochemical and cytogenetic studies indicate that malignant angioendotheliomatosis is a primary intravascular (angiotropic) lymphoma. *Cancer*. 1990;66(3):474–479.
 19. Bouzani M, Karmiris T, Rontogianni D, et al. Disseminated intravascular B-cell lymphoma: clinicopathological features and outcome of three cases treated with anthracycline-based immunochemotherapy. *Oncologist*. 2006; 11(8):923–928.
 20. Tsukadaira A, Okubo Y, Ogasawara H, et al. Chromosomal aberrations in intravascular lymphomatosis. *Am J Clin Oncol* 2002; 25: 178–81.
 21. Rashid R, Johnson RJ, Morris S, et al. Intravascular large B-cell lymphoma associated with a near-tetraploid karyotype, rearrangement of BCL6, and a t(11;14)(q13;q32). *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 171: 101–04.
 22. Vieren M, Sciò R, Robberecht W. Intravascular lymphomatosis of the brain: a diagnostic problem. *Clin Neurol Neurosurg* 1999;101:33–36.
 23. Baehring JM, Longtine J, Hochberg FH. A new approach to the diagnosis and treatment of intravascular lymphoma. *J Neurooncol* 2003;61: 237–248.
 24. Demirer T, Dail DH, Aboulafia DM. Four varied cases of intravascular lymphomatosis and a literature review. *Cancer* 1994;73:1738–1745.34
 25. Stroup RM, Sheibani K, Moncada A et al. Angiotropic (intravascular) large cell lymphoma. A clinicopathologic study of seven cases with unique clinical presentations. *Cancer* 1990;66:1781–1788.
 26. Estalilla OC, Koo CH, Brynes RK et al. Intravascular large B-cell lymphoma. A report of five cases initially diagnosed by bone marrow biopsy. *Am J Clin Pathol* 1999;112:248–255.
 27. Dufau JP, Le Tourneau A, Molina T, et al. Intravascular large B-cell lymphoma with bone marrow involvement at presentation and haemophagocytic syndrome: two Western cases in favour of a specific variant. *Histopathology* 2000; 37: 509–12.
 28. Dufau JP, Le Tourneau A, Molina T, et al. Intravascular large B-cell lymphoma with bone marrow involvement at presentation and haemophagocytic syndrome: two Western cases in favour of a specific variant. *Histopathology* 2000; 37: 509–12.
 29. Murase T, Nakamura S, Tashiro K et al. Malignant histiocytosis-like B-cell lymphoma, a distinct pathologic variant of intravascular lymphomatosis: a report of five cases and review of the literature. *Br J Haematol* 1997;99:656–664.
 30. Murase T, Nakamura S. An Asian variant of intravascular lymphomatosis: an updated review of malignant histiocytosis-like B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1999;33:459–473.
 31. Murase T, Tashiro K, Suzuki T et al. Detection of antibodies to Fasciola and Anisakis in Japanese patients with intravascular lymphomatosis. *Blood* 1998;92:2182–2183.
 32. Larroche C, Mouthon L. Pathogenesis of hemophagocytic syndrome (HPS). *Autoimmun Rev* 2004; 3: 69–75.
 33. Cox ED, Hoffmann SC, DiMercurio BS, et al. Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6. *Transplantation* 2001; 72: 720–26.
 34. Ponzoni M, Ferreri AJ. Intravascular lymphoma: a neoplasm of 'homeless' lymphocytes? *Hematol Oncol*. 2006;24(3):105–112.
 35. Seki K, Miyakoshi S, Lee GH, et al. Prostatic acid phosphatase is a possible tumor marker for intravascular large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28(10):1384–1388.
 36. DiGiuseppe JA, Nelson WG, Seifter EJ et al. Intravascular lymphomatosis: a clinicopathologic study of 10 cases and assessment of response to chemotherapy. *J Clin Oncol* 1994;12:2573–2579.

Адрес за кореспонденция

Васко Гръкланов
Клиника по клинична хематология към
УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД – гр. Пловдив
бул. Васил Априлов 15А
тел.: 0895 716 528
e-mail: vaskogrklanov@yahoo.com

МИЕЛОИДЕН САРКОМ НА ГЛАВАТА НА ПАНКРЕАСА - ПРЕДСТАВЯНЕ НА СЛУЧАЙ И ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

В. Гръкланов, В. Горанова-Маринова, К. Сотирова, П. Георгиев, М. Димитрова, Е. Спасов,
С. Горанов

Клиника по клинична хематология, УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив

MYELOID SARCOMA OF THE PANCREATIC HEAD CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW

V. Graklanov, V. Goranova-Marinova, K. Sotirova, K. Sapunarova, P. Georgiev, M. Dimitrova, E. Spassov,
S. Goranov

Clinic of Clinic Hematology, Medical University, UMHAT "St. George" - Plovdiv

Резюме. Въведение: Миелоидният сарком е рядко злокачествено хематологично заболяване, което представлява изолирани или множествени екстрамедуларни туморни формации, съставени от миелодни левкемични клетки. Може да се наблюдава самостоятелно или едновременно с класическата форма на остра миелоидна левкемия, както при първоначалната изява, така и при рецидив. В литературата липсват данни за големи проучвания върху серии пациенти. По-голямата част от данните са малки ретроспективни наблюдения и съобщения на отделни случаи. **Целта** на това съобщение е да се обобщят публикуваните до момента данни по отношение на клиничното представяне, морфологичните, цитогенетичните и молекулярни характеристики, прогнозата и лечението на миелоидния сарком и да споделим нашия опит при пациент с изолиран МС на главата на панкреаса. **Представяне на случай:** При прегледа на литературата намерихме само 7 подобни случая в света. Мъж на 46 години се представя с холестатична клинична и лабораторна констелация и КТ данни за Ту формация, обхващаща главата на панкреаса с размери 50mm/70mm. Хистологичното изследване показва дифузна пролиферация от атипични миелоидни клетки, МРО (+); CD 15 (+); CD 43(+); CD 34(-/+), Ki-67>70%. Няма данни за инфилтрация на к.м в трепанобиоптата, не се установяват цитогенетични и молекулярни отклонения. Реализирани са 2 индукционни курса ПХТ по режим „7+3“ и ранна интензификация с 3 курса режим hAM. Контролната КТ след 2 и 5 курс е с данни за частичен отговор, 50% редукция на размерите на туморната маса. Поради трудния достъп, радиотерапия не е провеждана. Пациентът е насочен за СКТ. **Обсъждане и заключение:** Приема се, че изолираната форма на МС е с по-добра прогноза, отколкото МС при пациенти с друг съпътстващ миелопрролиферативен процес. При липсата на терапевтичен консенсус за изолираната форма на МС, сегашните препоръки се основават на химиотерапевтични режими за ОМЛ, а в зависимост от локализация – и радиотерапия и /или оперативно лечение. Натрупването на случаи в тази рядка клинична патология е от значение за изграждането на единна диагностична и терапевтична стратегия.

Ключови думи: екстрамедуларен тумор, миелосарком, панкреас, миелоидни левкемични клетки

Summary. Background: Myeloid sarcoma is a rare malignant hematologic disease, which is described as a solitary or multiple extramedullary tumor masses, composed by myeloid leukemic cells. It can develop separately or in the evolution of a classic acute myeloid leukemia in the beginning or in the relapse. There are no literature data on large series of patients, most of the data come from small retrospective observations and single cases.

Aim : To review the available data published concerning the clinical course, morphological cytogenetic and molecular features, prognosis and management of myeloid sarcoma and share our experience in a patient with a solitary MS of the pancreatic head. **Case** There are only 7 such cases described in literature so far. Male, 46 y presented with clinical and laboratory signs of cholestasis and CT data of a Tu mass, infiltrating the pancreatic head 50mm/70mm in size. Histological examination showed diffuse proliferation of atypic myeloid cells MPO (+); CD 15 (+); CD 43(+); CD 34(-

/+), Ki-67>70%. There were no data for leukemic infiltration in the bone marrow, no cytogenetic or molecular aberrations. Two cycles polychemotherapy "7+3" and an early intensification with 3 cycles hAM were administered. After completing the therapy partial response was achieved with 50% reduction of the tumor mass on CT. Radiotherapy was not performed because of the difficult approach to the site. The patient is referred to SCT. **Discussion and conclusion:** It is generally accepted that the solitary form of MS confers a better prognosis than the manifestation parallel to underlying myeloproliferative neoplasm. In the absence of a therapeutic consensus for the isolated form of MS the current recommendations are based on the chemotherapeutical regimens for Acute myeloid leukemia and depending on the localization – radiotherapy and /or surgical resection. The accumulation of cases in this rare clinical entity is important for an unified diagnostic and therapeutic strategy.

Key words: extramedullary tumor, myeloid sarcoma, pancreas, myeloid leukemic cells

Въведение

Миелоидният сарком (МС), известен също като «екстрамедуларна остра миелоидна левкемия», «гранулоцитен сарком» или «хлором» предствлява екстрамедуларна туморна маса, съставена от незрели миелоидни клетки. Описан е за първи път през 1811г. от Burns A¹, а през 1853г е наречен «хлором» от King A², поради зеления отенък, който дава ензима миелопероксидаза (МПО). Пет десетилетия по-късно е установена връзката между МС и острата левкемия. Терминът «гранулоцитен сарком» е въведен от Rappoport, за да се подчертае произходът на туморната маса от миелоидния ред³. МС е включен като самостоятелна нозологична единица в СЗО-класификацията на миелоидните неоплазии от 2008 г.

Честота

Като изолирана екстрамедуларна туморна маса, множествени туморни образувания без системен левкемичен процес или предхождащ неговата поява заболяването е изключително рядко. С честота 2-8% се наблюдава едновременно с класическата форма на остра миелоидна левкемия (ОМЛ). Описани са случаи (<1%) при рецидив след постигната ремисия, както и след алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки. ⁴ По-рядко МС се асоциира с хроничен миело-пролиферативен процес или миелодиспластични синдроми. Среща се във всички възрастови групи, включително при новородени.

