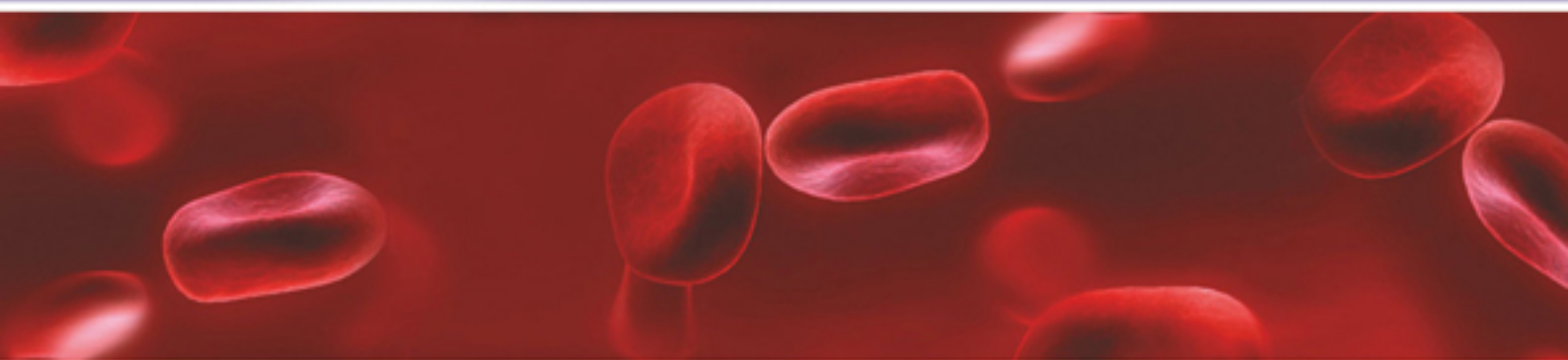




БЪЛГАРСКО МЕДИЦИНСКО
СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ

КЛИНИЧНА И ТРАНСФУЗИОННА ХЕМАТОЛОГИЯ



ТОМ XLIX - БР. 1-2 - 2013

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. XLIX

2013

№ 1-2

РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ

Главен редактор

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

Зам. главен редактор

Проф. 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

Проф. д-р Жанет Грудева – Попова, дм

Доц. д-р Лиана Герчева, дм

Доц. д-р Юлиан Райнов, дм

Доц. д-р Валерия Калева, дм

Доц. д-р Евгений Хаджиев, дм

Д-р Лилия Сивчева

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

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

Associated Editor-in-Chief

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

Prof. Janet Grudeva-Popova MD PhD

Ass. Prof. Liana Gercheva, MD PhD

Ass. Prof. Julian Rainov, MD PhD

Ass. Prof. Valeria Kaleva, MD PhD

Ass. Prof. Eugenio Hadjiev, MD PhD

Dr. Lilia Sivcheva

СЪДЪРЖАНИЕ

ОБЗОРИ

1. Л. Веселинова и Ю. Райнов. ЕЛЕКТРОХИМИОТЕРАПИЯТА – НОВОТО ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВО.....3
2. Р. Владимирова-Андреева, Д. Попова, Е. Викентиева, Л. Митев. ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ – ХЕМОКИНОВА МРЕЖА МИГРАЦИОННИ, АНТИАПОПТОТИЧНИ И АКТИВАЦИОННИ СИГНАЛИ.....9
3. Д. Василева, С. Сергиева. НУКЛЕАРНОМЕДИЦИНСКА ДИАГНОСТИКА ПРИ МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ.....17

ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ

1. Т. Бонева, D. Brazda, Ю. Райнов, Е. Хаджиев, К. Ганчева, J. Howard-Reeves, C. Grace, Л. Митев, Е. Начева. ГЕНОМЕН ПРОФИЛ НА МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ – СЪВРЕМЕНЕН ДИАГНОСТИЧЕН ПОДХОД26
2. В. Атанасова, Хр. Мумджиев, В. Недкова, М. Кръстева, Е. Христова. ВЛИЯНИЕ НА РАННИТЕ ХЕМОТРАНСФУЗИИ ВЪРХУ ПОКАЗАТЕЛИТЕ НА ЖЕЛЯЗНАТА ОБМЯНА ПРИ НЕДОНОСЕНИ ДЕЦА.....33
3. В. Атанасова, Хр. Мумджиев, В. Недкова, М. Кръстева, Е. Христова. ВЛИЯНИЕ НА РАННИТЕ ХЕМОТРАНСФУЗИИ ВЪРХУ ПОКАЗАТЕЛИТЕ НА КРЪВНАТА КАРТИНА ПРИ НЕДОНОСЕНИ ДЕЦА.....38
4. С. Лозенов, Б. Спасов, М. Дончев, К. Игнатова, П. Ганева, Ю. Жечев, В. Стоева, В. Върбанова, С. Симеонов, М. Генова, С. Ангелова, Г. Балаценко, Д. Пейчев, Г. Арнаудов, Г. Михайлов. ТЕРАПЕВТИЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПРИ ТЕРАПИЯТА НА ПАЦИЕНТИТЕ С ОСТРА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕВКЕМИЯ В НСБАЛХЗ ЗА ПЕРИОДА 01.2008 – 05.2013.....44
5. Д. Василева, С. Сергиева. ВЪЗМОЖНОСТИ НА ^{99m}Tc MIBI И БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИН ПРИ СТАДИРАНЕ И ОТЧИТАНЕ ЕФЕКТА ОТ ТЕРАПИЯТА ПРИ ПАЦИЕНТИ С НЕХОДЖКИНОВИ ЛИМФОМИ.....50
6. Д. Василева, С. Сергиева. ^{99m}Tc MIBI СЦИНТИГРАФИЯ И БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИН ПРИ ПАЦИЕНТИ С БОЛЕСТТА НА ХОДЖКИН.....55
7. Р. Владимирова, Е. Викентиева, Д. Попова, Л. Митев, И. Николов, Р. Станчев, И. Дамянов, Т. Кънчева, Н. Петкова, К. Милчева, И. Гизов, Ю. Райнов. МИГРАЦИОННИ И АНТИАПОПТОТИЧНИ МАРКЕРИ КАТО ВЪЗМОЖНИ ПРОГНОСТИЧНИ ФАКТОРИ ПРИ ХРОНИЧНАТА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ.....60
8. Р. Владимирова, И. Гълабова, Е. Викентиева, Д. Попова, Л. Митев, И. Николов, Р. Станчев, И. Дамянов, Т. Кънчева, Н. Петкова, К. Милчева, И. Гизов, Ю. Райнов. ЕКСПРЕСИЯ НА CD80/CD86 ПРИ ХРОНИЧНАТА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ – ВРЪЗКА С ПРОЛИФЕРАТИВНАТА АКТИВНОСТ.....64

КАЗУИСТИКА

1. Р. Владимирова, Е. Викентиева, И. Николов, Р. Станчев, Л. Митев, Д. Попова. ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ И ПЕРСИСТИРАЩА ПОЛИКЛОНАЛНА В-КЛЕТЪЧНА ЛИМФОЦИТОЗА – ФЕНОТИПНА СЪПОСТАВКА.....69
2. М. Ефраим, А. Антонов, И. Мичева, Вл. Геров и Л. Герчева. СЛУЧАЙ НА ЕКСТРАМЕДУЛАРЕН ПЛАЗМОЦИТОМ НА ЦНС ПРИ ЖЕНА НА 29 Г., ПРОГРЕСИРАЛ ДО МНОЖЕСТВЕН МИЕЛОМ С ФАТАЛЕН ИЗХОД.....73

Списанието се обработва в:

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

КЛИНИЧНА И
ТРАНСФУЗИОННА
ХЕМАТОЛОГИЯ бр. 1-2/2013

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
stefangoranol@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
stefangoranol@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

1. L. Vesselinova, J. Raynov ELECTROCHEMOTHERAPY – A NEW CHALLENGE.....3
2. R. Vladimirova-Andreeva, D. Popova, E. Vikentieva, L. Mitev, Military Medical Academy - Sofia. CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – CHEMOKINE NETWORK MIGRATION, ANTIAPOPTOTIC AND ACTIVATION SIGNALS.....9
3. D. Vassileva, S. Sergieva. NUCLEAR MEDICINE DIAGNOSTICS IN MULTIPLE MYELOMA.....17

ORIGINAL ARTICLES

1. T. Boneva, D. Brazma, J. Raynov, E. Hadjiev, K. Gancheva, J. Howard-Reeves, C. Grace, L. Mitev, E. Nacheva. GENOME PROFILING OF MULTIPLE MYELOMA – UPDATE OF ROUTINE DIAGNOSTIC APPROACH.....26
2. V. Atanasova, Ch. Mumdiev, V. Nedkova, M. Krusteva, E. Hristova. IMPACT OF EARLY BLOOD TRANSFUSIONS ON THE IRON INDICES IN PREMATURE INFANTS.....33
3. V. Atanasova, Ch. Mumdiev, V. Nedkova, M. Krusteva, E. Hristova. IMPACT OF THE EARLY BLOOD TRANSFUSIONS ON THE BLOOD COUNT INDICES IN PREMATURE INFANTS.....38
4. S. Lzoenov, B. Spasov, M. Donchev, K. Ignatova, P. Ganeva, Y. Zhechev, V. Stoeva, V. Varbanova, S. Simeonov, M. Genova, S. Amgelova, G. Balatsenko, D. Peichev, G. Arnaudov, G. Mihaylov. THERAPEUTIC RESULTS FROM THE THERAPY OF NSHATHD'S PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA FOR THE PERIOD 01.2008 – 05.2013.....44
5. D. Vassileva, S. Sergieva. 99mTc MIBI SCINTIGRAPHY AND BETA-2-MICROGLOBULIN IN STAGING AND THERAPY CONTROL IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMA.....50
6. D. Vassileva, S. Sergieva. 99m Tc MIBI SCINTIGRAPHY AND SERUM BETA-2-MICROGLOBULIN IN PATIENTS WITH HODGKIN'S DISEASE.....55
7. R. Vladimirova, E. Vikentieva, D. Popova, L. Mitev, I. Nikolov, R. Stanchev, I. Damianov, T. Kuncheva, N. Petkova, K. Milcheva, I. Gigov, J. Rainov. MIGRATION AND ANTIAPOPTOTIC MARKERS AS POTENCIAL PREDICTORS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA.....60
8. R. Vladimirova, I. Galabova, E. Vikentieva, D. Popova, L. Mitev, I. Nikolov, R. Stanchev, I. Damianov, T. Kuncheva, N. Petkova, K. Milcheva, I. Gigov, J. Rainov. CD80/CD86 EXPRESSION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – RELATIONSHIP WITH PROLIFERATION ACTIVITY.....64

CASE REPORT

1. R. Vladimirova, E. Vikentieva, I. Nikolov, R. Stanchev, L. Mitev, D. Popova. CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA v/s PERSISTENT POLYCLONAL B-CELL LYMPHOCYTOSIS.....69

ЕЛЕКТРОХИМИОТЕРАПИЯТА – НОВОТО ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВО**Л. Веселинова¹ и Ю. Райнов² - ВМА, София**¹ ВМОБР/Клиника по физикална и рехабилитационна медицина² Клиника по хематология**ELECTROCHEMOTHERAPY – A NEW CHALLENGE****L. Vesselinova¹, J. Raynov²****Military Medical Academy, Sofia**¹ VMOBR/Clinic of physical and rehabilitation medicine² Clinic of Hematology

Резюме. Обзорът обсъжда възможностите и предизвикателствата пред нов терапевтичен подход, електрохимиотерапия, използван през последните години за лечение на солидни тумори и кожни форми на лимфоми. Посочени са механизмите на действие, показанията и противопоказанията, ефективността и безопасността на метода. Изтъква се неговото предимство пред стандартната химиотерапия, себестойност и социален ефект. Разширяването на показанията за неговото приложение чертаят нов път в борбата с рака.

Ключови думи: солидни тумори, лимфоми, електрохимиотерапия.

Summary. This review discusses the possibilities and challenges of a new therapeutic approach electrochemotherapy used in recent years for the treatment of solid tumors and cutaneous form of lymphoma. The mechanisms of action, indication and contraindication, efficacy and safety of the method also are comment. The review shows its advantage over standard chemotherapy, cost and social impact. Expansion of indications for its use draws a new way to fight cancer.

Key words: solid tumors, lymphoma, electrochemotherapy

ВЪВЕДЕНИЕ

През последните години клиничната хематология демонстрира революционен развой в подобряване на диагностиката и лечението на малигнените хемопатии. Това доведе до значимо нарастване на пълните ремисии, свободния от заболяване период и общата преживяемост на болните с левкемии, лимфоми, миелом. Наред с класическата химиотерапия се отбелязва мащабно навлизане и на концептуално нови средства за повлияване върху рецепторите и сигналните пътища на туморните клетки: моноклонални антитела, имуномодулатори, тирозин-киназни и протеазомни инхибитори, синтетични продукти от молекулярната биология. Наред с тези иновативни високотехнологични методи се търсят и други нестандартни подходи, които да подобрят терапевтичната ефективност и контрола при тази важна група социално значими заболявания. През последните 30 г. в онкологията се апробира и налага един нов лечебен подход,

известен като електрохимиотерапия (EXT). Тази комбинация от електрически импулси и противотуморни агенти показва забележителна ефективност и се прилага и доразвива в няколко силни школи по света, сред които и българската. Като нов метод EXT привлича все повече вниманието на медицинските специалисти и в частност на медицинските онколози и клиничните хематолози.

Целта на настоящия обзор е да разшири познанията на специализираната медицинска общност върху възможностите на този метод на лечение, включително и с представяне на значимия опит на българската школа.

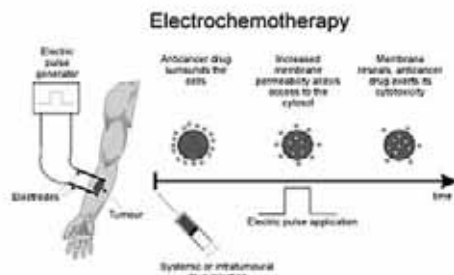
СЪЩНОСТ И МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ

Дълго преди развитието на познанието за съществуването на електроенергия, шоковете предизвикани от електрическата риба са били известни на населението по поречието на р.Нил

феномен, свидетелства за който се намират в древни египетски текстове, датиращи от 2750 г. пр.н.е. **Тези риби, допирът до които предизвиква шок, са описани като „гръмовержеца на Нил” и като „защитници” на другите риби.** Пациенти, страдащи от подагра или главоболие са били съветвани да докоснат електрическите риби, с надеждата, че излъчения мощен токов удар може да ги излекува [1]. За обезболяващия ефект, предизвикан от токови удари, съобщават и други древни автори - Плиний Стари и Скрибониус Ларгус [2].

Електрохимиотерапията е терапевтичен метод, който благоприятства навлизането в туморната клетка на цитотоксични агенти, които разрушават вътреклетъчните ѝ структури. Той се основава на локално прилагане на кратки, но интензивни електрически импулси, предизвикващи временна пермеабилзация на клетъчната мембрана, което позволява транспортирането на молекули, за които обикновено тя е непроницаема [3]. Когато някоя биологична клетъчна структура се подлага на въздействието на достатъчно силно електрическо поле, се генерира увеличение в трансмембранното напрежение, което предизвиква структурното ѝ пренареждане [4]. Чрез създаването на т.н. „прозорци” се увеличава нейната пропускливост, което улеснява преминаването на определени молекули. Това явление, известно като електропорация (или електропермеабилзация), се използва за засилена доставка в клетката на различни противотуморни медикаменти – Фиг. №1.

фиг 1

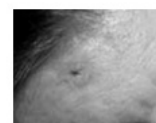
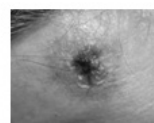


За провеждането на ЕХТ е необходима специална апаратура, като най-известна е италианската Cliniporator™ (от Италия), сертифицирана в Европейския съюз - Фиг. № 2.

фиг 2



В България, през 1998 г. в Института по биофизика към БАН екип от български учени разработи подобна апаратура, преминала успешно клинични изпитвания при пациенти с начални стадии на кожни лимфоми, базоцелуларен карцином и сарком на Капоши [5] – Фиг. № 3.



Новата разработка на апарата - „Chemipulse-IV”, представлява малко по размери и тегло портативно устройство, с висока електробезопасност, както за пациента, така и за оператора.

При метода ЕХТ, в зависимост от големината на туморната лезия, се използва местна или обща анестезия. Противотуморният агент може да се инжектира директно в лезията или венозно. Електрическите импулси се транслират чрез три различни електрода. Тип I са електроди с различно разстояние между плочките. Те се използват за лечение на малки и повърхностно разположени туморни лезии. Тип II са електроди тип игла, подходящи за лечение на по-големи и по-дълбоко разположени туморни лезии. Съществуват 2 вида иглени електроди - две паралелни пластини с 4 mm разстояние между тях, използвани за лечение на по-малки туморни обеми и шестоъгълен набор от електроди – тип III за повече от 1 cm в диаметър туморни лезии. Това разнообразие от електроди е разработено за обхващане на различни по големина туморни лезии. Обичайната методика е еднократна апликация. При тумори с по-голям размер лечението може да се повтори след няколко седмици.

От физико-химична гледна точка, ЕХТ е подходяща при всички видове тумори. В подкрепа на това са много предклинични и клинични резултати, натрупани през последните близо 20 години. Данните, събрани от различните центрове по света доказват ефективността на тази нова техника, превъзхождаща ефекта на класическата химиотерапия, а понякога и заместваща нуждата от оперативни интервенции.

КЛИНИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ

Неходжкиновите лимфоми са често заболяване както при хората, така и при домашните животни.

Възприетият лечебен алгоритъм включва системна химиотерапия, имунотерапия и лъчелечение. Ангажирането на някои специфични области обаче изисква особено внимание и индивидуален терапевтичен подход. Такива локализирани форми могат да засегнат периорбиталното пространство, кожата, назалната област и да доведат до разрушаване на подлежащите костни структури, променяйки външния вид на лицевия череп и във връзка с това значимо и качеството на живот на пациента.

За съжаление класическите методи за лечение не във всички случаи са успешни, което налага търсенето на нови и алтернативни методи. Такъв метод е EHT, при която обикновено се използват химиофармацевтиците блеомицин и цисплатина. Блеомицинът е най-често използвания при EHT медикамент. Той е открит от Umezawa и сътр. през 1966 г., като е изолиран от гъбата *Streptomyces verticillus*. Използва се за лечение на болестта на Ходжкин, неходжкиновите лимфоми и туморите **на тестисите, като цитотоксичността му е свързана с директното увреждане на ДНК**. След венозна апликация, предизвиканата смърт **на клетките настъпва бавно, в продължение на един до няколко дни**. Ако обаче той бъде инкорпориран по някакъв начин в туморната клетка, в количество от няколко милиона молекули, разрушаването ѝ настъпва за минути. Въпреки доказаната висока цитотоксичност на блеомицина, неговото нормално преминаване през клетъчната мембрана чрез свободна дифузия е силно затруднено. Това може да бъде преодоляно чрез електропорацията и цитотоксичността му повишена хиляди пъти [6]. Първото клинично проучване на EHT с блеомицин е извършено през 1991 г. от Miretal. [7], **където метода демонстрира висока антитуморна ефективност при кожни метастази на пациенти с карцином на главата и шията**. След тези впечатляващи резултати, локализациите на туморите, при които се използва EHT, се разширяват. Методът е успешно тестван и при кожни метастази от злокачествен меланом, плоскоклетъчен карцином, аденокарцином на млечната жлеза и слюнчените жлези, хипернефром, сарком на Капоши, **преходно-клетъчен карцином на пикочния мехур** [6,8].

Ефективността и безопасността на метода се оценява в няколко обзорни публикации. В една от тях Sadatcharam M et al. [9] правят преглед на предклиничното и клиничното развитие на EHT и обсъждат нейното бъдещо приложение. Публикуваните данни показват обективно положителна динамика в 85% от пациентите с кожни и подкожни туморни лезии и различни хистологични находки, останали неповлияни от прилаганите преди това стандартни терапевтични

методи. Изтъква се, че EHT е бърз, безопасен и с ниска себестойност метод, който дава възпроизводими благоприятни терапевтични резултати [9].

В своя студия Mali B et al. [10] публикуват системен обзор и мета-анализ на резултатите в научната литература, свързани с използването на EHT. В оценените **44 клинични проучвания за 1994 тумора** е доказано, че EHT е значимо ($p < 0.001$) по-ефективна (над 50%) отколкото самостоятелната химиотерапия с блеомицин и цисплатина. Подчертава се, че ефектът е по-изразен при интратуморна, отколкото при венозна апликация на медикамента [10].

Положителният ефект на EHT е доказан и при кървящи метастази и първични кожни тумори [11]. Електрическите импулси могат да индуцират констрикция и тромбозиране на съдовете в лезиите, което удължава експозицията на клетките с противотуморните агенти. От друга страна се наблюдава и директно въздействие на аплицирания противотуморен агент върху ендотелните клетки в съдовата мрежа на тумора. По този начин тези два феномена кумулират и усилват значително ефекта от лечението. Описаният съдов ефект индицира като показани за провеждане на EHT и лезии в добре васкуларизирани тъкани или кървящи тумори, респ. метастази, например тези на черния дроб [11].

По време на фаза I/II клинично изпитване, Eldar Gadzijev [12] докладва предварителните резултати от EHT при 4 пациенти с нерезектабилни чернодробни метастази с над 3 cm в диаметър. При един пациент е оценена само токсичността и безопасността на метода, при втория е наблюдавана частична ремисия, при третия болен е постигната пълна ремисия, потвърдена и хистологично, а при четвъртия EHT също е постигнала положителен ефект. Поносимостта при всички е била много добра [12].

Резултатите от приложението на интраlesiонални агенти и EHT при различни кожни неоплазии е разгледано подробно в обзора на Good LM, et al. [13]. При болни с базоцелуларен карцином, сквамозно-клетъчен рак и с някои кожни лимфоми е оценен ефекта и безопасността на приложение на терапевтични схеми с: 5-флуороурацил, интерферон, интерлевкин-2, блеомицин и EHT. Освен добрата поносимост, този метод е показал ефективност, дори и в случаите, когато хирургическото лечение е било противопоказано, а сравнено със системната химиотерапия, наблюдаваните нежелани лекарствени реакции са били минимални [13].

EHT е показала висока ефективност и при кожните метастази при рак на млечната жлеза. При 12 пациенти, 8 мин. след венозното приложение

на блеомицин са осъществени кратки електроимпулси, с използването на 2 до 3 cm електроди, имплантирани в туморната тъкан. Пълен отговор е наблюдаван в 75,3% (107 метастази), частичен в 17% (24 метастази), без промяна – в 7,7% (11 метастази). Лека болка и улцерация на туморната повърхност са установени в един болен [14].

EXT е прилагана и при дълбоко разположени тумори, благодарение на ново поколение генератори на електрически импулси и дългоиглени електроди. Методът е осъществен интраоперативно при лечението на солитарни чернодробни метастази от колоректален карцином и първичен рак на черния дроб. След венозен болус на блеомицин туморът е подложен на въздействието на електрическите импулси. Добрата противотуморна ефективност е доказана с негативна хистологична находка след манипулацията, която е потвърдила възможностите на EXT при дълбоко разположени тумори [15]. Подобни резултати в тази посока публикуват и други автори [16].

Spugnini E, et al. съобщават за успешното приложение на EXT и във ветеринарната медицина. При животни с локализирани форми на лимфоми, бифазните електрически импулси и интратуморната апликация на блеомицин са постигнали отличен ефект и същевременно са понесени добре от животните [17].

Основателно погледите са насочени към оценка на ефективността на метода и при засягане на кожата от лимфоми. Една от най-често цитираната публикация в тази област е на Peycheva E et al. [18], които установяват отличен ефект от EXT при 8 болни с хистологично потвърден **микозис фунгоидес, лекуван с интерферон-алфа** и бифазни електроимпулси. Ефектът на EXT е проследен върху общо 29 документиращи и хистологично верифицирани кожни лезии. Реализирани са 8 бифазни импулса, всеки с продължителност от 50+50 μ sec, с 900 μ sec интервал между тях, с обща продължителност на електропорацията от 7,1 msec. Успоредно е приложен и интерферон-алфа, интралезионно, като резултатите са сравнени с тези, получени при стандартната имунотерапия, където интерферон-алфа е прилаган 3 пъти седмично за 4 седмици. Пълен отговор е наблюдаван в 25/29 (86%) от лезиите при еднократно проведена EXT. В края на 12 мес. проследяване, при всички наблюдавани 29 лезии е постигнат пълен отговор (100%). Не е установена поява на нови лезии за времето на същия този период. Модулираната ефективност на интерферон-алфа се обяснява с повишената му локална концентрация в лезиите, както и удължаване на времето за неговото въздействие след локалното му приложение и електроимпулсната стимулация [18].

Отчитайки досега наблюдаваните отлични

резултати от EXT на различни научни форуми се съобщават иновативни терапевтични модификации, разчупващи стандартния подход в лечението на малигнените хемопatii и солидни тумори.

Auriscchio L. [19] при експериментални изпитвания върху животински модели с лимфоми докладва за използването на ваксина, където ДНК електроген-трансфера е свързан към аденовирусен вектор. Протоколът на този вид ваксинация включва и много ниски дози химиотерапия, като резултатите показват значимо увеличение на преживяемостта на животните с лимфоми, сравнени с историческите контроли [19].

Участието на дендритните клетки и наблюдаваната индукция на цитокини след EXT в лечението на меланом е обсъждано в публикацията на Tosti G. [20]. Установено е активиране на имунологичните реакции, като се очаква бъдещите проучвания върху интимните молекулярни механизми, наблюдавани при EXT да подпомогнат разработването на по-добри терапевтични стратегии [20]. В друго изпитване Gerlin G. et al. [21] също оценят ролята на дендритните клетки в лечението на меланомните метастази под въздействието на EXT, което отваря темата за нови научни дискусии. Corovic S, et al. [22] на база на резултатите си описват възможностите за моделиране на разпространението на електрическото поле в тъканите по време на електропорацията заради настъпване на промени в електропроводимостта, които трябва да се имат предвид и да се прогнозира при използване на метода EXT в обема от прицелна туморна маса.

Pavlit D, et al. [23] изтъкват необходимостта от точната предварителна обработка и сегментиране на медицинските изображения, като използването на 3D метода позволява чрез съвременни математически модели много точно да бъдат инкорпорирани електродите в туморната тъкан.

БЕЗОПАСНОСТ НА EXT

EXT не се препоръчва при пациенти със симптоматични или бързо прогресиращи тумори без кожни метастази, при болни с установена алергия към използвания противотуморен агент (блеомицин, цисплатина). Тя е противопоказана и при пациенти, при които са достигнати кумулативни дози на използваните цитостатици от предходната химиотерапия.

При лечение на по-малки тумори с EXT се наблюдават незначителен брой нежелани реакции. Най-често това е чувството за лек дискомфорт в мястото на анестезията. Това се дължи на транзиторни промени в структурата на околните мускули, отзвучаващи бързо и не изискващи специално лечение. Този феномен,

наблюдаван при по-чувствителни и емоционални пациенти, може да бъде преодолян с помощта на обща анестезия.

Понякога се наблюдава лека болка в мястото на манипулацията, като в тези случаи успешно се използват различни аналгетици. Грипоподобните изяви се свързват повече с влиянието на използвания противотуморен агент (блеомицин, цисплатина) и могат да бъдат овладяни с приложението на парацетамол. При съществуващ риск от инфекции се използват антибиотици, а при наличие на ранева повърхност, тя се третира по общите хирургични правила.

Електрохимиотерапията работи с по-ниски дози на цитостатичните агенти, отколкото използваните в стандартните протоколи на системното лечение, като по този начин страничните ефекти от използвания противотуморен агент най-често се избягват.

Много рядко се наблюдават прояви на еметизис, които се овладяват бързо с използването на стандартни антиеметици.

Селекцията на пациентите за EXT е важна, критериите са известни и се прилагат успешно [24]. Анамнезата е първият важен елемент при избора на този вид лечение. Лъчелечението не е противопоказание за EXT, но манипулацията не е показана върху гръдната стена при болни с пейсмейкър, както и при налични отклонения в кръвната картина, хемостазата или алергия към някои от използваните анестетици. В хода на лечението с EXT проследяването на електрокардиограмата е задължително.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачествените заболявания са социално значима група болести, които са обект на загриженост както на медицинската, така и на широката общественост. Независимо от успешното им лечение, постигане на продължителни ремисии и увеличена преживяемост, все още при някои форми от солидните тумори и малигнените хемопatii успехите са незадоволителни.

Основен проблем в хематологията и онкологията е възникването на лекарствена резистентност, свързана главно с увеличената експресия на гена за множествената лекарствена резистентност (MDR). Това предизвиква увеличена активност на p-glycoprotein и клинични изяви на MDR към различни цитотоксични медикаменти. **В този смисъл търсенето на нови, митигирани методи за диагностика и лечение е една от основните насоки на съвременната медицинска наука.** Като нов метод за лечение EXT притежава висок терапевтичен потенциал с физиологичната си разпознаваемост и усвояемост за организма. Тя позволява намаляване на системната доза химиотерапевтик

и има щадящ по отношение общата цитотоксичност ефект.

Добър показател за възприемчивостта на EXT е факта, че по-голямата част от пациентите, интервюирани по време на клинично проучване за определяне на европейската стандартна оперативна процедура за EXT (ESOPE) са готови да приемат този тип лечение и друг път, ако това е необходимо [24].

Електрохимиотерапията се налага като алтернативен, лесно приложим, високо ефективен и **безопасен метод, а липсата на необходимост от хоспитализиране на болните и предимно еднократното приложение в основната част от случаите го прави високо икономически ефективен и социално адаптивен.**

Перспектива в развитието на метода на електропорация е реализирането на иновативни техники като електротрансфер на гени за генна терапия, ваксинация с ДНК, отстраняване на тъкани с т.н. необратима електропорация [25]. Новото предизвикателство пред EXT, метод с доказана вече ефективност, е лечението на дълбоко разположените тумори и метастази [26,27,28].