Локализация

Според локализацията, най-често ангажира кожата, костите и лимфните възли, а по-рядко са въввлечени централната нервна система, лигавицата на устната и носната кухина, млечните жлези, пикочно-половата система, гръдната стена, плеврата, ретроперитонеума, стомашно-чревния тракт и тестисите.^{5,6,7,8} При децата най-честата локализация е кожата (при 54%), следвана от очната орбита.⁹ Размерите на МС са изключително разнообразни, вариращи от 2 до 20 см, като

клиничната симптоматика зависи от големината и локализацията на процеса и се изразява в компресия на засегнатите структури, болка, органна дисфункция и нерядко хеморагии.¹⁰

Хистологична класификация

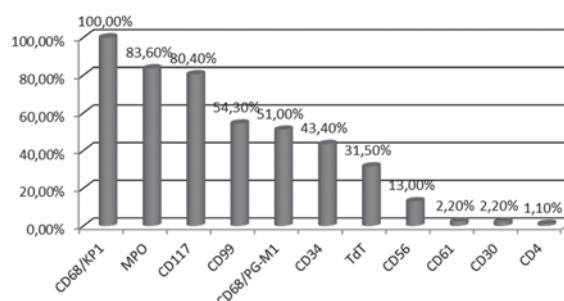
Характерният микроскопски образ на МС представлява дифузна или тип „Indian file” пролиферация от миелоидни бластни клетки с висок митотичен индекс.^{5,11} Въз основа на обширни морфологични и имунохистохимични анализи, са оформени 5 хистологични варианта:

а) незрял гранулоцитен сарком – характеризира се с наличие на > 90% бласти б) диференциран гранулоцитен сарком – наличие на матуриращи неутрофили > 10% от общата маса неопластични клетки; в) монобластен сарком – > 80% монобласти; г) моноцитен сарком - множеството от неопластичните клетки са с изразена лобуларност на ядрата; д) миеломоноцитен сарком - пролиферация на неутрофилни и на моноцитни прекурсорни клетки, като всеки компонент е застъпен с >20%.^{5,11,12}

Фенотип

Имунохистохимията и флоуцитометрията са с решаващо значение за диагнозата (фиг 1). Както е видно, CD68-KP1 се експресира най-често, следван от МПО.^{5,11,13} Възможни са диагностични трудности с неходжкинови лимфоми, недиференциран карцином, меланом, екстрамедуларна хемопоеза или възпалителен процес.¹¹

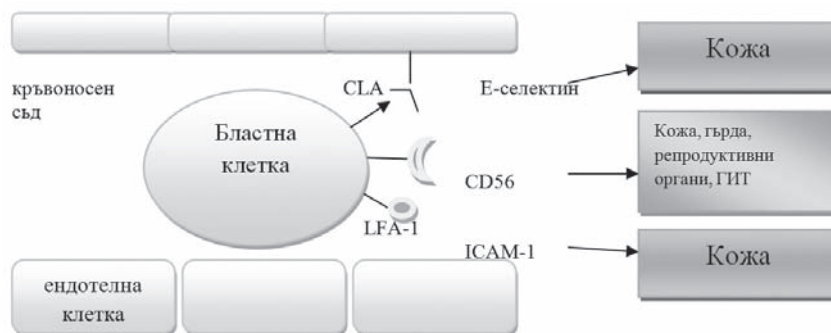
Фиг 1. Най-често експресирани фенотипни маркери при миелоиден сарком при 97 пациенти по Pileri et al¹¹



Патогенеза. В патогенезата на МС основна роля играе изразения тъканния тропизъм на миелоидните бластни клетки, в резултат на аберантна експресия на различни хемокинови рецептори и адхезионни молекули (фиг 1). Според някои автори, високата честота на експресия на бластневрално-клетъчната адхезионна молекула (CD56), както от миелоидните бластни клетки, така и от клетки в млечните жлези, тестисите, яйчниците и гастроинтестиналния тракт, превръща тези органи в предилекционни места за изява на МС.^{14,15} Faaij

et al установяват експресия на хемокинови рецептори върху миелоидни бластни клетки, изолирани от кожата: CCR5, CXCR4, CXCR7 и CX3CR1, които липсват върху бластите при класическа форма на ОМЛ.¹⁶ Stefanidakis и съавт. предполагат, че екстремедуларната болест представлява способност на левкемичните бласти да нахлуват в околните тъкани в резултат на взаимодействието между матриксната металпротеаза-9 (MMP-9) и повърхностния левкоантиген FLA-1 от групата на $\beta 2$ -интегрините.¹⁷

Фигура 2. Повърхностна аберантна експресия върху бластните клетки при миелоиден сарком



Населването на бластни клетки в кожата може би е медирано чрез интеракция между lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) и междуклетъчната адхезионна молекула-1 (ICAM-1) и/или кожния левкоцитен антиген (CLA) и Е-селектин.

Цитогенетична и молекулярна характеристика.

Цитогенетичните аномалии описани при пациенти с МС са разнообразни (табл. 1). По литературни данни подобни отклонения се срещат при около 50% от случаите.¹¹. Най-често екстремедуларно ангажиране се наблюдава при ОМЛ с експресия на „core binding factor“.¹⁸ В различ-

ни проучвания честотата на МС при пациенти с t(8;21) варира между 9 и 35%.^{19,20}. Според Pileri и сътр. inv16 се наблюдава при 4.5% от пациентите (n=92) с характерно засягане на червата от плазмотоидно - моноцитни инфилтрати.¹¹ Falini и сътр. съобщават за честота от около 14% на мутацията на NPM -1 гена при пациенти с МС.²¹ FLT3 мутацията е наблюдавана при около 15% и запазва неблагоприятната си прогностична стойност.

Табл. 1. Цитогенетични аномалии при миелоиден сарком и левкемия на кожата по Richard L et al

хромозомна аномалия	генетична мутация	МС/ левкемия на кожата
t(8;21)	AML1/ETO	МС
inv (16)	CBF β /MYH11	МС
11q23	MLL	МС
t(9;11)		МС
t(8;17)		МС
t(8;16)		МС
t(1;11)		МС
del(16q)		МС
del(5q)		МС
del(20q)		МС
Монозомия 7		МС
тризомия 4		МС
тризомия 8		МС/левкемия на кожата
тризомия 11		МС
тетразомия 8		левкемия на кожата
пентазомия 8		левкемия на кожата

Прогноза

Поради липса на големи серии в литературата, анализът на прогностичните фактори при болни с изолиран МС е труден и противоречив.²² Наличието на МС при диагностицирането на ОМЛ се възприема като лош прогностичен белег и предполага ниска преживяемост, въпреки че съществуват и наблюдения с противоположни резултати. Tsimberidou и сътр. сравняват терапевтичния отговор при 23 пациенти с изолиран МС с този на 1720 пациенти с ОМЛ, диагностицирани в същия период от време²³. Свободната от събития преживяемост (EFS) е по-дълга при 16 пациента с изолиран МС, лекувани с Cytarabin - съдържащи режими ($p = 0.08$). Въпреки това, в многофакторния анализ диагнозата «изолиран МС» не представлява независим прогностичен фактор ($p = 0.11$). При 92 пациента с изолиран МС, МС съпътстващ миелоидна неоплазия (ОМЛ, МПН или МДС) или след друга хемопатия, Pileri и сътр. доказват, че ходът на заболяването, както и отговорът към лечението не зависят от възрастта, пола, анатомичната локализация, клиничната изява (изолиран МС, МС по време или след ОМЛ), миналата анамнеза, морфологичната класификация, имунофенотипа и цитогенетичните аномалии.¹¹ В друго проучване на Lan и сътр. в анализ на 24 пациенти с МС (съпътстващ ОМЛ при 9 болни, ХМЛ – 6, МДС – 2 и изолиран МС – 7), пациентите с МС и основна диагноза ХМЛ или МДС са с по-лоша прогноза, в сравнение с пациентите с МС в хода на ОМЛ.⁵

Лечение

Поради хетерогенната клинична изява на МС и липсата на рандомизирани проспективни проучвания, няма изработена единна терапевтична стратегия. Лечебният подход зависи от развитието на МС самостоятелно като първоначална и единствена диагноза или в хода на ОМЛ; при релапс след пълна ремисия или при прогресия на болестта, от времето на изява и прогностичните фактори при конкретния пациент. Лечението се провежда с конвенционалните химиотерапевтични протоколи, използвани за лечение на ОМЛ. Препоръките са основани на високата честота на прогресия в ОМЛ (88- 100%) при пациенти с изолиран МС, лекувани с локална радиотерапия или оперативно в сравнение с пациенти, лекувани със системна химиотерапия (42%).^{5,8,23} Imrie и сътр. анализират преживяемостта на 90 пациенти с изолиран МС, описани в литературата и съобщават за значително по-дълга преживяемост при пациентите получавали системна химиотерапия.²⁴ Cunningham обобщават 27 случая с изолиран МС на млечната жлеза, при които 11 от общо 12 пациента (92%) лекувани локално са релапси-

рали в сравнение с 5 от 12 (42%) лекувани със системна химиотерапия.⁷

Радиотерапия

Ролята на радиотерапията при миелоидния сарком като допълнение към системната химиотерапия не е уточнена, въпреки че често се прилага в лечебния процес. Tsimberidou и сътр. съобщават че радиотерапията не подобрява общата преживяемост при пациенти с изолиран МС.²⁵ Avni и сътр. при 19 пациента с МС (17 от които и с ОМЛ) са установили, че медианата на преживяемост е еднаква при пациентите, лекувани със системната химиотерапия и радиотерапия, в сравнение с пациентите, лекувани само с химиотерапия.²² Children's cancer group също съобщават за липса на разлика в свободната от болест преживяемост при деца с екстрамедуларна левкемия, лекувани с или без радиотерапия.⁹

Трансплантация на хемопоеични стволови клетки.