Това би довело до качествено ново ниво медицинско обслужване и грижа за болните, както и до подобрене в персоналния им статус, емоционалния и житейския им мир.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Morris-Simon C. Life's Solution: Inevitable Humans in a Lonely Universe, Cambridge University Press, 2003:182–185.
2. Moller P, D Kramer, B Bernd. "Review: Electric Fish", Bioscience - American Institute of Biological Sciences, 1999; 41(11):794–796.
3. Mir LM, S Orlowski, J Belehradec, C Paoletti. "Electrochemotherapy potentiating of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses". Eur. J. Cancer, 1991; 27(1): 68–72.
4. Chen C, SW Smye, MP Robinson, JA Evans. Membrane electroporation theories: a review. Med Biol Eng Comput, 2006; 44 (1-2): 5–14.
5. Daskalov I, N. Mudrov, E. Peycheva. Exploring new instrumentation parameters for Electrochemotherapy. IEEE Engineering. Medicine and Biology, 1999; 18: 62-66.
6. Gothelf A, M. Mir, J. Gehl. Electrochemotherapy with bleomycin-a resume of published clinical trial. Cancer Treatment Reviews, 2003; 3: 234-244.
7. Mir LM, M Belehradec, C Domenge, et al. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. C R Acad Sci, 1991; 313(3):613-618.
8. Sersa G, T Cufer, M Rebersek, et al. Electro-

- chemotherapy with bleomycin in the treatment of hypernephroma metastasis: case report and literature review. *Tumori*, 2000; 86(2):163-165.
9. Sadatcharam M, M Declam, G O'Sullivan. Electrochemotherapy: An emerging cancer treatment. *International Journal of Hyperthermia*, 2008; Vol. 24 (3): 263-273.
 10. Mali B, T Jarm, M Snoj, et al. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*, 2013; Vol. 39 (1): 234-239.
 11. Sersa G. Anti-vascular effects of electrochemotherapy: implications in treatment of bleeding metastases. 1st International Users' Meeting, November 19-20, 2010; Bologna, Italy.
 12. Gadzijev E. Electrochemotherapy in patients with not-resectable liver metastases using Cliniporator Vitae Technology. 1st International Users' Meeting, November 19-20, 2010; Bologna, Italy.
 13. Good LM, D Mischa, A. Whitney. Intralesional agents in the management of cutaneous malignancy: a review. *J Am Acad Dermatol*, 2011; 11: 4313-422.
 14. Benevento R, A Santoriello, G Perna, et al. Electrochemotherapy of cutaneous metastases from breast cancer in elderly patients: a preliminary report. *BMC Surg*, 2012; 12, Suppl.1: 2317-2328.
 15. Mattheiessen LW, RL Chalmers, DC Sainsbury, et al. Management of cutaneous metastases using Electrochemotherapy. *Acta Oncol*, 2011; 50(5): 621-629.
 16. Miklavcic D. M. Snoj, A. Zupanic, et al. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy, *Biomed Eng Online*, 2010; 9(10):236-240.
 17. Spugnini EP, G Citro, P Mellone, et al. Electrochemotherapy for localized lymphoma: a preliminary study in companion animals. *J Exper Clin Cancer Res*, 2007; 26, (3): 343-346.
 18. Peycheva E, I Daskalov, I Tsoneva. Electrochemotherapy of mycosis fungoides by interferon- α . *Bioelectrochemistry*, 2007; Vol.70, (2): 283-286.
 19. Aurisicchio L. Electrochemotherapy and a different vaccination approach. 1st International Users' Meeting, November 19-20, 2010; Bologna, Italy.
 20. Tosti G. The mechanism responsible for the activation of immunological responses following electrochemotherapy treatment. 1st International Users' Meeting, November 19-20, 2010; Bologna, Italy.
 21. Gerlini G, S Sestini, P Di Gennaro, et al. Dendritic cells recruitment in melanoma metastasis treated by electrochemotherapy. *Clin & Exper Metast*, 2013; Vol. 30, 1: 302-308.
 22. Corovic S, I Lackovic, P Sustaric, et al. Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. *Biom Engen Online*, 2013, Vol.12.
 23. Pavliha D, B Kos, A Zupanič, et al. Patient-specific treatment planning of electrochemotherapy: procedure design and possible pitfalls. *Bioelectrochemistry*, 2012; Vol. 87:136-140.
 24. Marty, M. et al. Electrochemotherapy - An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ES-OPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *Eur J Cancer*, 2006, Suppl. 4, 3-13.
 25. Zupanic A, B Kos, D Miklavcic. Treatment planning of electroporation-based medical interventions: electrochemotherapy, gene electrotransfer and irreversible electroporation. *Physics in medicine and biology*, 2012; Vol. 57,17: 210-118.
 26. Escoffre JM et MP Rols. Electrochemotherapy: progress and prospects. *Curr Pharmaceut Design*, 2012; Vol.18, 23: 24-32.
 27. Miklavcic D, M. Snoj, A. Zupanic, et al. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy, *Biomed Eng Online*, 2010, 9.
 28. Edhemovic I, E Gadzijev, E Breclj, et al. Electrochemotherapy: a new technological approach in treatment in metastases in the liver. *Technol Cancer Res Treat*, 2011; 10, (5): 475-485.

Адрес за кореспонденция

Д-р Любина Веселинова, д.м.
ВМОБР / Клиника по физикална
и рехабилитационна медицина
Военномедицинска академия,
ул. Георги Софийски № 3, 1606 София,
02 9225952
e-mail: l.vesselinova@vma.bg

ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ – ХЕМОКИНОВА МРЕЖА МИГРАЦИОННИ, АНТИАПОПТОТИЧНИ И АКТИВАЦИОННИ СИГНАЛИ

Р. Владимирова-Андреева, Д. Попова, Е. Викентиева, Л. Митев

Военномедицинска академия – София

CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – CHEMOKINE NETWORK MIGRATION, ANTIAPOPTOTIC AND ACTIVATION SIGNALS

R. Vladimirova-Andreeva, D. Popova, E. Vikentieva, L. Mitev

Military Medical Academy - Sofia

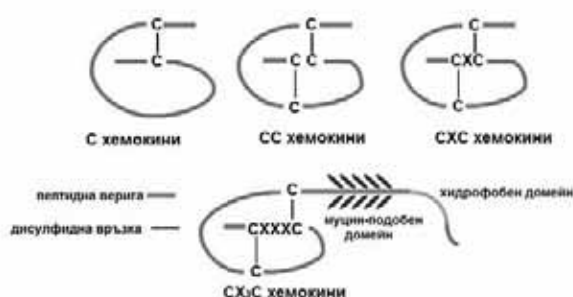
Резюме. Хемокините са хемоатрактантни протеини, участващи в нормалния процес на хомеостаза, подпомагайки лимфоцитния хоуминг към вторичните лимфоидни органи и костния мозък, а също така и при патологични процеси като възпаление, туморно развитие и метастазиране. Някои хемокини притежават антиапоптотични свойства, имащи значение за преживяемостта на клетките на хроничната лимфоцитна левкемия (CLL). Намерена е корелация между концентрацията на определени хемокини в серума на пациенти с експресията на съответните рецептори на повърхността на CLL клетките и установени прогностични клинични параметри. Взаимодействието с микросредата е от основно значение за клетъчния цикъл на CLL клетките, поради което намесата в този механизъм би представлявала рационален терапевтичен подход.

Ключови думи: хронична лимфоцитна левкемия, хемокини, рецептори, лиганди

Abstract. Chemokines are chemoattractant proteins that participate in homeostatic processes, including lymphocyte homing to secondary lymphoid organs and bone marrow, as well as in pathologic conditions, such as inflammation, tumor growth, and metastasis. Moreover, some chemokines are known to have an anti-apoptotic effect and thus contribute to the survival of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. Furthermore, a correlation can be drawn between the concentration of some chemokines in patients' serum, the expression of their respective receptors on CLL cells and well-established predictive clinical parameters. The interaction with the microenvironment is critical to maintaining the CLL cell's cycle and, therefore, interfering with this interaction would be a rational therapeutic approach.

Key words: chronic lymphocytic leukaemia, chemokines, receptors, ligands

ХЕМОКИНИ И СЪОТВЕТСТВАЩИ РЕЦЕПТОРИ



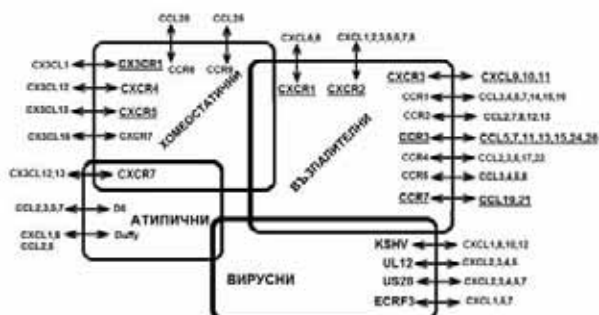
Фиг. 1. Структурна класификация на хемокините (<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemokine>)

Хемокините (хемотаксични цитокини) са фамилия протеини с ниско молекулярно тегло (80 – 130 ами-

нокиселинни остатъка), чиято основна функция е подпомагане насочената миграция и активиране на левкоцитите, ендотелните и епителните клетки, водещо до освобождаване съдържанието на клетъчните гранули и цитокинова продукция. Те играят ключова роля в защитните механизми на организма, тъй като имат пряко отношение към развитието, хомеостазата и функцията на имунната система, **органното развитие, ангиостазата / ангиогенезата** и др. Участват и в болестни процеси - възстановяването на рани, възпаление, инфекциозни (HIV/СПИН) и автоимунни заболявания, неоплазии, особено във връзка с тяхното метастазиране [1].

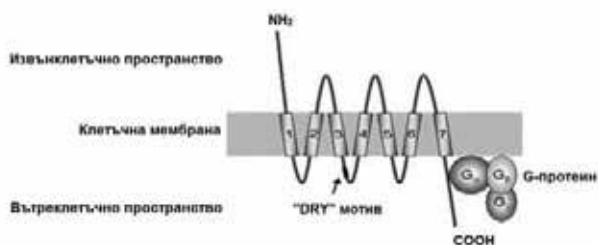
Използват се различни класификации на хемокините. Едната е структурна и почива върху типа разделяне на първите два цистеинови участъка в хемокини: C, CC, CXC и CX3C (фиг.

1), като съответната рецепторна номенклатура следва тази на кореспондиращите хемокини – С лигандите (CL) се свързват към С рецептори (CR), CC (CCL) се свързват към съответните CC хемокинови рецептори (CCR) и т.н. [2].



Фиг. 2. Функционална класификация на хемокините и техните лиганди

Друга класификация на хемокините ги разделя според функцията им (Фиг. 2). Секретцията на възпалителните хемокини се индуцира от стимули като IL-1, TNF-а и LPS. Те участват в разгръщането на имунния отговор с привличането на съответните клетки във възпалителното огнище. Хомеостатичните хемокини участват в клетъчното развитие и нормалната физиология. Атипичните хемокинови рецептори действат като негативни регулатори на системата - редуцират хемокиновите нива. Атипичните хемокинови рецептори (Фиг. 2) D6 и Duffy са добре характеризирани представители на тази група, докато CXCR7, принадлежащ към хомеостатичната група, изглежда притежава и свойства на атипичен хемокинов рецептор. Основната функция на тази субгрупа е секвестрация на хемокините, като по този начин се потиска клетъчният отговор [3]. Вирусните хемокини и техните рецептори възпрепятстват патогените да модулират имунния отговор спрямо инфекцията. Съществуват повече хемокини отколкото рецептори, като повечето хемокини се свързват с няколко различни хемокинови рецептора (Фиг. 3). Приблизително 50 гена кодират хемокиновите лиганди, а повече от 20 гена - хемокиновите рецептори.



Фиг. 3. Структура на хемокинов рецептор – седем трансмембрани домена и характерен „DRY“ мотив във втория интрацелуларен домен.

Рецепторът е свързан с G-протеин, чрез който се предават сигналите към интрацелуларното пространство. Взаимодействието на хемокините със съответните им рецептори на повърхността на клетъчната мембрана подпомага клетъчното развитие, нормалната физиология и имунния отговор, като насочва клетките към специфични ниши в организма. Повечето хемокини се секретират, за да подпомогнат хемотаксиса in vivo. Те се имобилизират на клетъчната повърхност или екстрацелуларните матриксни повърхности, взаимодейвайки с отрицателно заредени глюкозаминогликани. Хемокините се свързват с различни глюкозаминогликани и с различен афинитет. Видът на глюкозаминогликаните варира според клетъчния тип, мястото на клетката и силата на възпаление. Тази селективна имобилизация е регулаторна стъпка, определяща функцията на хемокина в съответната тъкан и състояние [4]. Като компоненти на екстрацелуларния матрикс, свързаните и разтворими хемокини контролират миграцията, както на левкоцитите, така и на ендотелни и стволови клетки, разпределението им в тъканите и рецикулацията на клетките, индуцирайки клетъчна екстравазация или интравазация. В туморното развитие хемокините и техните рецептори играят основна роля, модулирайки клетъчния трафик към и от микросредата на тумора [5]. Хемокините секретирани от малигнените и стромални клетки повлияват фенотипа на тумор-асоциирания левкоцитен компонент, ангиогенезата и фибробластната строма. Стромалните хемокини действат директно подпомагайки преживяемостта на малигнените клетки, тъй като туморните клетки експресират функционални хемокинови рецептори, които нормално не се експресират от съответния тип клетки. Тези рецептори подпомагат метастатичната активност, като малигнените клетки придобиват способността да отговарят на хемокиновите градиенти в местата на метастазирание [6].

СИГНАЛИ НА ХЕМОКИНОВИТЕ РЕЦЕПТОРИ

Свързването на хемокин към хемокинов рецептор активира серия от сигнали водещи до интернализация на рецептора и сигнална трансдукция. Два са основните отговора на клетката – активация на интегрините с резултат клетъчна адхезия и поляризация на актиновия цитоскелет с формиране на F-актин. Последвалите вътреклетъчни верижни реакции водят до контракция на актомиозина, обратна ретракция и клетъчна миграция. Хемокиновите рецептори могат да образуват хомодимери или

хетеродимери, като това е важно за функцията им и показва комплексния характер на системата. Не по-малко значение за туморната биология има опосредстваната от хемокините активация на други сигнални системи, като тирозин-киназните рецептори и Jak-STAT пътя.

Различните клетъчни отговори зависят от вида на представяне на хемокина. Дендритните клетки свързали се чрез CCR7 с CCL21 адхерират към екстрацелуларния матрикс и мигрират, но те биха могли да извлекат остатъчен CCL21 от твърдата фаза. Разтворимият CCL21 показва функционално сходство с друг лиганд на CCR7 - CCL19, който не прикрепва клетката към екстрацелуларния матрикс. Едновременно действие на двата лиганда активира насочено хемотаксично движение, но не и адхезия. Адхезията и насочената миграция се медиират динамично и специфично, например в лимфния възел [1].

РОЛЯ НА ХЕМОКИНТЕ ПРИ ХРОНИЧНАТА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ

Поради изключително важната роля на хемокините за хемопоезата и миграцията на хемопоетичните клетки, през последните години се работи върху разкриване на тяхната роля при хематологичните неоплазии. Хроничната лимфоцитна левкемия (CLL) е най-често срещаната левкемия в България, Европа и САЩ. Характеризира се с натрупване на малки, моноклонални, зрели, но функционално имунонекомпетентни В лимфоцити, които се намират в периферната кръв, вторичните лимфоидни органи и костния мозък. Доказано е, че хемокините подпомагат пролиферацията и миграцията на моноклоналните В лимфоцити към костния мозък и вторичните лимфоидни тъкани и потискат спонтанната апоптоза на CLL клетките, спомагайки за преживяемостта им *in vitro*. Експресията на някои хемокини и хемокинови рецептори корелира с важни и установени прогностични показатели и те биха могли да спомогнат за индивидуализиране на оценката на риска при пациенти с CLL

ЛИГАНД CXCL12 (SDF-1) И CXCR4

Хомеостатичният хемокин CXCL12 е единичен лиганд за CXCR4 (CD184) рецептора. CXCR4 се експресира на болшинството хемопоетични клетки - неутрофили, моноцити/макрофаги, Т и В лимфоцити, CD34+ стволови клетки от костен мозък и периферна кръв, дендритни и Лангерхансови клетки. Рецепторът се отчита във високи нива на повърхността на перифернокръвните левкемични клетки и

опосредства техния хемотаксис, миграция през съдовия ендотел, полимеризация на актина и миграция към костномозъчните стромални клетки в отговор на CXCL12 (stromal cell-derived factor-1/ SDF-1), характеризирани като пре-В клетъчен растежен фактор [7]. Освен това CXCL12 показва директен ефект върху преживяемостта на CLL лимфоцитите (Фиг. 4). Повърхностната експресия на CXCR4 се регулира чрез лиганда CXCL12 посредством рецепторна ендоцитоза, настъпваща в резултат на активация (Табл. 1). Тази характеристика би могла да служи за разграничаване на тъканните (лимфни и костно-мозъчни) левкемични клетки, експресиращи ниски нива на CXCR4, от кръвните CLL клетки, които експресират високи нива на CXCR4 [8]. Пролифериращите Ki-67+ CLL лимфоцити от костния мозък и лимфната тъкан показват значително по-ниски нива на CXCR4 и CXCR5 от непролифериращите. *In vivo* белязани с деутерий (2H) CLL клетки показват обогатяване на левкемичните клетки експресиращи по-ниски повърхностни нива на CXCR4 при CD38+/CD5bright фракцията, заедно с повишена 2H инкорпорация [9]. Тези данни показват, че CLL субклонът с ниски кръвни повърхностни нива на CXCR4 е фракция от клетки скоро напуснали тъканите и излезли в кръвта. Сигналите на В-клетъчния рецептор (BCR) също понижават нивата на CXCR4, успоредно с повишен хемотаксис по отношение на CXCL12 и CXCL13 [10].

Това обяснява защо ZAP-70+ левкемични клетки показват повишен хемотаксис и преживяемост в отговор на CXCL12 сравнени със ZAP-70- CLL клетки, ако се приеме, че ZAP-70 експресията се свързва с по-силен отговор на стимулите от BCR. CD38+ CLL клетки също показват по-високи нива на хемотаксис спрямо CXCL12, докато блокирането с анти-CD38 моноклонални антитела инхибира хемотаксиса. CXCR4 сигналите в CLL клетките индуцират мобилизация на калция, активация на PI3Ks, p44/42 MAPKs, и серинова фосфорилация на STAT3 [11]. **CXCR4** сигналите могат да бъдат потиснати от селективни инхибитори на съответните изоформи на PI3K, Syk и Btk [10], което води до нарушена миграция както на нормалните В клетки, така и на левкемичните клетки. Според едни изследователски групи нивата на CXCR4 и неговия лиганд CXCL12 корелират с установени клинични параметри, като стадиращата система по Rai [12], **но други автори** не намират корелация с клиничния стадий на заболяването или вида на костномозъчната инфилтрация, а с лимфоцитния брой [13]. Трябва да се има предвид, че CXCR4 е конституционално експресиран рецептор на В-лимфоцитите, което би обяснило противоречивите данни на различните изследователски групи [12].

ЛИГАНД CXCL8 (IL-8) И РЕЦЕПТОРИ CXCR1, CXCR2

CXCR1 и CXCR2 са двата рецептора за CXCL8, чиято основна роля е при остро възпаление и вродения имунен отговор. Те се експресират основно на повърхността на макрофаги и неутрофили, но се отчитат и върху активирани еозинофили, базофили, Т лимфоцити, мастоцити и дендритни клетки. Основната функция на двата рецептора е подпомагане на клетъчната миграция след стимул от лиганда CXCL8. CLL клетките секретират CXCL8 и експресират неговите рецептори (Фиг. 4), което предполага както автокринна, така и паракринна стимулация на левкемичната клетка чрез CXCL8. При съпоставка секрецията на CXCL8 от CLL клетките с тази на нестимулирани тонзиларни CD5+ В лимфоцити се отчита значимо по-високо ниво на секреция от левкемичните клетки, което би могло да подкрепи тезата, че CXCL8 секрецията е зависима от активацията на левкемичния клон. Стимулацията чрез CXCL8 води до повишаване експресията на антиапоптотичния протеин Bcl-2, като по-този начин подпомага преживяемостта на клоналните лимфоцити. Нееднозначни са публикуваните данни за серумните нива на CXCL8. Описва се както корелация с утвърдени прогностични маркери като $\beta 2$ -микроглобулин, костномозъчно ангажиране и стадиращата система по Rai, така и липса на такава, което показва необходимостта от натрупване на допълнителни изследвания за установяване значението на тези взаимодействия при заболяването [14].

ЛИГАНД CXCL13 И CXCR5

Идентифициран е само един лиганд - CXCL13, свързващ рецептора CXCR5. Лигандът е селективно и конституционално експесиран във вторичните лимфоидни органи и играе важна роля както за лимфоцитния хоуминг, така и за тъканното развитие. Експесира се на повърхността на костномозъчните и перифернокръвни В лимфоцити, както и на малък брой Т лимфоцити (CD4+ и CD8+) в периферната кръв. Основната функция на CXCL13-CXCR5 взаимодействието е насочването на В лимфоцитите в В клетъчната зона на вторичните лимфоидни тъкани и осигуряване на близък контакт между В и Т лимфоцитите, необходим за В клетъчна активация, съвместно с CCR7 (Фиг. 4). CXCR5 се експесира като функционален рецептор на В CLL клетките, ето защо взаимодействието на левкемичната клетка с клетките експесиращи CXCL13 (CD68+ макрофаги в лимфоидните тъкани, фоликуларните дендритни или nurse-like клетки) би могло да има значение за позицио-

нирането на тези клетки в лимфоидната тъкан. CXCL13 е значимо повишен в серума на пациенти с CLL, като е намерена корелация с нивата на $\beta 2$ -микроглобулина [15]. Взаимодействието CXCL13-CXCR5 изглежда е част от особен механизъм за инхибиране на апоптозата в левкемичната клетка. CXCL13-CXCR5, съвместно с CCL19-CCR7, повишават експресията на частично експесиращия ген 10 (PEG10) в CD23+CD5+ CLL клетки, а също така и в CD19+CD34+ В лимфобласти. Повишеният синтез на съответния протеин стабилизира каспаза-3 и каспаза-8, които нормално са про-апоптотични протеини, предпазва ги от деградация, като по този начин води до потискане на TNF α индуцираната апоптоза (Табл. 1) [16]. Доказано е и антиапоптотично действие на CXCL13, чрез индукция на сигналните пътища ERK1/2 и Akt/GSK3.

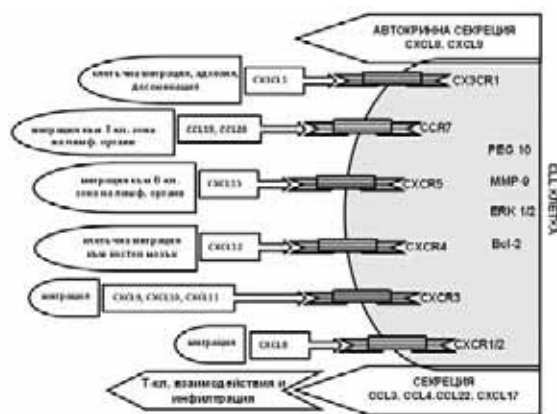
ЛИГАНДИ CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26 И CCR3

CCR3 се експесира на повърхността на еозинофили, базофили, дендритни клетки, а също така и върху някои CD4+ Т лимфоцити. Рецепторът се експесира върху Т клетките след стимулация с Th1 цитокина IL-2 и Th2 цитокина IL-4. Значението на тези лиганд-рецепторни взаимодействия е добре проучено при алергичните заболявания, но към момента много малко се знае за експресията на този рецептор върху В лимфоцитите и биологичните функции на CCR3 свързането [17]. Едно проучване на CCR3 експресията при В клетъчни неоплазии установява наличието на този рецептор върху неопластичните клетки на пациенти с CLL и по-голямата част от пациентите с трихолекемия, докато нормалните В клетки и малигнените В лимфоцити на пациенти с мантелноклетъчен лимфом, маргиналнозонов лимфом, дребноклетъчен лимфом и фоликуларен лимфом са почти винаги негативни. Експериментално е доказана и по-високата миграционна активност на В лимфоцитите експесиращи CCL3 [18].

ЛИГАНДИ CCL19, CCL21 И CCR7

CCR7 е основен рецептор отговорен за трафика на дендритните клетки, В и Т лимфоцитите през високите ендотелни венули и позиционирането им в Т клетъчните зони на вторичните лимфоидни органи (Фиг. 4). Лигандите му CCL19 и CCL21 се експесират в Т клетъчната зона на вторичните мукоза-асоциирани лимфоидни тъкани и високите ендотелни венули, но не и в В клетъчните зони, синусите и периферната кръв.

CCR7 се експресира основно от наивните Т лимфоцити, но се отчита в известни нива и върху В лимфоцитите. Доказана е ролята на рецептора и за развитието на вторичните лимфоидни органи. Повишената CCR7 експресия върху CLL клетките и CCL19, CCL21 експресията във високите ендотелни венули, е значимо по-изразена при пациенти с лимфоаденопатия, отколкото при тези с органомегалия. Връзката CCR7-CCL21 активира вътреклетъчните сигнални пътища ERK1/2 и c-Fos, което води до повишена експресия на MMP-9 и инфилтрация на левкемични клетки (Фиг. 4) през базалните мембрани [19]. **Установено е, че повишената експресия на CCR7 върху ZAP-70+ CLL клетки повишава и отговора на CCR7 към лигандите CCL19 и CCL21, като CD5 фосфорилацията води до допълнително повишение на CCR7 експресията на повърхността на левкемичната клетка [20].** Лиганд-рецепторното взаимодействие инхибира апоптозата чрез активацията на ERK1/2 и Akt сигналните пътища [16].



Фиг. 4. Хемокини и рецептори – участници в патофизиологията на CLL

Намерена е корелация на CCR7 експресията със стадиращата система по Rai, което показва необходимостта от допълнителни проучвания за евентуалното прогностично значение на този рецептор [12] (Табл. 1).

Рецептор	Лиганди	Експресия при CLL	Познати функции
CXCR1 CXCR2	CXCL8 (IL-8)	Аберантна или активационна експресия	Остро възпаление, вроден имунен отговор
CXCR3 (CD183)	CXCL9, CXCL10, CXCL11	Ниска до средна постоянна експресия	Th1 отговор, възпаление, интегрина активация, хемотаксична миграция
CXCR4 (CD184)	CXCL12	Висока, ниска при рецепторна ендоцитоза в резултат от взаимодействието с CXCL12	Органогенеза, лимфопоеза, хематопоеза, клетъчна миграция и преживяемост
CXCR5 (CD185)	CXCL13	Висока	В-клетъчна миграция, Th2 отговор (съвместно с CCR7 рецептора)
CCR3 (CD193)	CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26	Аберантна или активационна експресия	Участие във възпалителни реакции, Th2 отговор, клетъчна адхезия
CCR7 (CD197)	CCL19, CCL21	Средна до висока, корелира с лимфаденопатия	Активира В и Т лимфоцитите, стимулира узряването на дендритните клетки
CX3CR1	CX3CL1	Аберантна експресия	Участие във възпалителни реакции, директно клетъчно свързване посредством лиганда

Таблица 1. Хемокинови рецептори и хемокини взаимодействащи при CLL. **ХЕМОКИНИ СЕКРЕТИРАНИ ОТ КЛЕТКИТЕ НА CLL:** CCL3, CCL4, CCL22, CXCL8

ЛИГАНДИ CXCL9, CXCL10, CXCL11 И CXCR3

Хемокиновият рецептор CXCR3 взаимодейства с CXCL9, CXCL10 и CXCL11. Най-добре проучената функция на това взаимодействие е индукцията на експресия на Th1 цитокините. Рецепторът CXCR3 се експресира на повърхността на активирани Т (Th1) и NK лимфоцити, а също така в различна степен, на част от циркулиращите перифернокръвни левкоцити, макрофаги и дендритни клетки. На повърхността

на малигнените клетки CXCR3 е експресиран като функционален рецептор, подпомагащ насоченото движение и инвазията (Фиг. 4) [15]. Левкемичните клетки секретират само един от трите лиганда - CXCL9, показвайки автокринен, освен паракринния път на неопластична растежна стимулация. Проучванията показват корелация на ниската експресия на CXCR3 с напреднал стадий на заболяването (Rai III и Rai IV), неутирал IgVH статус, висока CD38 експресия и скъсена обща преживяемост на пациентите. Предполага се, че ниските нива на CXCR3 експресията биха могли

да послужат като независим неблагоприятен прогностичен фактор при CLL [21]. Фактът, че CXCR3 се експресира само при някои хематологични неоплазии, би могъл да го изведе и като маркер за диференциална диагноза (Табл. 1). Въпреки това значимостта на CXCR3 остава спорна и се нуждае от допълнителни проучвания.

ЛИГАНД CX3CL1 И CX3CR1

CX3CR1 е единственият хемокинов рецептор, чиято функция е директно клетъчно свързване посредством лиганда си. Рецепторът се експресира върху неутрофили, моноцити, NK клетки, Т лимфоцити и CLL клетки, но не и върху нормални В лимфоцити. CX3CL1 е единствен лиганд, който се експресира от невроните и ендотелните клетки. Нивата на CX3CL1 корелират с ангажирането на лимфните възли, факт доказан чрез компютърна томография, като същото проучване установява скъсяване на времето до лечение при пациенти с наличие на повишени серумни хемокинови нива. Хемокиновият лиганд би могъл да служи като маркер за прогресия на заболяването, особено в ранен стадий (Табл. 1) [22]. Корелацията на експресията на CX3CR1 малигнените В лимфоцити с нивата на Zap-70 експресията (сурогатен маркер за немутирал VH статус) поставя тази ос на взаимодействие на вниманието на изследователите, като допълнителна възможност за оценка на риска от прогресия [23].

Активираният CLL клетки секретират хемокините CCL3, CCL4 и CCL22, които участват в адаптивния имунен отговор и са хемоатраканти за Т лимфоцити и моноцити (Табл. 2). CCL3 и CCL4 се секретират нормално от В клетките след активация чрез BCR и CD40 лиганда. Малигнените В лимфоцити също секретират CCL3 и CCL4 в отговор на стимулация чрез BCR, когато са в кокултура с nurse-like клетки. Системата е чувствителна при инхибиране на BCR сигналите чрез добавяне на Syk или Btk инхибитор. Пациентите с CLL показват повишени плазмени нива на хемокините CCL3 и CCL4, като нивата на CCL3 корелират с установените прогностични маркери. Многофакторен анализ на кохорта от 351 пациента с CLL показва, че повишено ниво на CCL3, напреднал клиничен стадий, високо

рискова цитогенетика и висока CD38 експресия са независими прогностични маркери. Секретираният от CLL клетките CCL3 индуцира трафика на Т клетките към активирания CD38+/Ki-67+ левкемични клетки за осъществяване на Т-CLL клетъчни взаимодействия засилващи пролиферацията на малигнените клетки [24]. Подобно на CCL3 и CCL4, CCL22 участва в процеса на привличане на Т клетките в тъканите, към местата на взаимодействие с CLL клетките. CCL22 действа като вторичен, допълнителен сигнал спрямо Т лимфоцитите, което се доказва от факта, че секрецията му от малигнените клетки започва след свързване на CD40. Моноклоналната популация в периферната кръв не секретира CCL22, секреция се отчита от левкемичните клетки в лимфните възли и костния мозък, вероятно защото тези по-късни клетки са изложени на CD40 лигация. Основният рецептор за CCL22 е CCR4, който е с висока експресия върху FoxP3+ регулаторни Т клетки. Имуносупресивната им функция е добре характеризирана, но механизмът, по който те предават антиапоптотични сигнали към CLL клетките, не е достатъчно проучен. Предполага се, че след CD40 лигацията, секретираният CCL22 самостоятелно води до активиране на антиапоптотичните протеини Bcl-2 и Mcl-1, чрез повишаване фосфорилацията на IKKα/β. При разделянето на пациенти с CLL според отговора на CD40 лигацията, се установява, че пациентите не показващи отговор са с по-кратко време до прогресия на заболяването и възможност за пролиферация на малигнените клетки с по-ниско ниво на стромални стимули [25].

След стимулация с CD40 или CD74, лигандът CXCL8 (IL-8) се секретира от клетките на CLL, по този начин автокринният и паракринен механизъм предават антиапоптотични сигнали към левкемичната клетка.

Друг възможен активатор на IL-8 секрецията от малигнената клетка е чрез рецепторния активатор на NF-κB лиганда (RANKL), което води до повишена апоптотична резистентност към терапията [26]. Плазмените нива на IL-8 показват корелация с преживяемостта [27] и вероятно имат прогностична значимост. Малигнените клетки взаимодействат с Т лимфоцитите и другите имунни клетки, секретират собствени хемокини, с което подпомагат себе си и микросредата, която ги поддържа.

Хемокин	Рецептор	Експресия при CLL	Предполагаеми функции
CCL3	CCR1, CCR5	След активация от BCR по-висока при Zap-70+ CLL, Syk – зависима	При възпаление, активация на полиморфонуклеарните левкоцити и В клетките. Подпомага Т клетките при Т-В клетъчните взаимодействия.
CCL4	CCR5	Както при CCL3	Както при CCL3
CCL22	CCR4	След CD40 лигация	Подпомага регулаторните Т лимфоцити

Таблица 2. Хемокини секретирани от CLL клетката [24]

ВЪЗМОЖНИ ТЕРАПЕВТИЧНИ ТАРГЕТИ В ХЕМОКИНОВАТА МРЕЖА

CXCR4 може да бъде специфично блокиран от CXCR4 антагонисти, които инхибират CLL-клетъчната активация, постигната по пътя на CXCL12 и променят частично медираната от стромалните клетки лекарствена резистентност. Тези данни са в основата на клинично проучване при което, пациенти с рецидив на заболяването са третирани с комбинация от Rituximab и Plerixafor (ниско молекулен CXCR4 антагонист, одобрен от FDA като агент мобилизиращ стволови клетки за автоложна трансплантация при не-Ходжкинови лимфоми) за мобилизация на левкемичните клетки от тъканите в кръвта, където извън действието на протективни фактори те се подлагат на таргетна терапия. Предварителните данни от проучването показват Plerixafor-зависима от дозата мобилизация на CLL клетките.