Липсват проспективни проучвания за ролята на стволово-клетъчна трансплантация (СКТ) при пациенти с МС. Въпреки че не са общоприети в литературата са оформени няколко индикации. Когато пациентът е с ОМЛ + МС се препоръчва алотрансплантация; при изолиран МС с при пълен отговор - без трансплатация или консолидация с автоложна трансплатация, при частичен отговор - авто- или ало MRD/MUD; при рецидив - алотрансплантация. Трансплантацията на хемопоеични стволови клетки при болни с МС е терапевтична опция и при неблагоприятен прогностичен профил. Avni и сътр. съобщават за достоверно увеличение на общата преживяемост след алогенна СКТ в кохорта от 19 пациенти с изолиран МС и такива с придружаваща ОМЛ. В края на проследяването четирима от пациентите понесли СКТ са живи, в сравнение с нито един от пациентите, които не са били подложени на СКТ ($p = 0.018$).²² В проучване на Chevallier и сътр. върху 51 пациента с МС, понесли СКТ, 5 - годишната обща преживяемост е 47%.²⁶ Ролята на автоложната СКТ при възрастни пациенти с МС е по-слабо проучена. Резултатите от единичните описани случаи показват различен терапевтичен отговор, вероятно във връзка с различните прогностични фактори на всеки отделен случай и нееднородния контингент.

Таргетна терапия

Както при ОМЛ, така и при МС таргетното лечение срещу CD33+ представлява терапевтично предизвикателство. Piccaluga и сътр. докладват 24 CD33+ пациента с ОМЛ, лекувани с Gemtuzumab ozogamicin, от които 5 пациента с МС. Двама от

пациентите са постигнали пълна ремисия, един е бил резистентен на лечението и при двама е постигната пълна ремисия по отношение на екстрамедуларния тумор, но при липса на доказана пълна ремисия в костния мозък.²⁷ Доказването на молекулярни мутации и разработването на таргетни молекули в лечението на ОМЛ, закономерно създава по-широки терапевтични възможности и на болните с МС.

Миелоиден сарком на главата на панкреаса – описание на случай

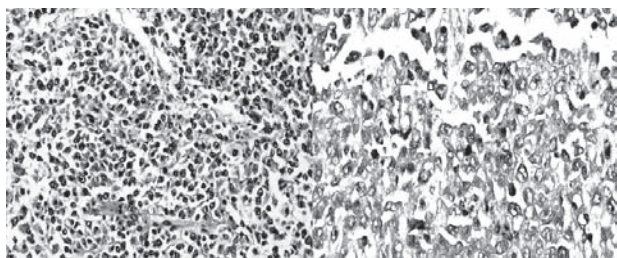
Изолиран миелоиден сарком на главата на панкреаса се среща изключително рядко. В достъпната ни литература намерихме описания на само 7 случая в света (табл. 2). Ние представяме нов случай на МС на главата на панкреаса при пациент без данни за ангажиране на костния мозък от остър или хроничен миелопролиферативен процес.

Мъж на 46 години, без клинично значима придружаваща патология е с оплаквания от дискомфорт в епигастралната област, гадене, пожълтяване на склерите и кожата и потъмняване на урината. От

направените биохимични изследвания е с данни за чернодробна дисфункция, общ билирубин 335.9μmol/l, директен билирубин 299μmol/l, ASAT 254 U/L, ALAT 514 U/L, GGT 745U/L и ALP 667U/L, Амилаза серум и урина, коагулационен статус, пълна кръвна картина и диференциално броене на левкоцити в референтни граници. **КАТ данни:** главата на панкреаса е обхваната от формация с размери 50mm/70mm с резки и неравни очертания, нехомогенна структура и мекотъкнна плътност. Формацията инфилтрира стените на дуоденалната дъга и проминира в лумена, като го стеснява с 2/3. Предприета е диагностична лапаротомия с дебелоиглена биопсия на описаната формация. **Микроскопско изследване** от взетия материал показва фиброзна тъкан, сред която е налице дифузна пролиферация от атипични миелоидни клетки - миелоиден сарком. **Имунохистохимичното изследване** е положително за миелоидно-асоцираните маркери, МРО (+); CD 15 (+); CD 43(+); CD 34(-/+) с висок пролиферативен индекс-Ki-67>70% на бластната популация. Т-клетъчните (CD3;CD5;CD7) и В-клетъчните маркери (PAX-5; CD 20; CD 23), както и EMA и Cytokeratin AE1/AE3 са отрицателни.

Табл. 2. Клинични и лабораторни данни при описаните в литературата пациенти с изолиран миелоиден сарком на панкреаса

автор	пол/ год	симптоми	локализация на процеса	костен мозък	терапевтично поведение	отговор към лечението
King et al ⁴⁷	Ж/36	жълтеница, епигастрална болка	глава на панкреас	Нормален	ХТ, локална лъчетерапия	Пълен отговор
Moreau et al ⁴⁸	Ж/37	жълтеница, епигастрална болка, респираторни инфекции	глава на панкреас	60% ангажиране от ОМЛ	неизвестно	неизвестно
Marcos et al ⁴⁹	М/32	болка в десен горен квадрант	глава на панкреас	Нормален	Whipple оперативно, ХТ	Пълен отговор
Ravandi-Kashani et al ⁵⁰	М/31	жълтеница, епигастрална болка	глава на панкреас	6% ангажиране от ОМЛ	ХТ	Пълен отговор
Ravandi-Kashani et al ⁵⁰	Ж/61	епигастрална болка	глава на панкреас	78% ангажиране от ОМЛ	ХТ	Пълен отговор, релапс с екзитус
Servin-Abad et al ⁵¹	М/64	жълтеница, лека епигастрална болка	глава на панкреас	Нормален	ХТ	Пълен отговор, екзитус от мозъчен инсулт
Rong et al ⁵²	М/40	жълтеница, консумация на телло	глава на панкреас	Нормален	Whipple оперативно, ХТ	Пълен отговор
Li XP et al ⁴⁶	Ж/48	силна болка в ляв горен квадрант, панцитопения, фебрилитет	опашка на панкреас	Нормален	Спленектомия, панкреатектомия	Екзитус от релапс 3 месеци по-късно
Наш случай	М/46	Жълтеница, епигастрална болка, гадене, втрисане	глава на панкреас	Нормален	ХТ	Парциален отговор след ХТ, предстои СКТ



Фиг. 3. Оцветяване с Н&Е. Инфилтрация от незрели миелоидни клетки в панкреаса. (Д) Оцветяване с МРО -100% (+)пол.

Миелограма и трепанобиопсия: без данни за ангажиране на костния мозък от остър или хроничен миелопротрофиеративен процес. **Класическият цитогенетичен анализ** установява нормален мъжки кариотип. **Молекулярно-генетичният анализ** не доказва наличие на фузионните гени M-BCR-ABL ; m-BCR-ABL ; AML1-ETO ; CBF β -MYH; FLT3-ITD. Следоперативно пациентът е с референтни стойности на всички изследвани показатели от пълната кръвна картина, биохимичните изследвания и туморните маркери СЕА, СА 19-9 и СА 72-4. Реализирани са 2 индукционни курса ПХТ по режим „7+3” и ранна интензификация с 3 курса режим hAM. След 2 и 5 курс е с данни за частичен отговор, с КТ данни за 50% редукция на размерите на туморната маса. Поради трудния достъп, радиотерапия не е провеждана. Пациентът е насочен за СКТ.

Обсъждане и заключение

Миелоидния сарком е рядко срещано заболяване като поставянето на точната хистологична диагноза, особено при изолирана форма и при липса на системни симптоми е трудно. Решаващи са насочените морфологични, цитохимични, имунохистохимични и генетични изследвания. Представеният от нас случай по клинична картина и терапевтично повлияване е подобен на другите 4 случая с изолиран сарком на панкреаса. Не можем да коментираме нашата последваща терапевтична опция – СКТ, тъй като нито един от описаните в литературата не е включен в трансплантационна програма. Счита се, че изолираната форма на МС е с по-добра прогноза, отколкото МС при пациенти с друг съпътстващ миелопротрофиеративен процес. При липсата на терапевтичен консенсус за изолираната форма на МС, сегашните препоръки се основават на химиотерапевтични режими за ОМЛ, а в зависимост от локализацията - радиотерапия и /или оперативно лечение. Натрупването на случаи в тази рядка клинична патология е от значение за изграждането на единна диагностична и терапевтична стратегия.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Burns A. Observations of Surgical Anatomy in Head and Neck. Edinburgh, United Kingdom: Thomas Royce; 1811.
2. King A. A case of chloroma. Monthly J Med. 1853; 17:97.
3. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. In: Atlas of Tumor Pathology, Section III, Fascicle 8. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1967.
4. Szomor, A., Passweg, J.R., Tichelli, A., Hoffmann, T., Speck, B. and Gratwohl, A. (1997) Myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome relapsing as granulocytic sarcoma(chloroma) after allogeneic bone marrow transplantation. Ann Hematol 75: 239241.
5. Lan, T.-Y., Lin, D.-T., Tien, H.-F., Yang, R.-S., Chen, C.-Y. and Wu, K. (2009) Prognostic factors of treatment outcomes in patients with granulocytic sarcoma. Acta Haematol 122: 238-246.
6. Neiman, R.S., Barcos, M., Berard, C., Bonner, H., Mann, R., Rydell, R.E. et al. (1981) Granulocytic sarcoma: a clinicopathologic study of 61 biopsied cases. Cancer 48: 1426-1437.
7. Cunningham, I. (2006) Extramedullary sites of leukemia relapse after transplant. Leuk Lymphoma 47: 1754-1767.
8. Yamauchi, K. and Yasuda, M. (2002) Comparison in treatments of nonleukemic granulocytic sarcoma: report of 2 cases and a review of 72 cases in the literature. Cancer 94: 1739-1746.
9. Dusenbery, K.E., Howells, W.B., Arthur, D.C., Alonzo, T., Lee, J.W., Kobrinsky, N. et al. (2003) Extramedullary leukemia in children with newly diagnosed acute myeloid leukemia. J Pediatr Hematol Oncol 25: 760-768.
10. Pui, M.H., Fletcher, B.D. and Langston, J.W. (1994) Granulocytic sarcoma in childhood leukemia: imaging features. Radiology 190: 698-702.
11. Pileri SA, Ascani S, Cox MC, et al. Myeloid sarcoma: clinico-pathologic, phenotypic and cytogenetic analysis of 92 adult patients. Leukemia. 2007;21(2):340-350.
12. Alexiev, B., Wenle Wang, Yi Ning, Saranya Chumsri, Ivana Gojo, William H Rodgers, Sanford A Stass and Xianfeng F Zhao (2007) Myeloid sarcoma : a histologic, immunohistochemical and cytogenetic study . Diagnostic pathology 2:42
13. Menasce, L.P., Banerjee, S.S., Beckett, E. and Harris, M. (1999) Extra-medullary myeloid tumor(granulocytic sarcoma) is often misdiagnosed: a study of 26 cases. Histopathology 34: 391-398.
14. Byrd JC, Weiss RB. Recurrent granulocytic sarcoma: an unusual variation of acute myelogenous leukemia associated with 8;21 chromosomal translocation and blast expression of the neural cell adhesion molecule. Cancer. 1994;73(8): 2107-2112.
15. Garin-Chesa P, Fellerger EJ, Huvos AG, et al. Immunohistochemical analysis of neural cell adhesion molecules: differential expression in small round cell tumors of childhood and adolescence. Am J Pathol. 1991;139(2): 275-286.
16. Faaij, C.M., Willemze, A.J., Revesz, T., Balzarolo, M.,