Бъдещи изследвания биха могли да комбинират CXCR4 антагонисти с утвърдени цитотоксични агенти или моноклонални антитела при установяване на минимална резидуална болест, за мобилизиране и елиминиране на остатъчните CLL клетки от тъканните структури [28].

CXCR5 и CCR7 инхибитори теоретично биха могли да потиснат активационните сигнали на стромата, но подобни изследвания са все още в начална фаза на разработване.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Малко се знае за ролята на хемокините в малигнените заболявания. Хемокиновите рецептори и лиганди се изследват при редица туморни процеси, но не е даден отговор на въпросите:

Защо има толкова различни хемокини за един рецептор и дали едни лиганд-рецепторни взаимодействия са по-значими от други?

Хемокините са важна част от механизма на миграция и оцеляване на малигнената клетка, но как те взаимодействат с други растежни и антиапоптотични фактори?

Какво е общото между патологията на възпалението и малигнения процес?

Това са въпроси, чиито отговори се нуждаят от бъдещи системни проучвания.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Schumann K, Lämmermann T, Brückner M et al. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. - *Immunity*. 2010, **32**, № 5, 703–13.
2. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. - *Immunity*. 2000, **12**, № 2, 121–7.

3. Di Liberto D, Locati M, Caccamo N et al. Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. - *J Exp Med*. 2008, **205**, № 9, 2075–84.
4. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. - *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002, **283**, 1, R7–R28.
5. Allavena P, Germano G, Marchesi F et al. Chemokines in cancer related inflammation. - *Exp Cell Res*. 2011, **317**, № 5, 664–73.
6. Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. - *Nat Rev Immunol*. 2011, **11**, № 9, 597–06.
7. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Express Functional CXCR4 Chemokine Receptors That Mediate Spontaneous Migration Beneath Bone Marrow Stromal Cells. - *Blood*. 1999, **94**, № 11, 3658–67.
8. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. - *Blood*. 2011, **117**, № 2, 563–74.
9. Calissano C, Damle RN, Marsilio S et al. In vivo intracloal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. - *Blood*. 2009, **114**, № 23, 4832–42.
10. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel spleen tyrosine kinase inhibitor, R406. - *Blood*. 2009, **114**, № 5, 1029–37.
11. Burger M, Hartmann T, Krome M et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. - *Blood*. 2005, **106**, № 5, 1824–30.
12. Ghobrial IM, Campigotto F, Murphy TJ et al. Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. - *Mayo Clin Proc*. 2004, **79**, № 3, 318–25.
13. Dao-Ung LP, Sluyter R, Fuller SJ et al. CXCR4 but not CXCR3 expression correlates with lymphocyte counts in B-cell chronic lymphocytic leukemia. - *Ann Hematol*. **83**, 2004, № 5, 326–27.
14. Schrötnner P, Leick M, Burger M. The role of chemokines in B cell chronic lymphocytic leukaemia: pathophysiological aspects and clinical impact. - *Ann Hematol*. 2010, **89**, № 5, 437–46.
15. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A et al. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. - *Blood*. 2007, **110**, № 9, 3316–25.

Ticchioni M, Essafi M, Jeandel et al. Homeostatic chemokines increase et al. Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor

FOXO3a. - *Oncogene*. 2007, **26**, № 50, 7081–91.

16. Tan Jinqun, et. al. CCR3 Expression Induced by IL-2 and IL-4 Functioning as a Death Receptor for B Cells. - *J Immunol*. **171**, 2003, 1722-31.
17. Trentin L, Cabrelle A, Facco M et al. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas – *Blood*. 2004, **104**, № 2, 502-8.
18. Till KJ, Lin K, Zuzel M et al. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. – *Blood*. 2002, **99**, № 8, 2977–84.
19. Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Marteau JB et al. Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. - *J Immunol*. 2007, **179**, № 7, 4335–44.
20. Ocana E, Delgado-Pérez L, Campos-Caro A et al. The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. - *Haematologica*. 2007, **92**, № 3, 349–56.
21. Morabito F, Merendino RA, Penna G et al. The CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1) is detectable in serum of B cell chronic lymphocytic leukemia patients with lymph node involvement. - *Acta Haematol*. 2005, **113**, № 2, 152–4.
22. Ferrer A, Ollila J, Tobin G et al. Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia. - *Cancer Genet Cytogenet*. 2004, **153**, № 1, 69–72.
23. Burger JA. Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia - *ASH Education Book 2011*. 2011, № 1, 96-103.
24. Scielzo C, Apollonio B, Scarfò L et al. The functional in vitro response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. – *Leukemia*. 2011, **25**, № 11, 1760-7.
25. Secchiero P, Corallini F, Barbarotto E et al. Role of the RANKL/RANK system in the induction of interleukin-8 (IL-8) in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. - *J Cell Physiol*. 2006, **207**, № 1, 158-64.
26. Wierda WG, Johnson MM, Do KA et al. Plasma interleukin 8 level predicts for survival in chronic lymphocytic leukaemia. - *Br J Haematol*. 2003, **120**, № 3, 452-6.
27. Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. – *Leukemia*. 2009, **23**, № 1, 43–52.

Адрес за кореспонденция

Водещ автор:

Росица Владимирова-Андреева

Отделение по клинична имунология

Катедра по клинична лаборатория и

имунология

ВОЕННОМЕДИЦИНСКА АКАДЕМИЯ

бул. "Св. Г. Софийски" № 3

София 1606

тел.: 02 92 25 523 / 02 92 25 722

02 92 25 111

e-mail: rossy_vladimirova@yahoo.com

НУКЛЕАРНОМЕДИЦИНСКА ДИАГНОСТИКА ПРИ МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ

Д. Василева*, С. Сергиева **

* Лаборатория „Нуклеарно-медицинска диагностика“, Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

** Отделение по нуклеарна медицина, Специализирана болница за активно лечение на онкологични заболявания, София

NUCLEAR MEDICINE DIAGNOSTICS IN MULTIPLE MYELOMA

D. Vassileva*, S. Sergieva **

*Department of Nuclear Medicine, National Hospital of Active Treatment of Haematology, Sofia

**Department of Nuclear Medicine, Sofia Cancer Center

Резюме. Костномозъчната инфилтрация от миеломни клетки, често съпътстваща се с деструкция и на костите е характерна при мултиплен миелом. Стандартните образни методи, като рентгенография и компютърномография са с ограничени възможности за ранна диагностика и доказване на костните и костномозъчни лезии.

Настоящият доклад има за цел да обобщи клиничните данни, публикувани в научната литература за клиничното приложение на сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -Tetrofosmin, ^{99m}Tc -MDP. Въвеждането на хибридни методи като SPECT/CT и PET/CT довежда до качествено нов етап в диагностиката, стадирането, и проследяването на лечебния ефект при болни с мултиплен миелом. Това е от съществено значение за оптимизиране на терапевтичния подход и подобряване на прогнозата на това заболяване. Разглежда се и корелацията на резултатите от сцинтиграфските методи със стойностите на бета-2-микроглобулин.

Ключови думи: мултиплен миелом, сцинтиграфии с ^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -MDP, SPECT/CT и PET/CT, бета-2-микроглобулин в серума, диагностика и терапевтичен контрол

Summary. Bone marrow involvement as well as the bone destruction is a characteristic and usual feature of multiple myeloma. Standard diagnostic imaging methods, such as radiography and bone scan, have certain limitations for the early evaluation of bone and bone marrow lesions in multiple myeloma.

The aim of the presentation is to demonstrate the clinical usefulness of radionuclide imaging with ^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -Tetrofosmin, ^{99m}Tc -MDP. Introduction of hybrid methods such as SPECT/CT and PET/CT is qualitative leap in the diagnostic, staging and follow-up of treatment effect in patients with multiple myeloma. They have a vital significance to optimize treatment approach and to improve the prognosis of this disease. The scintigraphy data showed a good correlation with the level of serum beta-2-microglobulin.

Key words: multiple myeloma, ^{99m}Tc MIBI, ^{99m}Tc MDP scintigraphy, SPECT-CT and PET/CT, serum beta-2-microglobulin, diagnosis and therapy control

Въведение

Костномозъчната инфилтрация от миеломни клетки, често съпътствана от деструкция на костите, е характерна при мултиплен миелом (ММ). В началото на заболяването клиничната картина е нетипична и най-честите симптоми са болките в костите и патологичните фрактури при тези па-

циенти. Имайки предвид, прогресивното злокачествено протичане на това заболяване, екзактна диагноза и прецизното стадиране позволяват оптимизиране на терапевтичния подход с подобряване на прогнозата при ММ.

Стандартните визуализиращи методи като рентгенография и костна сцинтиграфия са с ограни-

чени възможности за ранно откриване на промените в костния мозък и костите, предизвикани от това заболяване. В последните години големите възможности на хибридните методи в нуклеарната медицина, прилагани при изследване на пациенти с ММ, са тясно свързани от една страна с непрекъснатото въвеждане на нова, съвременна апаратура и от друга, с приложението на нови радиофармацевтици. Техническото и софтуерно усъвършенстване на нуклеарномедицинските апарати е във връзка с повишаване на разделителната способност на образите; определяне топографията на туморните лезии; качествено и количествено характеризиране степента на натрупване на радиомаркерите, обективизираща активността на туморния процес; въвеждане на дигитални компютърни програми за получаване на скintiграфските образи. Разработването и въвеждането на нови радиофармацевтици е свързано с изучаване метаболизма на туморните клетки. Най-често прилаганите радиомаркери в практиката са белязани вещества, които избирателно се натрупват в различни структури на патологично променените клетки или участват в техния метаболизъм. Понастоящем при нуклеарно-медицинските изследвания се прилагат предимно по-ниско енергийни радионуклиди с по-кратък период на полуразпад.

Прилаганите в практиката скintiграфски изследвания, като функционални методи с висока чувствителност и специфичност, отразяват промените, настъпили в костния мозък и костите при миеломната болест. Приложението на бета-2-микроглобулин (β_2M), като туморен маркер, съчетано с образни радионуклидни методи е от значение както за диагнозата, така и за проследяване ефекта от проведената терапия.

Настоящият доклад обсъжда възможностите и мястото на нуклеарномедицинските методи при стадиране и мониториране ефекта от проведената терапия при пациенти с ММ. Преценката за избор на определен радионуклиден метод се прави по данните за специфичност и чувствителност при конкретната нозологична единица; характеристика на радиомаркера, с който се провежда изследването; възможност за визуализация над и под диафрагмата; възможност за разграничаване на фиброзна от активна тъкан; оценка на степен на натрупване на радиомаркера в патологичните лезии.

Приложение на скintiграфия с ^{99m}Tc -MIBI при ММ

Радиофармацевтикът ^{99m}Tc -MIBI, приложен в началото за изследване на миокардна перфузия, по-късно намира приложение като туморотропен маркер при някои неоплазии, включително и ММ.

^{99m}Tc -MIBI е катионен комплекс, който се включва в митохондриите на клетката. Разликата в електрозарядите от една страна – положителният на комплекса ^{99m}Tc -MIBI и от друга – електроотрицателният на митохондриалната мембрана, опосредства включването на радиомаркера в клетката. Повишеното натрупване на ^{99m}Tc -MIBI в туморните клетки е свързано с повишения брой митохондрии в тях и със силно негативните мембранни потенциали, в резултат на повишения клетъчен метаболизъм.

Durie и сътр.(1) за първи път през 1994 година, а по-късно други автори показват възможностите на ^{99m}Tc -MIBI скintiграфията при доказване на костни лезии при миелом. При тези пациенти с помощта и на други диагностични тестове се установява активност на заболяването. В тези първи проучвания авторите не открояват ясно диагностичните възможности на ^{99m}Tc -MIBI скintiграфията при визуализация на костномозъчната инфилтрация от патологично променените клетки (2,3).

Wakasugi и сътр.посочват в своите изследвания, че промените в костите, свързани с нарушения в костното ремоделиране, се предшества от инфилтрация на костния мозък от патологичните клетки. Позитивната скintiграфия с ^{99m}Tc -MIBI се явява ранен индикатор при болните с ММ на последващите костни лезии (4).

Редица авторски колективи (5,6,7,8,9) установяват при своите изследвания, че скintiграфията с ^{99m}Tc -MIBI дава възможност за визуализиране на огнища с плазмоцитна инфилтрация в костния мозък. Имайки предвид данните от скintiграфските изследвания, Pace и сътр (10) класифицират промените при пациенти с ММ в следните групи:

1. нормално биоразпределение на радиомаркера;
2. дифузно натрупване на радиофармацевтика в костния мозък;
3. фокални натрупвания на радиомаркера;
4. отчитане както на дифузни, така и на фокални промени.

Нормално биоразпределение на радиомаркера се отчита при пациенти в ремисия, след проведена полихимиотерапия. Цитира се, че при пациенти с дифузно натрупване на радиофармацевтика, прогнозата е по-добра. Nandurkar и сътр. и Vasovsky и сътр. показват в своите проучвания, че фокалните промени, регистрирани при скintiграфските изследвания са свързани с активност на заболяването и с по-лоша прогноза (12,13). Данните от скintiграфските изследвания са в помощ на диагнозата, прогнозата на заболяването и отчитане ефекта и от проведената терапия.

Авторските колективи на Balleari, Koustikos, Pace (8,10,13) прилагат скала, отчитаща екстензия-

та (Е) на плазматичните клетки в костния мозък, доказана при сцинтиграфското изследване, както следва:

0 – липсва инфилтрация;

1- визуализиране на гръбначен стълб и таз,

2- визуализиране на гръбначен стълб, таз и ребра, както и проксимален край на хумерус или фемур;

3- визуализиране на гръбначен стълб, таз, ребра, както и дистален край на хумерус и фемур.

Цитираните автори (8,9,13) отчитат и интензитета на натрупване на радиомаркера в туморните лезии, сравнявайки интензитета на натрупване на радиомаркера с този в сърцето (I):

0 – липсва натрупване на радиомаркера;

1 – интензитетът на натрупване в костния мозък е по-слаб от този в сърцето,

2 – интензитетът на натрупване на радиомаркера в костния мозък е както този в сърцето,

3 – интензитетът на натрупване в костния мозък е по-висок от този в сърцето.

В своите изследвания Fonti и сътр. и Giovanella и сътр. установяват корелация между проведените сцинтиграфски изследвания и степента на инфилтрация на костния мозък от малигнените клетки (7,14). Раса и сътр., Saber и сътр. посочват в проучванията си за установена корелация между интензитета на натрупване на радиомаркера, стадия на заболяването и неговата екстензия (9,15).

Различни авторски колективи цитират в своите проучвания близки стойности за чувствителност и специфичност на сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc -MIBI: Balleari и сътр.-чувствителност 90% и специфичност 88%; Villa и сътр.-чувствителност 92% и специфичност 96%; Saber и сътр.-чувствителност 92% и специфичност 90%; Svaldi и сътр.-чувствителност 100% и специфичност 93% (13,15,16,17).

Редица автори показват, че сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc -MIBI, проведени преди и след терапия при пациенти с ММ, дават възможност за отчитане ефекта от проведената терапия. При благоприятно повлияване от приложеното лечение, процентът на абнормните клетки намалява и сцинтиграфските данни се негативират. При част от пациентите с миелом след проведена полихимиотерапия, лъчетерапия или трансплантация на хемопоеични стволови клетки, с позитивният образ от сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc -MIBI и повишените стойности на $\beta_2\text{M}$ се интерпретират като израз на непълен терапевтичен отговор. Въз основа на получените резултати за остатъчни лезии се преоценява последващия терапевтичен подход (5,10,13,15,16,17,18,19).

Приложение на сцинтиграфия с ^{99m}Tc -Tetrofosmin при ММ

^{99m}Tc -Tetrofosmine радиомаркер прилаган за сцинтиграфски изследвания при мултиплен миелом. Механизмът на включване в митохондрии-те на туморните клетки е аналогичен на този на ^{99m}Tc -MIBI – базира се на разликата в електропотенциалите на радиомаркера и този на митохондриялната мембрана, но известна част от него остава в клетъчния цитозол. Възможностите за визуализиране на патологичните огнища при мултиплен миелом с двата маркера са равностойни (20).