- Tensen, C.P., Hoogeboom, M. et al. (2010) Chemokine/chemokine receptor interactions in extramedullary leukaemia of the skin in childhood AML: differential roles for CCR2, CCR5, CXCR4 and CXCR7. *Pediatr Blood Cancer* 55: 344-348.
17. Stefanidakis, M., Karjalainen, K., Jaalouk, D.E., Gahmberg, C.G., O'Brien, S., Pasqualini, R. et al. (2009) Role of leukemia cell invadosome in extramedullary infiltration. *Blood* 114: 3008-3017.
 18. Richard L. Bakst, Martin S. Tallman, Dan Douser and Joachim Yahalom (2011) How I treat extramedullary acute myeloid leukemia 118:3785-3793
 19. Byrd, J.C., Weiss, R.B., Arthur, D.C., Lawrence, D., Baer, M.R., Davey, F. et al. (1997) Extramedullary leukaemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21) (q22;q22) : Results from cancer and leukaemia group B 8461. *J Clin Oncol* 15: 466-475.
 20. Tallman, M.S., Hakimian, D., Shaw, J.M., Lissner, G.S., Russell, E.J. and Variakojis, D. (1993) Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 11: 690-697.
 21. Falini, B., Lenze, D., Hasserjian, R., Coupland, S., Jaehne, D., Soupir, C. et al. (2007) Cytoplasmic mutated nucleophosmin (NPM) defines the molecular status of a significant fraction of myeloid sarcomas. *Leukemia* 21: 1566-1570.
 22. Avni B, Koren-Michowitz M (2011) Myeloid sarcoma : current approach and therapeutic options. *Therapeutic Advances in Hematology* 2011 2: 309
 23. Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Wen S, et al. Myeloid sarcoma is associated with superior event-free survival and overall survival compared with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008; 113(6):1370-1378.
 24. Imrie, K.R., Kovacs, M.J., Selby, D., Lipton, J., Patterson, B.J., Pantalony, D. et al. (1995) Isolated chloroma: the effect of early antileukemic therapy. *Ann Intern Med* 123: 351-353.
 25. Tsimberidou, A.M., Kantarjian, H.M., Estey, E., Cortes, J.E., Verstovsek, S., Fadel, S. et al. (2003) Outcome in patients with nonleukemic granulocytic sarcoma treated with chemotherapy with or without radiotherapy. *Leukemia* 17: 1100-1103.
 26. Chevallier, P., Labopin, M., Cornelissen, J.J., Socie, G., Ljungman, P.T., Lioure, B. et al. (2010) Allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) for isolated and leukemic myeloid sarcoma (GS): a survey on behalf of the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of EBMT. In ASH Annual Meeting Abstracts.
 27. Piccaluga, P.P., Martinelli, G., Rondoni, M., Malagola, M., Gaitani, S., Isidori, A. et al. (2004) Gemtuzumab ozogamicin for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and myeloid sarcomas. *Leuk Lymphoma* 45: 1791-1795.

Адрес за кореспонденция:

Васко Гръкланов
Клиника по клинична хематология към
УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД – гр. Пловдив
бул. Васил Априлов 15А
тел.: 0895 716 528
e-mail: vaskogrklanov@yahoo.com

ОСТРА ПАНМИЕЛОЗА С МИЕЛОФИБРОЗА – ОПИСАНИЕ НА СЛУЧАЙ И ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

В. Бабачева, В. Горанова-Маринова, П. Георгиев, К. Сотирова, М. Димитрова,
Е. Спасов, С. Горанов

Клиника по клинична хематология, УМБАЛ "Св. Георги" - Пловдив

ACUTE PANMYELOSIS WITH MYELOFIBROSIS CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW

V. Babacheva, V. Goranova-Marinova, P. Georgiev, K. Sotirova, M. Dimitrova,
E. Spassov, S. Goranov

Clinic of Clinical Hematology, Medical University – Plovdiv, UMHA "St. George" - Plovdiv

Резюме. Острата панмиелоza с миелофиброза (ОПМФ) е изключително рядко срещано заболяване. Може да се развие като клонално хемопоетично нарушение или като резултат на токсична експозиция на костния мозък. Дълго време е имало противоречия и дискусии, дали ОПМФ трябва да се разглежда като хиперфибротичен (de novo) миелодисплазиен синдром, като остра миелоидна левкемия (ОМЛ) или остра токсична миелопатия с придружаваща миелофиброза. Поради редкостта на болестта, повечето литературни данни са неголеми ретроспективни проучвания и доклади на отделни случаи. Към настоящия момент ОПМФ се отнася към групата на ОМЛ, некатегоризирани другаче (СЗО) с честота <1% от ОМЛ. Клинично пациентите се представят с панцитопения, незначителен процент бласти в периферната кръв, без или с нискостепенна спленомегалия, панмиелоza и фиброза в костния мозък. Началото е остро, еволюцията - бърза и с летален изход. Преживяемостта е средно от 2-9 месеца. ОПМФ е болест на възрастните, но има описани случаи и при деца. Липсва консенсус по отношение на терапевтичното поведение.

Представяме случай на типична форма на ОПМФ: панцитопения, малък процент бласти в периферна кръв, липса на спленомегалия, хиперцелуларен костен мозък с фиброза. Диагнозата е поставена чрез изследване на трепанобиоптат с характерни хистологични и ИХХ данни. Диагнозата е потвърдена в центъра за Транслиращи изследвания, НСБАЛХЗ, София. Класификационното отнасяне на ОПМФ към острите миелоидни левкемии определя и терапевтичния подход. В конкретния случай стандартната химиотерапия не повлиява болестта, а инфекциозните усложнения допълнително затрудняват лечението. Доказва се изключително агресивното протичане на ОПМФ и очаквания бърз летален край.

Ключови думи: остра панмиелоza, миелофиброза, остри миелобластни левкемии

Summary. Acute panmyelosis with myelofibrosis (APMF) is an ill-defined disorder. It may either evolve as a clonal hematopoietic condition or as a sequel of toxic exposure to the bone marrow (BM). There were a lot of controversy and discussion as to whether APMF may be considered as a hyperfibrotic (de novo) myelodysplastic syndrome (MDS), as acute myeloid leukemia (AML) or as a severe toxic myelopathy with accompanying myelofibrosis. The disease is rare and there is lack of information. APMF is classified as AML, not otherwise categorized (WHO), its frequency is less than 1% of AML. Clinically patients present with pancytopenia, a very few blasts in the peripheral blood and no or little splenomegaly, panmyelosis and significant bone marrow fibrosis. APMF is an acute disorder with rapidly fatal course. Prognosis is unfavorable with a median survival of less than 1 year (between 2-9 months). The disease usually occurs in adults, but rare cases have been described in children. There is no consensus of how APMF must be treated. We present a case of typical APMF – pancytopeny, low percentage of blast in the peripheral blood, no splenomegaly, hypercellular bone marrow with fibrosis. The diagnosis was made by trephine biopsy with typical histological and histochemical findings. The diagnosis was confirmed by the Center for translational research in Hematology, Sofia. The classification of APMF in the group of AML defines the therapeutic approach. In our case the standard chemotherapy does not result in therapeutic response, infectious complications deteriorate the prognosis. We confirm the aggressive course of the disease and the fast lethal end.

Key words: acute panmyelosis, myelofibrosis, acute myeloid leukemia

Въведение

През 1963 г. Lewis и Szur описват кръвно заболяване, което наричат "малигнена миелосклероза"¹, характеризиращо се с остро клинично протичане, бързо развитие на периферна цитопения с левкоертиробластоза, липса на значима спленомегалия и костно - мозъчните промени, наподобяващи класическата миелофиброза. Подобни нарушения са описани като остра миелофиброза, остра миелосклероза, остра мегакариоцитна миелофиброза и остра миелодисплазия с миелофиброза²⁻⁵.

Честота и класификация

Поради рядкостта на заболяването, истинската му честота е трудно установима. Повечето литературни данни са неголеми ретроспективни проучвания или доклади на отделни случаи. Дълго време острата панмиелоза с миелофиброза не е приемана за отделно заболяване. Едва в класификацията на СЗО от 2001г е включена в групата на острите миелоидни левкемии, неклассифицируеми другаде¹¹. В класификацията на СЗО от 2008г (APMF, ICD-O code 9931/3) също присъства като подтип на ОМЛ, некатегоризирана. Честотата на ОПМФ, според СЗО е 1%-2% от ОМЛ, докато, според други източници е <1%⁹. Възможно е ниската честота на заболяването да е и резултат от поставяне на друга диагноза. ОПМФ може да възникне както de novo, така и вторично, резултат на предшестващо миелотоксично лечение, включително и радиотерапия.

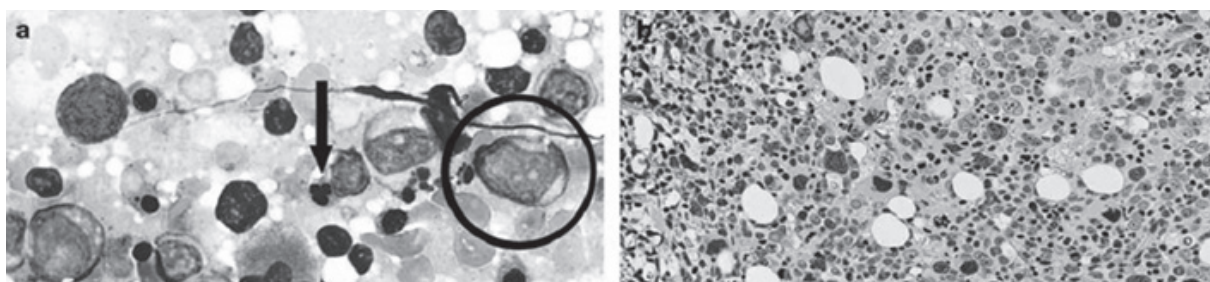
Клинична картина

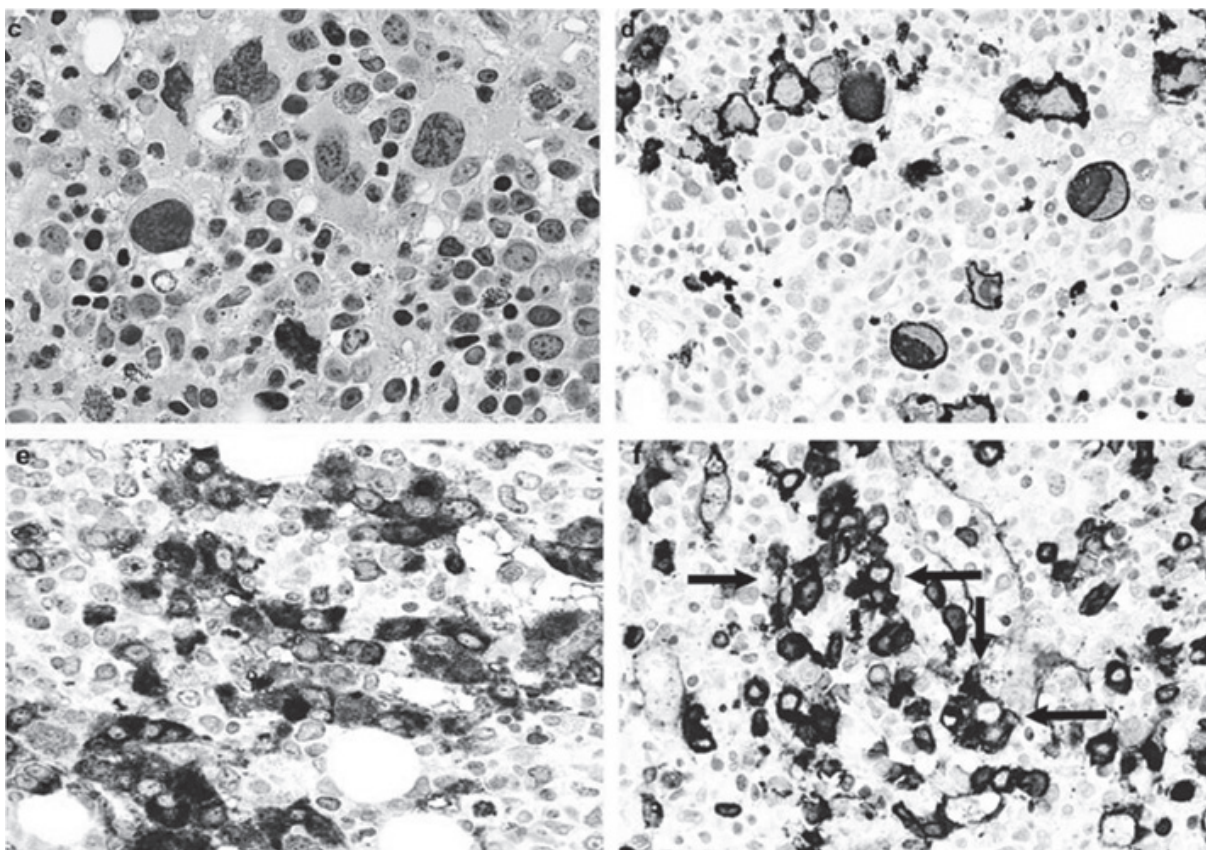
Оплакванията при ОПМФ са неспецифични-астено-адинамия, фебрилитет с втрисания, загуба на тегло, хеморагична кожно-лигавична диатеза и др. Не се установява или има лека спленомегалия. Клиничната еволюция е с много бърза прогресия и се характеризира с костномозъчна недостатъчност и развитие на ОМЛ. Преживяемостта обикновено е по-малко от година^{10,16} (средно от 2 до 9 месеца). Прави впечатление периферната цитопения, която обикновено обхваща и трите кръвни реда. Еритроцитите не показват белези на изявена пойкилоцитоза и анизоцитоза, липсват дакроцити. Както стана ясно, при ОПМФ обикновено има малко миелобласти < 5%) в ДКК с оле-

вяване и наличие на незрели неутрофили, без базофилия или моноцитоза, но диспластичните промени в миелоидните клетки са чести^{6,11}. Разграничаването от ОМЛ с миелофиброза, особено мегакариоцитния вариант²⁸, хиперфибротичния МДС^{12,14-20} и остра токсична миелопатия с миелофиброза понякога създава трудности. Тези пациенти се представят с остра панцитопения и обичайно малък брой бласти в периферна кръв, фиброза на костния мозък, асоциирана с диспластична хематопоеза. Последната се характеризира с незрялост и дефект в диференциацията, включваща всички три линии, но без увеличение на бластите^{5,10,11}.

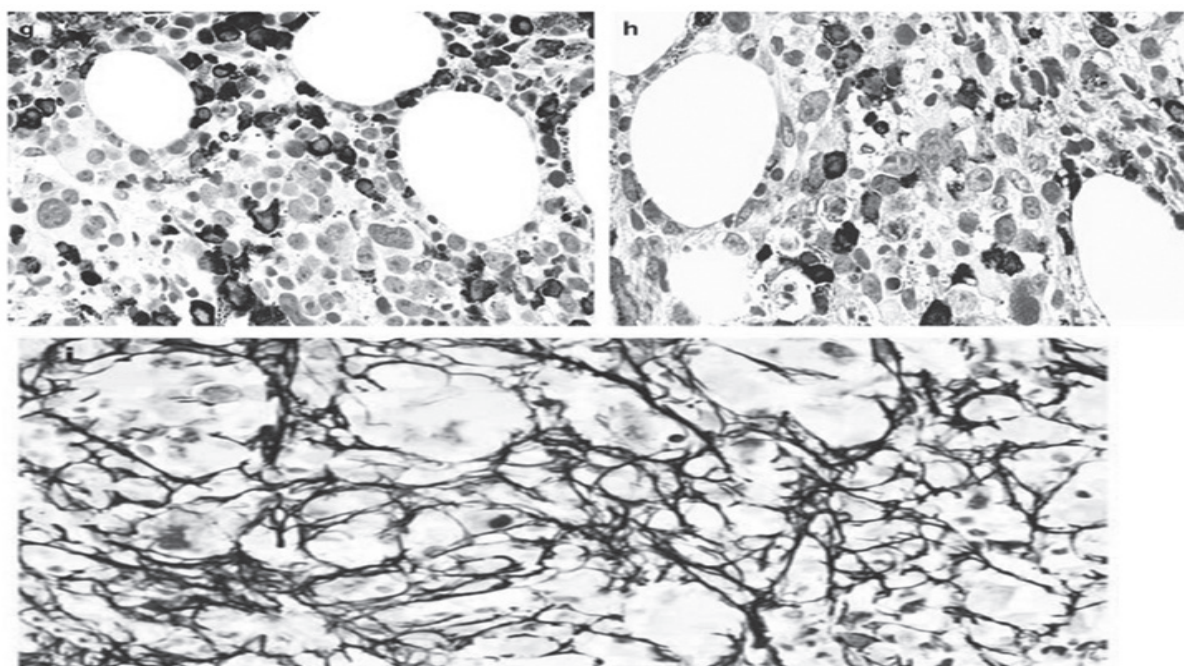
Хистопатология на костен мозък

Костномозъчните аспирати обикновено са сухи (dry tap). Диагнозата се поставя от костномозъчна биопсия с имунохистохимия. Най-често костния мозък е хиперцелуларен с дисплазия и на трите костномозъчни редици. Най-отличителна е релативната хиперплазия на олевената макроцитна еритропоеза (дисеритропоеза), придружена с мален неутрофилен брой (фиг 1 с-е). Лизозимпозитивни миеломоноцитни клетки и СД34+ прогениторни клетки са разпръснати в к.м., но макар и рядко се образуват клъстери от бластни клетки, наподобяващи атипично разположени незрели прекурсори. Много често са налице отклонения в мегакариоцитопезата - най-често увеличаване на броя на мегакариоцитите със загуба на сгруппираността им (фиг 1е и 1а). Има значителни аномалии в диференциацията им с превалиране на малки, „джудже“ тип мегакариоцити. Нарушена е нормалната ядрено-цитоплазмена матурация (дисмегакариоцитопоеза), проявяваща се с компактни хиполобулирани ядра, заобиколени от оскъдна цитоплазма (фиг. 1а). Тези диспластични мегакариоцити са почти идентични с мегакариоцитите при МДС²¹⁻²³. Често се открива интерстициална реакция. Освен голямото количество макрофаги (подредени като мрежа), в около 50% от пациентите се наблюдават реактивни лимфоидни нодули, съдържащи В и Т лимфоцити. Може да има периваскуларна инфилтрация от плазматични клетки, големи макрофаги, натоварени с хемосидеринови депозити от предшестващата трансфузионна терапия и увеличен брой микросъдове⁶.