Възможности на костната сцинтиграфия при ММ

Костната деструкция е най-честата клинична изява на ММ, регистрирана в 70-75% от болните. Процентът на засягане от болестния процес на костите нараства с напредване на заболяването. Малигнените клетки, инфилтриращи костите, активират остеокластите, свързани с костната резорбция. Настъпват процеси на декалцификация и остеолитични костни промени от генерализиран или огнищен тип. Характерни са остеопорозата, остеолитичните огнища и спонтанните фрактури в костите – прешлени, ребра, раменна кост, гръдна кост, ключица, тазови кости.

Редица автори (5,21,22,23) в своите проучвания посочват възможностите на костната сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MDP за визуализиране на костните промени при ММ. Целотелесна костна сцинтиграфия се провежда 2-3 часа след венозно аплициране на ^{99m}Tc -MDP на гама камера. Нормалната биокинетика на ^{99m}Tc -MDP е свързана с включване на радиомаркера в минералната фаза на костообразуването при активирана функция на остеобластите. При засягане на костта от миеломния процес е засилена остеокластната активност в областта на остеолитичните огнища, като нормалната костна тъкан около лезиите реагира с остеобластна реакция.

В свое обширно проучване Woolfenden и сътр. (23) правят следната оценка на клиничното значение на костната сцинтиграфия при пациенти с миелом:

1. Насочване към заболяването при пациенти с болки в костите.
2. Визуализиране на патологични фрактури.
3. Възможност за доказване на костните промени преди позитивиране на рентгенологичните изследвания.
4. Установяване екстензията на заболяването и корелация на данните от сцинтиграфските изследвания с преживяемостта на пациентите.

Имайки предвид нарушеното равновесие

на процесите на костообразуване и костна резорбция и биокинетиката на радиомаркера, посочените автори в своите проучвания показват ограничените диагностични възможности на костната сцинтиграфия при визуализиране на остеолитичните огнища при миелом. (5,21).

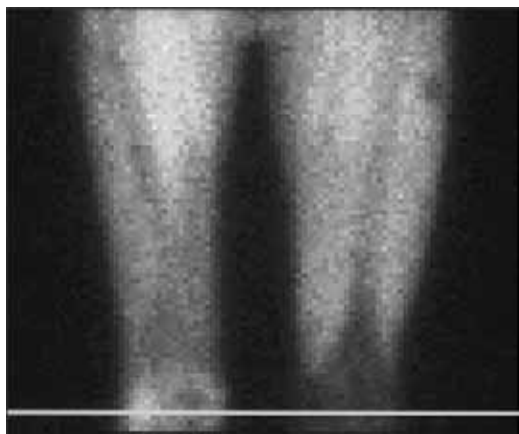
Комплексно сцинтиграфско изследване с ^{99m}Tc -MIBI и ^{99m}Tc -MDP при ММ

Научните колективи на Alexandrakis и Wakasugi, сравнявайки възможностите на сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc MIBI и ^{99m}Tc MDP, посочват неоспоримите предимства на сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI при изследване на пациенти с миелом (4,6).

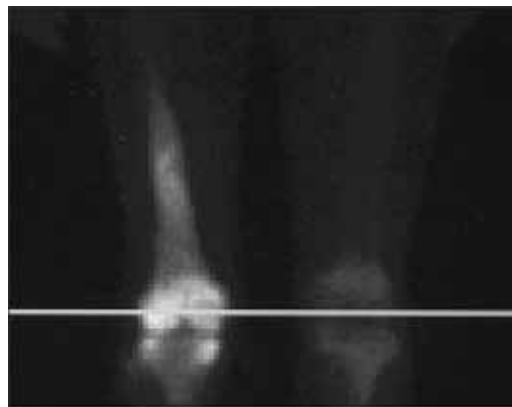
Имайки предвид възможностите на посочените сцинтиграфски методи и данните от проведените от нас комплексни изследвания, пациентите с миелом са класифицирани в четири групи (24,25).

При пациентите в първа група с негативна костна сцинтиграфия, позитивната находка при изследване с ^{99m}Tc -MIBI показва костномозъчната инфилтрация от миеломни клетки преди другите визуализиращи методи. Промените в костния мозък при тези пациенти предхождат по време промените в костната тъкан, при което сцинтиграфията с ^{99m}Tc -MIBI се позитивира по-рано от костната сцинтиграфия.

При пациентите във втора група с ММ с напредване на заболяването, миеломните клетки, разрастнали се в костния мозък, инфилтрират и костната тъкан. При тези болни в активна фаза на заболяването, сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc -MIBI и ^{99m}Tc -MDP се позитивират. Повишено натрупване на радиомаркера се регистрира в раменна кост, гръдна кост, ребра, гръдни и лумбални прешлени, таз, бедрена кост. Предимство на сцинтиграфските изследвания е, че като функционални тестове, дават възможност за определяне активността на миеломния процес. При това е налице възможността при едно цялостно изследване да се визуализират всички огнищни лезии при пациентите.



Фиг. 1а. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MIBI при пациент с ММ - повишено натрупване на радиомаркера в дистална част на дясна бедрена кост.



Фиг. 1б. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MDP при пациент с ММ - повишено натрупване на радиомаркера в дистална част на дясна бедрена кост.

При пациентите в трета група се отчита негативна сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MIBI, израз на пълен терапевтичен отговор след проведената терапия. Позитивната костна сцинтиграфия при пациентите с ММ във третата група е във връзка със засилената остеобластна активност около остеолитичните огнища във възстановителния период на костта след фрактури, проведена консервативна терапия (химиотерапия, лъчетерапия, трансплантация на хемопоетични стволови клетки) или оперативно лечение.



Фиг. 2а. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MIBI при пациент с ММ след оперативно лечение - липсва патологично натрупване на радиомаркера.



Фиг. 2б. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MDP при пациент с ММ след оперативно лечение - повишено натрупване на радиомаркера в дистална част на лява бедрена кост.

При пациентите в четвърта група, регистрираните нормални образи при двете сцинтиграфски изследвания са израз на доброто терапевтично повлияване след прекъсване на терапията.

Данните от приложението на сцинтиграфията с ^{99m}Tc -MIBI, цитирани както от нас, така и от други автори (4,6,24,25) посочват предимството на този метод като високо специфичен, неинвазивен и лесно достъпен в диагностиката на миеломната болест. Методът дава възможност за визуализиране на костномозъчната инфилтрация от миеломни клетки по-рано от рентгенологичните и компютъртомографски изследвания.

Противоречиви са данните относно диагностичната стойност на костната сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MDP, проведена самостоятелно при пациенти с ММ (5,21). Характерни за миеломната болест са деструктивните промени в костите. Малигнените клетки, инфилтриращи костната тъкан, активират остеокластите, свързани с костната резорбция. Настъпват процеси на декалцификация и остеолитични костни промени от генерализиран или огнищен тип. Нормалната биокинетика на ^{99m}Tc -MDP е свързана с минералната фаза на костнообразуването при активирана функция на остеобластите. Именно около остеолитичните лезии се активират остеобластите, процес започващ още в активната фаза на заболяването и завършващ при стабилизирането му. Имайки предвид нарушеното равновесие на процесите на костнообразуване и костна резорбция и биокинетиката на радиомаркера, както в наши проучвания, така и на други автори са показани ограничените диагностични възможности на костната сцинтиграфия при визуализиране на остеолитичните огнища при миелом. Позитивната костната сцинтиграфия при пациентите, включени във втора и трета групи, при които костната сцинтиграфия е позитивна, не могат да бъдат ориентир за активността на заболяването (24,25).

Имайки предвид получените резултати при нашето проучване, смятаме, че данните от костната сцинтиграфия имат диагностична стойност при пациенти с ММ само при съчетание с тези на туморотропната сцинтиграфия с ^{99m}Tc -MIBI, доказваща активността на миеломния процес. Костната сцинтиграфия приложена при пациенти с ММ и фрактури, дава възможност за визуализиране процеса на костнообразуване в оздравителния период.

SPECT-CT изследвания при ММ

През последното десетилетие в клиничната практика бяха въведени комбинираните SPECT-CT изследвания, които представляват съчетание на високо чувствителните еднофотонни емисионни компютърни томографии (SPECT) с компютър-

томографските (СТ) изследвания. Тези хибридни методи дават възможност да се визуализира морфологичния субстрат на сцинтиграфски установените фокални огнища с повишено натрупване на различните радиофармацевтици. Компютъртомографските изследвания са високо информативни по отношение на анатомичната структура, размери, топография и вид на патологичните изменения на изследваните тъкани и органи. Посредством получените хибридни SPECT-CT образи, при които сцинтиграфските картини се наслояват върху съответните компютъртомографски проекции, се повишава специфичността на SPECT изследванията и се подобрява диагностичната точност на двата метода. Посочените предимства на тези методи са с особена клинична стойност при изследване на патологични процеси, локализирани в обемни части на тялото, каквито са например гръдния кош или абдоминалната област (26,27). Благодарение на възможностите, които предоставят SPECT изследванията, суперпозиционирането на фокалното "горещо" огнище може да бъде локализирано точно; да се характеризира вида на морфологичното изменение – солидно, кистозно, с инфилтративен растеж в околните тъкани, наличие на капсула, калцификати и т.н.; да бъде отдиференцирано от зоните с физиологична активност.

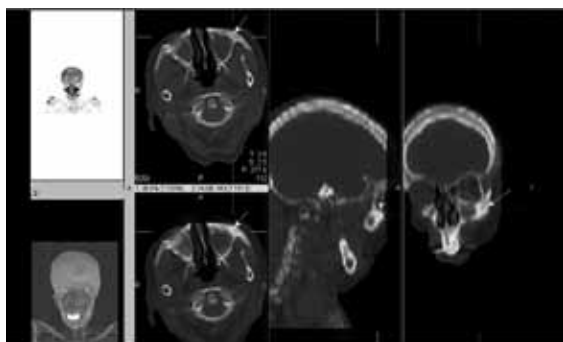
SPECT-CT изследванията при ММ намират приложение при провеждането на сцинтиграфии с маркирани фосфатни комплекси и сцинтиграфии с туморотропни радиомаркери ^{99m}Tc -MIBI или ^{99m}Tc -Tetrofosmin.

При неясен резултат от целотелесната костна сцинтиграфия се провеждат SPECT-CT изследвания в прицелните зони на интерес с оглед диагностично уточнение на suspectните огнища с абнормен минерален метаболизъм. При част от болните целотелесните костни сцинтиграфии са фалшиво негативни. Това се дължи на факта, че вторичните осални лезии в ранния стадий на костна деструкция са малокалибрени, с размери до 3-4 мм, с изразена остеолитична компонента, с отсъстваща остеобластна реакция, което възпрепятства свързването на въведените ^{99m}Tc -маркирани фосфати с остеобластните клетки и съответно позитивирането на патологичните огнища (5,21,22). Допълнителното провеждане на прицелните SPECT-CT изследвания дава възможност за визуализиране на огнища с размери под 10 мм (колкото е нормалната разделителна способност на SPECT изображенията); за тяхната морфологична характеристика; визуализиране на дискретни костни промени; за диференциална диагноза на доброкачествените промени от злокачествената патология в скелета; за определяне на таргетния обем при лъчетерапевтичното планиране; за проследяване на ефекта

от прилаганото лечение (28,29).

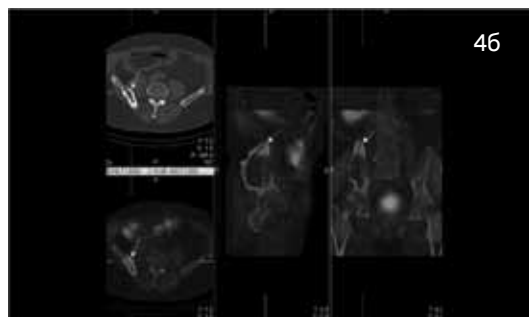
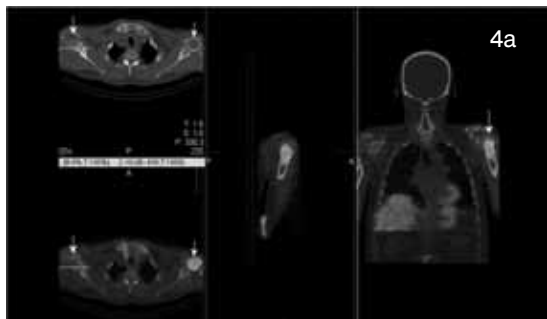


Фиг.3.а. Целотелесна костна скintiграфия при пациент с ММ - визуализира се повишен минерален метаболизъм в областта на калварията и двата максиларни синуса.



Фиг.3.б. SPECT-CT при пациент с ММ - визуализират се малокалибрени остеолитични лезии, локализирани в париеталните кости и максиларните синуси.

SPECT-CT изследванията с ^{99m}Tc -MIBI или ^{99m}Tc -Tetrofosmin дават възможност за визуализиране на костномозъчната инфилтрация от миеломните клетки, както в началото на заболяването, така и при засягане на компактните части на скелета при авансирал малигнен процес, като се анализират паралелно скintiграфската находка на фокално абнормно натрупване със съответстващата анатомичната костна структура. Тези два туморотропни радиофармацевтици са приложими за проследяване на болните с мултиплен миелом след провеждане на комплексна терапия при клинични и параклинични данни за рецидив на заболяването. Чрез тях е възможно визуализиране на активен пролиферативен процес в засегнатите костни структури, сигнификантен за прогресия на болестта.



Фиг. 4.а. SPECT-CT с ^{99m}Tc -MIBI при пациент с ММ – интензивно натрупване на радиомаркера в двете раменни кости и дисталната част на корпус стерни.

Фиг. 4.б. SPECT-CT с ^{99m}Tc -MIBI в областта на абдомена и тазовите кости – в дисталната част на сакрума и крилото на дясната илйачна кост се регистрира повишен минерален метаболизъм, сигнификантен за рецидив и прогресия на заболяването.

Приложение на PET/CT изследвания при мултиплен миелом

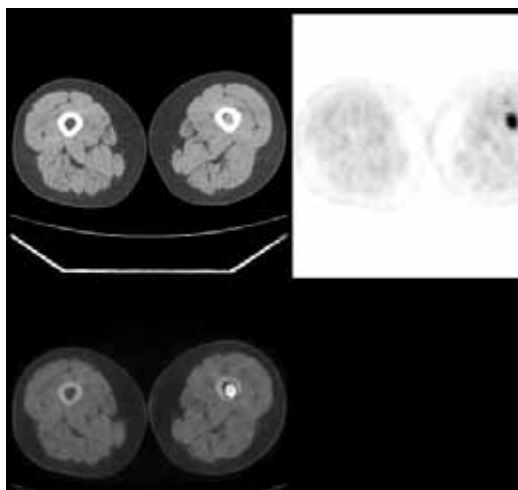
С навлизане на хибридните методи на визуализация в медицинската практика се откриват нови възможности за диагностика и контрол на терапията при болни с неоплазии.

Позитронната емисионна томография в съчетание с компютър томография (PET/CT) в последните години се налага като метод на избор при изследване на болни с мултиплен миелом. Предимство на PET/CT изследванията е не само във визуализиране на огнища с патологично променен метаболизъм , но и точната им локализация и количествена оценка (5).

Изследванията се провеждат след интравенозно инжектиране на биологично активни съединения, белязани с позитронни емитери. Изискванията към тези радиофармацевтици е да се натрупват в туморната тъкан и да притежават гама емисия с подходяща за детекция енергия. Основният радиофармацевтик, който се прилага у нас е **18-Fluorine-fluoro-deoxyglucose (18F-FDG)**. Механизмът на включването на FDG в туморните клетки следва глюкозния метаболитен път. Времето на полуразпад на 18F е 109,7 минути. Натрупването на радиомаркера е свързано с метаболитната активност на миеломните клетки. Скенирането се провежда **60-90 минути след венозно аплициране на радиомаркера на PET/CT камера** (5,30). Освен качествената оценка на получените резултати, е въведена и количествена оценка, която отчита степента на натрупване на глюкозата в патологичните огнища и отразява активността на процеса. При проведените изследвания по формула се изчислява показателят - стандартизирана оценка на натрупването (SUV), имайки предвид активността в патологичното огнище, инжектираната активност и теглото на пациента. Приема се, че стойности на SUV по-високи от 2,5 са показатели за малигнена активност на лезиите (5).