Фиг 1 (Данни по Orazi et al[®]) Остра панмиелоза с миелофиброза (а) костномозъчна биопсия от пациент с ОПМФ. С кръг е ограден миелобласт, с дебела стрелка е посочен трилобулиран диспластичен еритробласт, а с тънка стрелка- малък диспластичен мегакариоцит. (b, c) Хиперцелуларен костен мозък, резултат от мултилинеарна пролиферация/ панмиелоза/. Множество хиполобулиране диспластични мегакариоцити с диспергиран хроматин, както и голямото количество бласти (d, e) Имунпероксидазна реакция за CD42b (d) , LAT и CD34 (e). И двата маркера се експресират от мегакариоцитите и подчертават превалирането на малки по размер абнормни форми, които характеризират случаите на ОПМФ(f) Имунпероксидазна реакция за Ат към CD34. Показани са множество CD34- позитивни бласти, групирани в клъстери и агрегати.



(g, h) Участъци от костно мозъчни биопсии от пациенти с ОПМФ фиксирани с антимиелопероксидаза(g) и антихемоглобинови(h) антитела. Забележете мултилинеарната природа на прекурсорните клетки, които включват както миелоидни, така и еритроидни прекурсори (i) Костномозъчна биопсия от пациент с ОПМФ , положителен за ретикулин(Gomori stain). Налице е дифузна фиброза (gr 3).

В част от пациентите костния мозък е хипо- към нормоцелуларен , като промените наподобяват тези, наблюдавани при токсична миелопатия²⁶, дължаща се на експозиция на различни миелотоксични агенти^{24,25}. Последващите изследвания при тези болни обикновено показват задълбочаване на хипоцелуларитета с интерстициален оток, като се срещат малки острови от макроцитни еритроидни прекурсори и микромегакариоцити. Клинично описаните промени са свързани с развитие на остра костно-мозъчна недостатъчност, като това е най-честата причина за смърт. В голям процент от пациентите се развива ОМЛ¹¹ с дифузно ангажи-

ране от клъстери лизозим експресиращи миело- моноцитни бласти и СД34+ прекурсорни клетки. Често, в резултат на множеството трансфузии, голяма част от макрофагите съдържат желязни гранули⁶.

Имунохистохимия В болшинството от случаите костно-мозъчните бласти показват експресия на ранни CD34 и линейния неспецифичен антиген HLA –DR. Ранните миелоидни антигени CD13 и CD33 са експресирани в значителен процент от болните. Рядко се срещат моноцитни антигени СД14 и СД68 , както и мегакариоцитния антиген СД61 и еритроидно -клетъчния антиген GrA .

Таблица №1 Имунофенотипен профил (В %) на бластни клетки при 7 пациента с ОПМФ (по N.Suvajdzic et al²⁷)

Пациент	HLA-DR	CD34	CD13	CD33	CD11b	CD15	CD61	CD41	GrA	CD14	CD3	CD2	CD7	CD19	CD10
No1	86	43	31	69	76	9	nd	1	12	48	10	20	20	14	11
No2	62	41	38	nd	27	5	nd	1	1	1	39	53	nd	7	1
No3	57	57	67	70	56	2	14	5	3	29	14	25	32	6	1
No4	40	6	22	59	nd	nd	1	1	1	3	26	31	28	2	4
No5	33	38	5	9	19	nd	16	2	36	6	3	nd	nd	3	nd
No6	91	85	69	4	nd	nd	10	nd	0	0	11	nd	87	2	nd
No7	78	52	74	68	28	10	21	14	3	21	19	20	60	1	4

nd=не е изследван

Таблица 2. Имунофенотипен профил на бластни клетки при 4 пациента с ОПМФ (по Orazi et al⁹)

Пациент	Имунофенотип
No1	HLA-DR, CD117, CD33, CD34, CD13,
No2	HLA-DR, CD34, CD117, CD33, CD15, CD38, CD61a
No3	HLA-DR, CD33, CD34, CD117, CD13 CD7, CD15, myeloperoxidase
No4	CD13, CD117, CD7, CD34

Цитогенетика Не са известни специфични цитогенетични аномалии при заболяването. В таблици № 3,4 са посочени резултатите от кариотипа при пациенти с ОПМФ от колективите на N.Suvajdzic и A Orazi^{27,9}.

Таблица 3. Цитогенетични отклонения при пациенти с ОПМФ (по N.Suvajdzic et. al²⁷)

Номер на пациента	Кариотип
1	47,XY,inv(1)(p22q42),t(2;13)(q33;q32),-4,t(7;12)(q36;q13),+11[12]
2	46,XX,del(22)(q13)[2]/46,XX[6]
3	46,XX[8]
4	Не е осъществен
5	45,X,-Y,del(5q)(q13q31)[8]
6	46,XY,inv(16)(p13q22),del(17)(q21q23)[2]/46,XY[11]
7	46,XY,del(3)(q21q26)[5]/46,XY,del(12)(p12)[4]/46,XY[10]
8	46,XY,add(22)(p11) [2]/46,XY[12]
9	49,XX,- 6,+4mar[15]/46,XX[9]
10	48,XX, t(1;5)(q42;q13),+t(1;12)(q23;p13),- 13,+18 [4]/ 51,idem,+2,+8,+19[3]/46,XX[13]
11	46,XX[15]
12	Не е осъществен

[]- брой анализирани метафази

Таблица №4 Цитогенетични отклонения при пациенти с ОПМФ (по A Orazi et al.⁹)

Номер на пациента	Кариотип
1	43,XY,del(5)(q13q33), 7,ins(11;?)(q13;?), 17,add(18)(q21.3), 20,?dic(20;21)(q11.2;p11.2)[6].
2	недостатъчно метафази (46,XX [2]).
3	4648,XY,del(5)(q15q13),del(6)(q21q25),del(7)(q22q36),78,del(11)(p11.2p15), 13,add(19)(p13.3),7marker chromosomes[cp16].
4	4648,XY,del(5)(q15q13),del(6)(q21q25),del(7)(q22q36),78,del(11)(p11.2p15), 13,add(19)(p13.3),7marker chromosomes[cp16].
5	недостатъчно метафази (46,XY [1]).
6	46,XY,del(5)(q31q35) [3]a

Видно е, че при ОПМФ имат цитогенетични нарушения, като най-често се срещат частична загуба на хромозома 5q или отклонения в хромозома 7. Почти при всички случаи кариотипът наподобява този при агресивни МДС или вторични (след МДС) остри левкемии.

Лечение, изход и преживяемост. Липсва консенсус по отношение на терапевтичното поведение. Патогенезата и отнасянето на ОПМФ към ОМЛ в повечето случаи предопределят и лечебния подход (табл.5)

Табл №5 Лечение, отговор, изход и преживяемост на пациенти с ОПМФ (по N. Suvajdzic et. al²⁷)

Пациент №	Терапия	Отговор*	DFS (в месеци)	Преживяемост (в месеци)
1	Adr+Cy (3+7)	не		2
2	Adr+Cy(3+7)	да	11	13
3	Adr+Cy(3+7)	да	7	9
4	Cy+Hy+aD3	не		6
5	Cy+6-TG(7)	не		2
6	Cy+6-TG(7)	не		1
7	Adr+Cy+VP-16 (3+5+8)	не		1
8	Cy+Hy+aD3	не		5
9	Adr+Cy+VP-16 (3+5+8)	не		1
10	Cy+Hy+aD3	не		1
11	Cy+6-TG(7)	не		2
12	Adr+Cy+VP-16 (3+5+8)	не		1

DFS=disease free survival, Adr=adriablastine, Cy=cytosine arabinoside, 6-TG=6-thioguanine, Hy=hydroxyurea, VP-16=vepeside (aD3=1-25 dihydroxycholecalciferol

Опитите за лечение на ОПМФ със стандартните химиотерапевтични схеми обикновено завършват с летален изход за много кратък интервал от време. Това налага да се търсят нови подходи в терапевтичното поведение.

Има данни за повлияване костно-мозъчната фиброза с Lenalidomide, до трансфузионна независимост и възстановена хемопоеза⁷. Подобни данни не са изненада, предвид еднотипните цитогенетични отклонения, свързани с хромозома 5. В литературата се посочват и добри резултати от приложението на БФ при болни с ОПМФ, особено при тенденция за хиперкалциемия⁸.

Стволово-клетъчната трансплантация е съвременна опция за пациентите с ОПМФ, но съобщенията са единични и с противоречиви резултати²⁹. Преживяемостта на болните с ОПМФ е <1 година (средно от 2-9 месеца). Причина за смъртта, обик-

новено е развитието на тежка костно-мозъчна недостатъчност или остра миелоидна левкемия, обикновено резистентна на лечение (табл.6).

Таблица 6. Преживяемост на пациенти с ОПМФ (по A Orazi et al.⁹)

Пациент №	Възраст	Пол	Преживяемост
1	74	М	М—27 дни
2	79	Ж	М—35дни
3	57	М	М—16 мес
4	70	М	М—14 дни
5	65	М	ЖСБ—31 мес
6	79	М	М—32 дни

М¼ починал; ЖСБ¼ жив с болест; НД¼ няма данни

Заклучение

Макар и рядкост, острата панмиелоza с миелофиброза трябва да влезе в съображение при пациенти с остро начало на болестта, неспецифични оплаквания, панцитопения, малък процент бластни клетки в периферната кръв, без или с нискостепенна спленоомегалия. Диагнозата е хистопатологична. Повечето случаи на ОПМФ се характеризират с к.м. фиброза с хиперплазия и олевяване и на трите к.м. реда и диспластични мегакариоцити, основно с малки размери, показващи различна степен атипизъм, включително и наличието на хипобулирани или нелобулирани ядра. Фокуси от бластни клетки се откриват разпръснати в к.м., като количеството им варира. Протичането е еволютивно и завършва с летален изход. Стандартната химиотерапия не дава резултат, а опитите за повлияване с други медикаменти са все още при единични случаи. Клиничен случай с остра панмиелоza с миелофиброза:

Клиничен случай: Мъж на 56 г. постъпва по спешност с данни за панцитопения и анамнеза

за хемоптиза, фебрилитет до 39,2С с втрисане. Лекуван амбулаторно за остра вирусна инфекция. Приемал големи дози антипиретици и антибиотици без ефект. Работил над 10 г в среда с повишено радиационно ниво. Пациентът е в увредено общо състояние. ECOG PS 3. Фебрилен 39С. Анамични кожа и видими лигавици, без данни за хеморагична диатеза, периферна лимфаденомегалия или спленоомегалия. Единични дребни влажни хрипове в двете белодробни основи без огнищен характер. Нормален сърдечен статус.

Параклинични показатели:

CYE	>150 mm ↑	ALT	78 U/l ↑
HGB	77 g/l ↓	AST	108 U/l ↑
WBC	0,8 G/ ↓	ALP DEA	389 U/l ↑
PLT	16 G/ ↓	GGT	310 U/l ↑
ДКК	Seg 0,30, Eo 0,02, Mo 0,08, Ly 0,60	FIB	8,44 g/l ↑
LDH	446 U/l	B2-μgl	1,98 mg/l ↑

Други изследвания

Миелограма	суха стернална пункция.
Цитогенетичен анализ	поради липса на метафази не може да бъде проведен хромозомен анализ
Флуоцитометрия	Нормално съотношение на лимфоидния пул. Миелоидни маркери и маркери за активация /-/-; CD 34 и cyCD3 14% ; CD 45 90%; HLA-DR 20%
Хемокултури	Отрицателни за бактерии и гъби
Серология	HCV, HBsAg, Wass, HIV, EBV, ANA, CMV – отрицателни
Абдоминална ЕхоГр	Без отклонения
Пулмография	Без значими отклонения
КАТ	уплътнена плевра в ляво дорзално с малък плеврален излив; леко уголемен десен надбъбрек Суспектен л.в.- 11mm паратрахеално. В дясно единични горно - гранични ингвинални л.в. Имбириране и уплътнение на десен глутеус Уплътнение и задебеление на меките тъкани на ляв крак
Трепанобиопсия	Хиперцелуларен к.м. за сметка на пролиферация на всички хемопоеични популации, представени предимно от бласти и миелоидни прекурсори при силно изразена редукция на зрели форми. Еритробластна популация с хистологични белези на мегалобластоидизъм, микромегакариоцити. Обилие от плазмацити. Glycophorin A положително маркира групи от еритробласти, които представляват до 20% от общия клетъчен състав; CD34 положително маркира бласти и прекурсори, които преставляват около 50%; CD61 положително маркира мегакариобласти и отделни мегакариоцити, които представяват общо окол 10-15%; MPO положително маркира бласти и миелоидни прекурсори, които представляват около 10-15%; TdT отрицателна реакция. Gomori- умножена ретикулна мрежа. MF2CD3 и CD7 пръснати поединично. Положително маркирани Т-лимфоцити. CD22 -пръснати поединично положително маркирани В-лимфоцити. CD56 положително маркира отделни лимфоцити и част от бластните клетки; CD138 положително маркира групи от плазмацити, които представляват около 10% от общия клетъчен състав.

На основание на трепанобиопсичните и имунохистохимичните данни е възприета диагнозата : остра панмиелоza с миелофиброза.

В хода на пролежаването състоянието на пациента се влошава от тежки инфекциозни процеси: флегмон на лявата ръка и десния глутеус, наложили хирургическо лечение. При стабилизиране на състоянието и Нв след продължителна симптоматична терапия с кръв и кръвни биопродукти, антибиотични комбинации, антимикотици, хепатопротективни е решено да започне стандартна двукомпонентна ПХТ. Понася 2 индукционни курса Су + Адг /5+2/. След втория курс изпада в тежка и продължителна панцитопения с нов решут на генерализирани инфекциозни усложнения (положителни хемокултури за *Klebsiella pn.* и *Ps. Aeroginosa*) Състоянието на болния се влошава, въпреки мощната симптоматична терапия и на фона на неовладяем фебрилитет, прогресираща астенодинамия завършва с летален изход. Представеният от нас случай има типичната характеристика на остра панмиелоza с миелофиброза: панцитопения, малък процент бласти в периферна кръв, липса на спленомегалия, хиперцелуларен к.м. с фиброза Диагнозата е поставена чрез трепанобиоптат с характерна хистология и имунохистохимия. В конкретния случай стандартната химиотерапия не само не повлиява болестта, а цитопеничното състояние се оказва терен за непреодолимо септично състояние.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Lewis, S.M. , Szur, L. Malignant myelosclerosis. *British Medical Journal*, 2, 1963, 5355, 472–477.
- Bergsman, ML, EJ, V. S.. Acute myelofibrosis: an accelerated variant of agnogenic myeloid metaplasia.-*Ann. Intern. Med.*, 74,1971, 232–235.
- Estevez, J.M., Urueta, E.E., Moran, T.J. Acute megakaryocytic myelofibrosis. Case report of an unusual myeloproliferative syndrome. –*Am. J. Clin. Pathol.* ,62, 1974, 52–59.
- Fabich, D.R., Raich, P.C. Acute myelofibrosis: a report of three cases.- *Am. J. Clin. Pathol.*, 67, 1977, 334-338.
- Bearman, R.M., Pangalis, G.A., Rappaport, H. Acute(malignant) myelosclerosis.- *Cancer*, 43, 1979, 279-293.
- Thiele, J., Kvasnicka, H.M. , Schmitt-Graeff , A. Acute Panmyelosis with Myelosclerosis.-*Leukemia & Lymphoma*, 45, 2004, № 4, 681-687.
- Vassilopoulos, G. , Palassopoulou, M. , Zisaki, K., Befani, M., Bouronikou, E., Giannakoulas, N., Stathopoulou, E., Matsouka, P . Successful Control of Acute Myelofibrosis with Lenalidomide.- *Hindawi Publishing Corporation, Case Reports in Medicine*, 2010, Article ID 421239.
- Çol, I. E., Romagosa, V., Berlanga, J., Domingo, A. , Losa, F., Heras, L., Janriz, J. Zoledronate-induced remission of acute panmyelosis with myelofibrosis.- *Eur. J. Haematol.* , 73, 2004, 215–218
- Orazi, A., P O'Malley, D., Jiang, J., Vance, G. H. , Thomas, J., Czader, M. , Fang, W., An, C., Banks, P. M. Acute panmyelosis with myelofibrosis: an entity distinct from acute megakaryoblastic leukemia.- *Modern Pathology*, 18, 2005, 603–614.
- Sultan, C., Sigaux, F., Imbert, M. and Reyes, F. Acute myelodysplasia with myelofibrosis: a report of eight cases.- *Br. J. Haematol*, 49, 1981, 11 – 16.
- Brunning, R.D., Matutes, E., Flandrin, G., Vardiman, J.W., Bennett, J. and Harris, N.L. Acute myeloid leukaemia not otherwise categorised, In *WHO Classification of Tumours: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* edited by Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H. and Vardiman J.W. Lyon: IARC Press. 2001. 91 – 105.
- Kamei, S., Shinohara, K. and Oeda, E. Myelodysplastic syndrome associated with myelofibrosis, a report of 3 cases.-*Intern. Med.*, 32, 1993, 668 – 671.
- Steensma, D.P., Hanson, C.A., Letendre, L. and Tefferi, A. Myelodysplasia with fibrosis: a distinct entity?.- *Leuk. Res.*, 25, 2001, 829 – 838.
- Imbert, M., Nguyen, D. and Sultan, C. Myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemias (AML) with myelofibrosis.- *Leuk. Res.*, 16, 1992, 51 – 54.
- Lambertenghi-Delilieri, G., Annaloro, C., Oriani, A. and Soligo, D. Myelodysplastic syndrome associated with bone marrow fibrosis.- *Leuk. Lymphoma*, 8, 1992, 51 – 55.
- Maschek, H., Kaloutsi, V., Rodriguez-Kaiser, M., Werner, M., Choritz, H., Mainzer, K., et al. Hypoplastic myelodysplastic syndrome: incidence, morphology, cytogenetics, and prog-nosis.- *Ann. Hematol.*, 66, 1993, 117 – 122.
- Narayanan, M.N., Benaim, M.E., Geary, C.G. and Harrison, C.J . Hyperfibrotic myelodysplasia.- *Br. J. Haematol.*, 79, 1991, 653 –655.
- Allen, E.F., Lunde, J.H., McNally, R. and Branda, R.E. A case of acute myelofibrosis with complex karyotypic changes: atype of myelodysplastic syndrome.- *Cancer Genet. Cytogenet.*, 90, 1996, 24–28.
- Imbert, M., Nguyen, D. and Sultan, C. Myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemias (AML) with myelofibrosis.- *Leuk. Res.*, 16, 1992, 51 – 54.
- Georgii, A., Choritz, H. and Maschek, H. Histopathology of myelodysplastic syndromes with regard to histologic variants and outcome in adults.- *Intern. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 4, 1997, 209 – 219.
- Bartl, R., Frisch, B. and Baumgart, R. Morphologic classification of the myelodysplastic syndromes (MDS): combined utilization of bone marrow aspirates and trephine biopsies.- *Leuk. Res.*, 16, 1992, 15–33.
- Thiele, J., Titus, B.R., Kopsidis, C. and Fischer, R. Atypical micromegakaryocytes, promegakaryoblasts and megakaryoblasts: a critical evaluation by immunohistochemistry, cytochemistry and morphometry of bone marrow

trephines in chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.-Virchows. Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol., 62, 1992, 275 – 282.