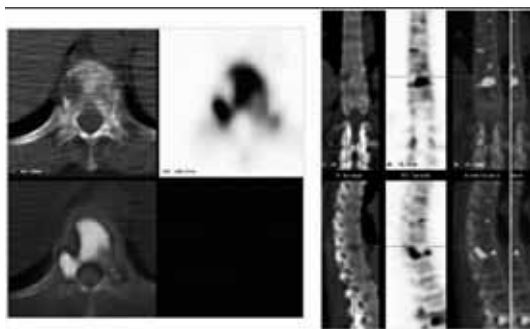
За разлика от лимфомите, при изследването на които се натрупа богат опит при PET/CT **визуализиране** на туморния процес, при MM данните са доста по-оскъдни. Първите изследвания на Kato и сътр. и Schirrmeister и сътр. показват за първи път възможностите на позитронната емисионна томография за доказване на метаболитно активни лезии при пациенти с MM. Чувствителността на метода при доказани скитниграфски фокални лезии е 93% и 84-92% при дифузни лезии (31,32,33).

Провеждането на скитниграфските изследвания е от значение както в началото на заболяването, така и при проследяване ефекта от проведената терапия. В началото на проява на болестния процес скитниграфското изследване дава възможност за ранно визуализиране на костномозъчната инфилтрация от плазматични клетки (33).



Фиг.5. PET/CT при пациент с MM – визуализира се костномозъчна инфилтрация от миеломни клетки, преди деструкция на компактна костна тъкан на лява бедрена кост.

С напредване на заболяването, скитниграфските данни насочват към екстензия на заболяването и определяне на неговата активност (34). Налице е корелация между скитниграфските данни и други лабораторни тестове за активност на заболяването. Съчетанието на скитниграфско с компютърномографско изследване дава възможност за отчитане както на морфология – топография, така и функция на патологичните огнища (5).



Фиг.6. PET/CT при пациент с MM – визуализират се деструктивни костни промени в телата на торако-лумбалните прешлени.

Предимство на PET/CT изследванията при болни с миелом е визуализиране на екстрамедуларни лезии, които се явяват лош прогностичен белег при тези болни (35,36). Някои изследователи посочват и възможността при визуализацията да се разграничи MM от моноклонална гамопатия (MGUS), при която скитниграфските изследвания са негативни (35).

Препоръчва се PET/CT изследванията да се провеждат 4 седмици след прилагане на химиотерапия и 2-3 месеца след радиотерапия. Негативните скитниграфии са индикатор за позитивен ефект от приложената терапия. При болни с MM, позитивните скитниграфски изследвания, визуализиращи остатъчни лезии са индикация за корекция на терапията със съвременни подходи – нови медикаменти, трансплантация на хемопоеични стволови клетки (33,35).

Durie и сътр. прилагайки серийни PET/CT изследвания след преклчване на терапията посочват възможността и за ранно откриване на рецидива при тези пациенти(37).

Определяне серумно ниво на бета-2-микроглобулин

Бета-2-микроглобулин е нискомолекулярен протеин, чиято серумна концентрация варира в зависимост от стадия на заболяването. Определянето на $\beta_2\text{M}$ с помощта на имунорадиометричен кит е базирано на конкурентна реакция между маркирано моноклонално антитяло в течна фаза и бета-2 поликлонално антитяло, фиксирано върху стената на епруветката. Небелязаното антитяло, фиксирано върху повърхността на епруветката се свързва с подлежащия на количествено определяне антиген. Прибавеното в излишък антитяло реагира със свързания антиген и се оказва свързан двустранно с антителата. Концентрацията на $\beta_2\text{M}$ е пропорционална на радиоактивността, отчетена в епруветката. Стойностите на $\beta_2\text{M}$ са индикатор на активност на заболяването. Проследяването на $\beta_2\text{M}$ в динамика – в началото, при поставяне на диагнозата и след преклчване на лечението е особена клинична стойност. Нормални стойности на $\beta_2\text{M}$ в серум – от 1,0 до 2,4 mg/L (8,38,39).

Заклучение

Въз основа на данните, представени от проведени скитниграфски изследвания от нас и други автори, могат да се направят следните изводи:

1. Скитниграфските методи са високоспецифични, неинвазивни, технически лесно осъществими, намиращи широко приложение в диагностиката на пациенти с MM.
2. Предимство на скитниграфските изследвания като функционални тестове в сравнение

с морфологичните образни методи е възможността за определяне активността на миеломния процес - визуализиране на костномозъчната инфилтрация от миеломни клетки в началото на заболяването и деструкция на костите при напредване на малигнения процес.

3. Съчетанието на сцинтиграфско с компютъртомографско изследване при SPECT/CT и PET/CT дава възможност за точна анатомична локализация на метаболитно променената тъкан и количествена оценка на активността на процеса.
4. Възможност за целотелесно скениране, което е в полза на екзактното стадиране и прецизиране на терапията при мултиплен миелом.
5. Посттерапевтичните сцинтиграфски изследвания дават възможност за мониторинг на проведеното лечение, ранно откриване на рецидив и диференциална диагноза на активна от съединителна тъкан с оглед оценка ефекта от проведената терапия.
6. Сцинтиграфските данни показват добра корелация със стойностите на бета-2-микроглобулин в серума, което повишава диагностичната точност при интерпретацията на получените образи.
7. Възможност за прецизно планиране на лъчетерапия в зависимост от локализацията и размера на патологичните огнища

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Durie BGM, Waxman A, Jochelson M et al. Technetium-99m-MIBI scanning in multiple myeloma. Proc Am Soc Clin Oncol, 1994, 13, 411-412.
2. Adams BK, Fataar A, Nizami MA. Technetium-99m-MIBI uptake in myeloma. J. Nucl. Med, 1996, 37, 1001-1002.
3. Tirovola EB, Biassoni L, Britton KE et al. The use of Technetium-99m-MIBI scanning in multiple myeloma. Br J Cancer, 1996, 74, 1815-1820.
4. Wakasugi S, Noguti A, Katuda T et al. Potential of 99mTc-MIBI for detecting bone marrow metastases. J Nucl Med, 2002, 43, 596-602.
5. Shirley S, Abildgaard N, Thige J et al. Guidelines for the use of imaging in the management of myeloma.- Brit J Haem, 2007, 137, 49-63.
6. Alexandrakis MG, Kyriakou DS, Passam F et al. Value of Tc-99m sestamibi scintigraphy in the detection of bone lesions in multiple myeloma: comparison with Tc-99m methylene diphosphonate. Ann Hematol, 2001, 80, 349-353.
7. Fonti R, Del Vecchio S, Zannetti A et al. Bone marrow uptake of 99mTcMIBI in patients with multiple myeloma. Eur J Nucl Med, 2001, 28, 214-220.
8. Koutsikos J, Grigoraki V, Athanasoulis T et al. Scintigraphy with technetium-99 methoxysobutylisonitrile in multiple myeloma patients; correlation with the International Staging System. Hell J Nucl Med, 2006, 4, 177-180.
9. Ak I, Gulbas Z. Nuclear Medicine Application in Hemato-Oncology. T J Hem, 2003, 20, 4, 189-211.
10. Pace L, Catalano L, Del Vecchio S et al. Predictive value of Technetium-99m-MIBI in patients with multiple myeloma and potential role in the follow-up. Eur J Nucl Med, 2001, 28, 3, 304-312.
11. Nadurkar D, Kallf V, Turlakow A. Focal MIBI uptake is a better indicator of active myeloma than diffuse uptake. Eur J Haem, 2006, 76, 141-144.
12. Bacovsky J, Myslivecek M, Scudla V et al. Tc-99m MIBI scintigraphy in multiple myeloma: prognostic value of different Tc- 99m MIBI uptake patterns. Clin Nucl Med, 2010, 35, 667-670.
13. Balleari E, Villa G, Garre S et al. Technetium-99m-sesta-mibi scintigraphy in multiple myeloma and related gammopathies: a useful tool for the identification and follow-up of myeloma bone disease. Haematologica, 2001, 86, 78-84.
14. Giovanella L, Tadorelli M, Ceriani L et al. 99m Tc sestamibi imaging and bone marrow karyotyping in the assessment of multiple myeloma and MGUS. Nucl Med Commun, 2008, 29, 6, 535-541.
15. Saber R. Technetium-99m Sestamibi in multiple myeloma. J Eg Nat Cancer Inst, 2002, 14, 87-93.
16. Villa G, Balleari, Carletto M et al. Staging and therapy monitoring of Multiple Myeloma by 99m Tc-Sestamibi Scintigraphy: a five year single center experience. J Exp Clin Cancer Res, 2005, 24, 3, 355-361.
17. Svaldi M, Tappa C, Gebert U et al. Technetium-99m-sesta-mibi scintigraphy: an alternative approach for diagnosis and follow-up of active myeloma lesions after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. Ann Hematol, 2001, 80, 393-397.
18. Pace L, Salvatore S, Vecchio. Use of 99m Tc- Scintigraphy in Sestamibi in multiple myeloma. J Nucl Med, 2006, 47, 555-556.
19. Athanasoulis T, Koutsikos J, Mouloupoulos L et al. Reverse of the differential uptake intensity of 99mTcMIBI and Tc-99m V-DMSA by multiple myeloma lesions in response to therapy. Clin Nucl Med, 2003, 28, 8, 631-635.
20. Kaminaga T, Takada K, Kutomi K et al. Accumulation of Tc-99m Tetrofosmin in Multiple Myeloma. Clin Nucl Med, 2002, 27, 4, 305-306.
21. Alper E, Gurel M, Evrensel T et al. 99mTcMIBI scintigraphy in untreated stage III multiple myeloma: comparison with X-ray skeletal survey and bone scintigraphy. Nucl Med Commun, 2003, 24, 5, 537-542.
22. Ludwig H, Kumpan W, Sinziger H. Radiography and bone scintigraphy in multiple myeloma: a comparative analysis. Br J Rad, 1982, 55, 173-181.
23. Wolfenden J, Pitt M, Durie B et al. Comparison of bone scintigraphy and radiology in multiple myeloma. Radiology, 1980, 134, 3, 723-728.
24. Василева Д, Цоневска А. Приложение на сцинтиграфията с 99m Tc MIBI и бета-2-микроглобулин при мул-

- типлен миелом. Рентгенология и радиология, 2012, 51, 4,307-310.
25. Василева Д , Цоневска А. Туморотропна сцинтиграфия с 99m Tc MIBI, костна сцинтиграфия и серумен бета-2-микроглобулин при диагностика и терапевтичен контрол на мултиплен миелом. Рентгенология и радиология, 2013, 52,3,223-228.
 26. Beyer T, Lutz S, Freudenberg D. et al. The future of hybrid imaging—part 1: hybrid imaging technologies and SPECT/CT. Insights Imaging 2011,2,161–169.
 27. Schafers K.P., Stegger L. Combined imaging of molecular function and morphology with PET-CT and SPECT-CT: Image and motion correction. Basic Res Cardiol 2008,103,191-199.
 28. Nunez R., Erwin W.D., Wendt R.E., et al. Acquisition Parameters for Oncologic Imaging with a New SPECT/Multislice CT Scanner. Mol Imaging Biol ,2010,12, 110-138.
 29. Schillaci O., Danieli R., Manni C. et al. Is SPECT-CT with hybrid camera useful to improve scintigraphic imaging interpretation? Nucl Med Commun, 2004,25,705-710.
 30. Nanni C. Zamagni E, Farsad M et al. Role of 18FDG PET/CT in the assessment of bone involvement in newly diagnosed multiple myeloma: preliminary results. . Eur J Nucl Med,2006,33,5, 525-532.
 31. Kato T, Tsukamoto E, Nischioka T et al. Early detection of bone marrow involvement in extramedullary plasmacytoma by whole-body 18FDG PET/CT. Clin Nucl Med, 2000, 25, 870-873.
 32. Schirrmeister H. et al. Initial results in the assessment of multiple myeloma using 18F-FDG PET. Eur J Nucl Med.q 29,2002,3,361366.
 33. Bredella M, Steinbach L, Caputo G et al. Value of FDG PET in the Assessment of patients with Multiple Myeloma. AJR, 2005,184, 1199-1204.
 34. Myslivecek M, Bacovsky J, Scudla V et al. 18-FDG PET/CT and 99mTc MIBI in evaluation of patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of unknown significance: comparison of methods. Klin Onkol, 2010,23,5,325-331.
 35. Hasnedar R, Sahika Z, Akdemir O. et al. Value of 18FDG uptake in positron emission tomography/computed tomography in predicting survival in multiple myeloma. Eur J Nucl Med, 2011,38,1046-1053.
 36. Cascini G, Cuccurullo V, Tamburrini O et al. Nuclear medicine in multiple myeloma – more than diagnosis. Nucl Med Rev Cent East Eur, 2010,13,32-38.
 37. Durie G, Waxman a, Agnola a et al. Whole-body 18FDG PET identifies high risk myeloma. J.Nucl Med , 2002,43,1457-1463.
 38. Martin M ,Colds M, Sahun M, Olave P, Razola P, Banzo J. Baseline Tc99-MIBI scanning predicts survival in multiple myeloma and helps to differentiate this disease from monoclonal gammopathy of unknown significance. Haematologica, 2005,90,1141-1143.
 39. Горанова-Маринова В, Георгиев П, Сотирова К, Спасов Е, Христова И, Димитрова М, Сапунарова К , Гръкланова В, Бабачева В, Горанов Ст. Сравнителен анализ на стадийните системи на Durie&Salmon и международната стадийна система (ISS) пациенти с мултиплен миелом. Клин. трансф. хематология, 2011,XLVII,33-37.

Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р Д. Василева, дм
Лаборатория „Нуклеарно-медицинска диагностика“,
Специализирана болница за активно лечение на
хематологични заболявания
ул. Пловдивско поле №6
1756 София
Служ. тел. 02/9701 102
GSM – 0879 104 904
e-mail: vassileva@excite.com

ГЕНОМЕН ПРОФИЛ НА МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ – СЪВРЕМЕНЕН ДИАГНОСТИЧЕН ПОДХОД

*T. Boneva*¹, *D. Brazma*², *Ю. Райнов*³, *Е. Хаджиев*⁴, *К. Ганчева*², *J. Howard-Reeves*²,
*C. Grace*², *Л. Митев*¹, *Е. Начева*²

¹Цитогенетична лаборатория, Военномедицинска Академия, София

²Molecular cytogenetic laboratory, UCL Medical School, Royal Free Campus, London

³Клиника по хематология, Военномедицинска Академия, София

⁴Клиника по хематология, УМБАЛ "Александровска", София

GENOME PROFILING OF MULTIPLE MYELOMA – UPDATE OF ROUTINE DIAGNOSTIC APPROACH

*T. Boneva*¹, *D. Brazma*², *J. Raynov*³, *E. Hadjiev*⁴, *K. Gancheva*², *J. Howard-Reeves*²,
*C. Grace*², *L. Mitev*¹, *E. Nacheva*²

¹Cytogenetics laboratory, Military Medical Academy, Sofia

²Molecular cytogenetic laboratory, UCL Medical School, Royal Free Campus, London

³Clinic of Haematology and oncology, Military Medical Academy, Sofia

⁴Clinic of Haematology, UMHAT "Alexandrovska", Department of Internal medicine, Sofia

Резюме. През последните години се натрупаха достатъчно данни, които показват, че патогенезата и клиничното протичане на мултиплиения миелом (ММ) са свързани с отделни генетични нарушения. Заболяването се характеризира с комплексни генетични нарушения, които по същество отразяват не само патогенезата на заболяването, но и определят прогностичната хетерогенност на установените аберации. В това проучване ние представяме 23 пациенти с ММ разпределени в три групи, според приложения диагностичен алгоритъм. Използвани са техниките: конвенционален цитогенетичен метод, изолиране на CD138+ клетки, FISH и aCGH. Целта е да сравним предимствата и недостатъците на всяка от тях при установяване на хромозомни аберации с клинично и терапевтично значение. Дискутираме необходимостта от едновременно им прилагане за получаване на максимална информация, необходима за изграждането на индивидуален молекулярен профил на всеки пациент.