23. Jacobs, A., Geary, C. and Osman, J. Haematological disorders and occupational hazards: a British Society for Haematology/Health and Safety Executive study.-Br. J. Haematol., 84, 1993, 555 – 557.
24. West, R.R., Stafford, D.A., Farrow, A. and Jacobs, A. Occupational and environmental exposures and myelodysplasia: a case-control study.- Leuk. Res., 19, 1995, 127 – 139.
25. Rigolin, G.M., Cuneo, A., Roberti, M.G., Bardi, A., Bigoni, R., Piva, N., et al. Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinico-biological findings.- Br. J. Haematol., 103, 1998, 189 – 97.
26. Suvajdzic, N., Marisavljevic, D., Kraguljac, N., Pantic, M., Djordjevic, V., Jankovic, G., Cemerikic, V., Colovic, M. Acute Panmyelosis with Myelofibrosis: Clinical, Immu-

nophenotypic and Cytogenetic Study of Twelve Cases.- Leukemia & Lymphoma, 45, 2004, 9, 1873–1879

27. Reilly, J.T., Barnett, D., Dolan, G., Forrest, P., Eastham, J. and Smith, A. Characterization of an acute micromegakaryocytic leukaemia: evidence for the pathogenesis of myelofibrosis.-Br. J. Haematol., 83, 1993, 58 – 62.
28. Ngirabacu, M.C. et al. Long Term Follow-up of Autologous Peripheral Blood Stem Cell transplantation in the treatment of a patient with acute panmyelosis with myelofibrosis.-Haematologica, 91, 2006, 11, 146-147

Адрес за кореспонденция:

Виктория Бабачева
Клиника по клинична хематология към
УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД – гр. Пловдив
бул. Васил Априлов 15А
тел.: 0889 377 366
e-mail: drbabacheva@gmail.com

РЕДАКЦИОННА РУБРИКА

СЛЕД 12 ГОДИНИ, КАТО ГЛАВЕН РЕДАКТОР НА СПИСАНИЕ „КЛИНИЧНА И ТРАНСФУЗИОННА ХЕМАТОЛОГИЯ”, ДОЦЕНТ ГЕОРГИ БАЛАЦЕНКО СЕ ОТТЕГЛИ ОТ ПОСТА....

Едва ли е необходимо да бъде представян доцент Георги Балаценко – един от най-авторитетните цитогенетици в сферата на клиничната хематология. Той е роден през 1959 г. в София. Завършва висше образование по медицина в МУ–София. Започва професионалната си дейност като ординатор в Градска поликлиника в гр. Козлодуй. От 1988 г. в продължение на вече 25 години доцент Балаценко работи в НСБАЛХЗ – София, първоначално в Лабораторията по имунохимия и молекулярна биология, а от 2000 г. в Лабораторията по цитогенетика и молекулярна биология, като от 2009 г. е началник Диагностично-консултативния блок. Дисертационният му труд и множеството публикации в областта на молекулярната биология при малигнените заболявания на кръвта и кръвотворните органи са „научната ниша” и трайно ориентираните научни интереси на доцент Балаценко.

От 2000 г. доцент Георги Балаценко е главен редактор на списание Клинична и трансфузионна

хематология. Не всеки научен работник може да бъде и главен редактор. С рядко срещана всеотдайност и упорит труд, доцент Балаценко запази позициите на списанието сред националната научна периодика. Нещо повече – доцент Балаценко със своя научен професионализъм и безкомпромисност към качеството на публикациите, успя да привлече научната общност към него и го превърна в предпочитаното специализирано хематологично списание в страната. За съжаление по свое желание доцент Балаценко бе освободен от УС на Българското медицинско сдружение по хематология от поста си. Остава зам. главен редактор, готов да предаде своя опит и знания на новия екип.

За многогодишната му ползотворна дейност, още веднъж сърдечни благодарности и пожелания за успешна хабилитация за академичната длъжност „Професор”.

От редакционната колегия

ОТ НОВИЯ ГЛАВЕН РЕДАКТОР

Чест, отговорност и предизвикателство....

С решение на УС на Българското медицинско сдружение по хематология за нов главен редактор бе избран проф. д-р Стефан Горанов, дмн, началник клиника по клинична хематология към УМБАЛ „Св. Георги”- Пловдив. Там ще се издава и самото списание.

Той формулира накратко основните цели и приоритети в бъдещата издателска дейност:

1. Възстановяване броя на годишните издания и издигане ценза на списанието.
2. Специално внимание към младите хематолози:
 - отразяване на техните научни разработки и съобщения от национални и международни научни форуми

- методология на научните публикации
 - съдействие при организиране на форумите „Млад хематолог”
3. Тематични броеве от отделните направления или работни групи към Българското медицинско сдружение по хематология
 4. Пълно отразяване на коригирани/нови глави от медицинския стандарт и Методичните указания за диагностика, лечение и наблюдение на пациенти със заболявания на кръвта и кръвотворните органи
 5. „On-line” публикации и „навлизане” в международния обмен
 6. Привличане на чуждестранни автори

проф. д-р Стефан Горанов, дмн

ПРЕПОРЪКИ КЪМ АВТОРИТЕ

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

1. Ръкописите се представят в два идентични екземпляра, написани на стандартни машинописни страници (30 реда, 60-66 знака на ред).
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: увод, материал и методи, резултати, обсъждане, заключение, библиография.
5. Библиографията се представя на отделна страница и съдържа до 10 източника за оригиналните статии и до 20 за обзорите. Източниците се подреждат според реда на използването им в текста, (не по азбучен ред). Цитиране на статии: Фамилно име и инициал на всички автори, ако те са до трима. При повече от трима автори се посочват първите трима, последвано от “et al”, наименованието на списанието в съкратен вид според Index Medicus, година на публикуване, том, месец, брой, страници
Цитиране на книги и монографии: Автори, заглавие, място на издаване, издателство, година на издаване, страници
6. Резюмето (до 15 реда) се представя на български и на английски език в три екземпляра, съдържащи имената на авторите и заглавието, както и ключови думи на български и английски език.
7. Фигури, диаграми, формули, черно-бели снимки (9x12cm) се представят на отделни листове със съответните заглавия, минимален обяснителен текст и легенда на български език. Те трябва да са максимално контрастни с едри букви и цифри, годни за непосредствено полиграфско възпроизвеждане. В лявото бяло поле на текста се посочва желаното място за поместване на всяка илюстрация.
8. Таблиците могат да се предоставят в текста или на отделни листове. Във втория случай се следват изискванията за фигури, диаграми, формули и форграфи.
9. В края на статията или на отделен лист се посочват трите имена на водещия автор и адресът за кореспонденция.
10. 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 и на електронен адрес: stefangoranov@yahoo.com.

ERRATUM

В статията: „Сравнителен анализ на показателите на еритроцитната редица при високотренирани футболисти от различни възрастови групи“ с автори Ж. Грудева-Попова, Н. Бояджиев, З. Тарълов, И. Ненова, публикувана в Клинична и трансфузионна хематология, т. XLVII, бр. 1-2, 2011, 84-89, е допусната техническа грешка. Мерните единици на следните показатели да се четат, както следва:

RBC – $\text{бр} \cdot 10^{12} \cdot \text{l}^{-1}$

HGB – $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

PWC170 – $\text{kgm} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$

HCT – $\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$

MCHC – $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$



**БЪЛГАРСКО МЕДИЦИНСКО
СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ**

СЪБИТИЯ, ОРГАНИЗИРАНИ ОТ БЪЛГАРСКОТО МЕДИЦИНСКО СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ 2013 ГОД.

✓ **НАЦИОНАЛНА РАБОТНА СРЕЩА ПО ТРАНСПЛАНТАЦИЯ
НА ХЕМОПОЕТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ**
САНДАНСКИ,
21 МАРТ 2013 ГОД.

✓ **РАБОТНА СРЕЩА НА ГРУПАТА ПО МИЕЛОДИСПЛАСТИЧНИ
СИНДРОМИ/МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ**
АРБАНАСИ,
12-13 АПРИЛ 2013 ГОД.

✓ **НАЦИОНАЛНА КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ**
ХОТЕЛ МАРИНА,
4-6 ОКТОМВРИ 2013 ГОД.

✓ **ВТОРИ СИМПОЗИУМ МЛАД ХЕМАТОЛОГ**
ОЧАКВАЙТЕ ПРЕЗ НОЕМВРИ 2013 ГОД.

**ПОСЕТЕТЕ НОВИЯ САЙТ НА БЪЛГАРСКОТО
МЕДИЦИНСКО СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ:**

www.bulgarian-hematology.com