Ключови думи: мултиплен миелом, хромозомни аберации, геномен профил

Summary. Multiple myeloma (MM) is characterised by neoplastic transformation of mature B cells in the bone marrow. It is heterogeneous disease at both clinical and genetic level. Recent advances in molecular genetics and genomic studies have demonstrated that the disease evolution is associated with specific genetic aberrations, which not only shed light on the pathogenesis of MM but allows risk assessment and treatment monitoring. Here we present a study of 23 patients investigated by conventional karyotyping, FISH and whole genome screening aiming to devise a diagnostic algorithm to offer a comprehensive genomic profiling of MM.

Key words: multiple myeloma, chromosome aberrations, genome profiling

Въведение

Мултиплиеният миелом (ММ) е инвалидизираща малигнена хемопатия и е част от спектъра

заболявания, вариращи от моноклонална гамопатия с неизвестен произход (MGUS) до плазмоклетъчна левкемия. Той е втората най-често срещана малигнена хемопатия след

хроничната лимфоцитна левкемия в бялата раса и се характеризира с клонално разрастване на терминално диференцирани В-клетки в костния мозък, които секретират моноклонален имуноглобулин. При това заболяване се наблюдават различни комплексни генетични нарушения, които по същество отразяват не само патогенезата на заболяването, но и прогностичната им хетерогенност.

Налице са достатъчно доказателства за повече от два или по-малко взаимноизключващи се онкогенни пътища в динамичния ход на клоналните плазмноклетъчни неоплазии. В приблизително половината от тях се доказва нехипердиплоиден кариотип (НХДК) с хромозомен брой под 48 и/или над 75, свързан с транслокации засягащи гена на тежките имуноглобулинови вериги (IgH) в 14q32 [5]. Описани са 5 типа 14q32 преобразувания, при които IgH участва в транслокации с един от следните генни партньори: циклин D1(11q13), FGFR3/MMSET (4p16.3), c-MAF (16q23), циклин D3 (6p21) и MAF-B (20q11). В тази група парциалната делеция или монозомия на хромозома №13 са честа находка, наблюдавана в около 85% от случаите. Делециите са предимно интерстициални, като минималният критичен район, който се делетира е лентата 13q14. Останалата половина от случаите с миелом имат хипердиплоиден кариотип (ХДК) с хромозомен брой 48-75, който включва основно тризомии на хромозоми № 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и 21 или порядко структурни аномалии [7, 9].

За разлика от някои други малигнени хемопати, като острите левкемии, установяването на хромозомни аберации при миелома чрез използването на конвенционалния цитогенетичен метод (GTG-оцветяване) е силно ограничено, поради ниската митотична активност на туморните клетки. Кариотипният анализ е успешен в около 30-40% от случаите [6]. С въвеждането на съвременни молекулярно-цитогенетичните техники, като флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) и сравнителния геномен анализ (CGH) се установяват значително по-висок процент цитогенетични аберации, отколкото с конвенционална цитогенетика, което е важна предпоставка в разкриване биологията на заболяването и прогнозиране на неговия клиничен ход.

В нашето проучване представяме установените генетичните промени в три групи пациенти с новооткрит множествен миелом, изследвани с различен алгоритъм от техники за установяване на специфични хромозомни нарушения и обсъждаме техните предимства и недостатъци с цел изграждане на индивидуализиран диагностичен профил.

Материал и методи

Пациенти

Изследвани са общо 23 пациенти, 13 мъже и 10 жени, на средна възраст 60 (от 42 до 85) год. с новооткрит мултиплен миелом, разделени в 3 групи. Диагнозата е поставена съгласно утвърдения диагностичен алгоритъм: наличие на М-протеин в серум или урина, присъствие на плазмноклетъчна пролиферация в костния мозък (КМ) > 10% и наличие на данни за органно и тъканно увреждане (хиперкалциемия, анемия, кости лезии, бъбречна недостатъчност - CRAB). При първата група от 10 болни анализа е проведен на препарати след 24 ч. нестимулирана КМ култивация, при втората група от трима болни върху препарати направени по директен метод при висока (>60%) КМ плазмоцитна инфилтрация и при третата група от 10 пациенти, при които анализа е извършен на изолирани от КМ CD138+ плазмоцити.

Методи

2. 1. Конвенционален цитогенетичен анализ.

Хромозомните изследвания на костен мозък са изработени по два метода: след 24 ч. „*in vitro*” култивиране на костен мозък и по директния костномозъчен метод. Цитогенетичните препарати са оцветени по протокола на G-лентовата техника. Отчитането на морфологията на хромозомите и тяхната G-лентова характеристика е в съответствие с международната цитогенетична номенклатура - ICSN (2009).

- *Изолране на CD 138+ клетки от костен мозък:* CD138+ плазмоцити са изолирани чрез магнитно белязване с помощта на MACs клетъчен сепаратор (Miltenyl Biotec) [4].

2.2. Флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH).

При първата и втората група FISH анализа е проведен на интерфазни ядра на препарати от костен мозък, а при третата група - на препарати от изолирани плазмоцити по повърхностния антиген CD 138 (MACS separation of CD 138+ cells). Използвани са локус-специфични ДНК сонди за следните райони: 13q14/13qter, p53/SE17 и 14q32 сплит проба. При позитивизиране на последната съответните случаи са тествани с двучетни двойно-фузионни проби за присъствие на BCL1/IgH t(11;14), FGFR3/IgH t(4;14) и MAF/IgH t(14;16).

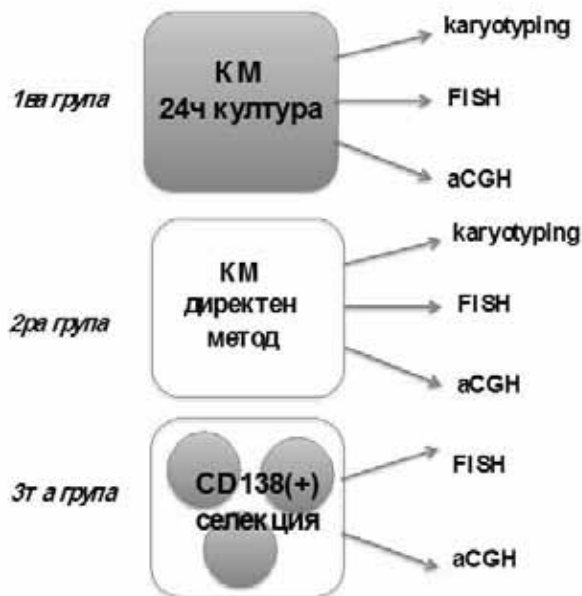
- *Сравнителна геномна хибридизация (aCGH) върху олиго- ДНК - микрочипове.*

Изолрирането на тотална геномна ДНК при първата и втората група е от клетъчна утайка, а при третата група - от CD 138+ плазмоцити. Използвани са олигонуклеотидни микрочипове, формат 8x60K (Agilent, USA). При този формат са включени 60,000 локуса от целият геном с висока плътност на богати на гени региони, с акцент на

известни онкогени. Микрочиповете са скенирани на двуканален лазерен скенер, а данните са обработени с програмата Agilent's Genomic Workbench Lite Edition 6.0. Получените резултати са графично представени със геномни адреси съобразно HG 19 [8].

Резултати

В различните анализирани групи са използвани следните диагностични алгоритми, представени на схемата.



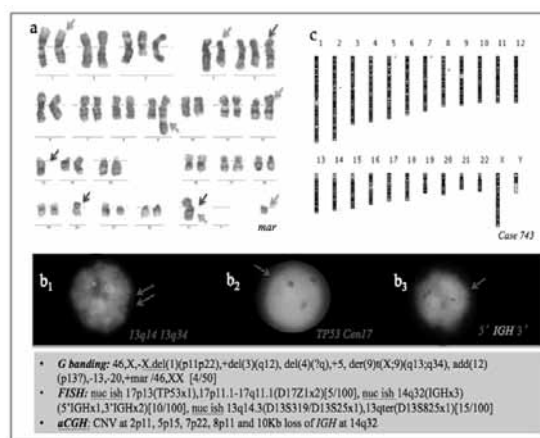
При първата група от 10 пациенти е използван конвенционален цитогенетичен анализ на 24-часова КМ култура, FISH и aCGH скениране.

При втората група от трима болни е извършен конвенционален цитогенетичен анализ на директни препарати (без *in vitro* култивация), FISH и aCGH сканиране.

При третата група е използвано изолиране на CD 138+ плазмоцити от КМ за FISH анализ и ДНК за aCGH сканиране.

Обобщените резултати от анализирания първа група пациенти са представени на Таблица №1.

Лентовият хромозомен анализ установи кариотипни промени при 6/10 пациента, останалите 4 показаха нормален кариотип (№ 3,4,7 и 10). При един случай се намери ХДК (№8), останалите 5 – НХДК (2, 5, 6 и 9) с голяма вариабилност на хромозомните промени, които включват, както бройни така и структурни аберации (Фиг.1).



Фигура 1. Обобщени резултати от кариотипен анализ, FISH анализ и aCGH на пациент № 9 от първа група. Стрелките сочат установените геномни промени (структурни и бройни).

Таблица 1

№.	Случай	КМ % плазмощити	Кариотип	FISH nuc. ish	aCGH 60K array Agilent
1	1491 (762)	15%	46,XX,16q+2/46,XX[10]	13q14 / q34x1 (8%), IGHx2 / MAFx3 (10%), TP53 / cep 17x1 (10%)	1 CNV
2	1542 (764)	20%	35-45,X,-Y,-2,-7,-16,-17,-19,-20,-22[cp12]/46,XY[5]	TP53 / cep 17x1 (5%)	1 CNV
3	1428 (751)	18%	46,XY[20]	(FGFR3/IGH)x3(FGFR3 con IGHx2)(12%)	2CNV; Loss Y
4	1385 (748)	40%	46,XY[15]	(MAF/IGH)x3(MAF con IGHx2) (14%)	Gains 7p22 (2Mb), 8q24(4Mb), 11p15(2.2Mb), 16p13(6Mb)
5	1499 (763)	30%	52,XX,+5,+11,+14,+15,+2mar[cp2]/46,XX[15]	14q32(IGHx3) (20%)	1 CNV
6	1488 (761)	15%	44-46,XY,+2,12p,-14[3]/46,XY[6]	13q14 / q34 x3 (10%)	1 CNV
7	1391 (749)	40%	46,XY[15]	14q32 (IGHx2)(5'IGHx2 dim x1) (15%)	Gains Xq27-q28(12Mb)
8	1546 (742)	30%	77-81,XX,+X,+1,-del(1)(p32),+3,+3,+4,+4,+5,+5,+6,+7,+7,+8,+8,+9,+9,+10,+10,+11,+11,+12,+12,+13,+14,+14,+15,+15,+16,+17,+18,+18,+19,+19,+20,+20,+21,+21,+22[cp4]/46,XX[11]	(TP53 x1,cep17 x2) (5%)	5 CNV
9	1262 (743)	20%	46,X,-X,-del(1)(p13p22),+3,+5,der(9)t(X;9)(q13q34), add(12)(p137),-13[4]/46,XX[46]	14q32 (IGHx2)(5'IGHx2 dim x1) (10%); (TP53 x1,cep17x2) (5%)	4 CNV
10	1575 (941)	19%	46,XX[15]	IGH x2 / MAF x3 (25%)	1 CNV

CNV – вариабилни бройни изменения които са признати за полиморфни маркери; gain- допълнителни копия; loss- загуба на генетичен материал

Анализът с FISH сонди за геномни преобразувания на локусите на IGH, TP53, 13q14 (RB), MAF, FGFR3 показва аномалии при 90% от случаите. От тях най-честата структурна аномалия е свързана с локуса на тежките имуноглобулинови вериги на хромозома №14 (14q32) (4/10 случая), а най-честата бройна аномалия е монозомия на хромозома № 13 и 17 - по 2 случая (Фиг. 1 b1- b3). Резултатите от геномно сканиране (aCGH) на ДНК изолирана от фиксирана клетъчна суспензия на 24 ч. КМ култури показаха: а) при 6/10 случая се установиха геномни аберации, които засягат

малки по размер секвенции (до 1 килобази) и които са документирани полиморфни маркери в генома на нормални индивиди (т.н. вариабилни бройни изменения или copy number variations, CNV); б) при други трима - установените геномни аберации са от типа екстра секвенции (№ 4 и № 7), с изключение на случай № 3, при който се установи загуба на Y хромозомата.

Обобщени резултати от анализираната втора група пациенти са представени на **Таблица №2**.

Таблица 2

No.	Случаи	КМ % плазм. цити	Картири	FISH <i>loci</i>	aCGH 60K array Agilent
1	1511 (741/757)	80%	44-46,XX,-X,-2,+4,+5,-10,-14,-17,del(20)(q11;q13),del(21)(q22),+22[cp13]/47-50,X,-X,+del(1)(p22.1;p32.3),+2,+4,+5,-6,+11,+12,+13,rob(13;21)(q11;q11),-14,-15,+15,-16,-17,dup(17)(q11q21),+19,+20,+21,-21,+22,+mar[cp17]	13q14/q34 x1 (17%) TP53/cep17 x1 (10%) 1q21s2/1q36 x1 (47%)	TGA=68 Gains: 1q, 2, 5, 7q, 9q, 15, 17q, 19, 22q Losses: Xp/q24, 1p22/p32, 13, 16q
2	1557 (940)	60%	59-60,XY,-X,-Y,-2,+3,+5,+del(6)(q15q23),+der(7)t(1;7)(q12;q32),+8,+9,+11,+15,+15,+16,+17,-18,+19,+19,+21,+mar[cp8]	1q21s3/1p36x2 (7%) IGHs2/MAFs3 (35%)	TGA=50 Gains: Xq27/q28, 7p/q31, 15 and 19; Losses: Xp/q27, 1p, 4, 6q16/q27, 8, 10, 12p13.31 (12Mb), 12q, 13, 14, 16, 17, 20, 22q
3	1583 (943)	70%	48,XY,del(1)(p13p32.3),+7[cp2]/48-49,XY,del(1)(p13p32.3),+del(1)(p22.3),+7,+9,+19,+21[cp9]	13q14/q34 x1 (30%) 1q21s2/1q36x1 (23%)	TGA=18 Gains: Xq 25/q28, 1q, 7, 15, 17q, 19, 21q Losses: 1p12/p33, 13, 16q, 17p13/p12 (6Mb)

TGA – общ брой на геномни аберации, включващи полиморфни и MM специфични изменения, които засягат геномни райони с размер над 5Mb.

Тази група е малка и се състои от 3 пациенти с висок (>60%) процент на КМ плазмочитна инфилтрация. Те са включени в настоящето проучване по две причини: първо, като контрола на анализа на CD138(+) селекция и второ - за да оцени приложението на aCGH като самостоятелен диагностичен подход. Комплексни хромозомни изменения се установиха и при трите случаи и включваха бройни и структурни аберации. FISH доказва делеция на 13q (случаи 1 и 3), TP53 в много нисък процент и също 1p/1q изменения. Важно

е да се подчертае, че aCGH метода потвърди аберациите, които са над 17%, но доказва и нови изменения, неоткрити от хромозомния и FISH анализи, илюстрирано при пациент № 2. В този случай се установи маркер, свързан с лоша прогноза на заболяването, а именно делеция на късото рамо на хромозома № 12 [1, 2].

Обобщени резултати от анализираната трета група пациенти са представени на **Таблица № 3**.

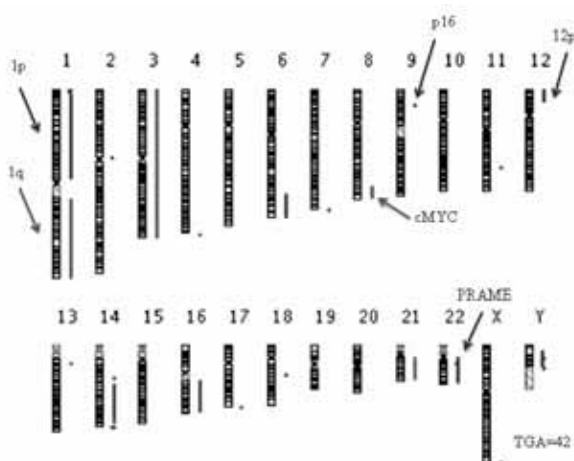
Таблица 3

No.	Случаи	КМ % плазм. цити	ДНК източник	FISH <i>loci</i>	aCGH 60K array Agilent
1	672	12%	CD 138(+)	13q14/q34x1 (98%); 14q32(IGH@2) (5'IGH@ dim x1)(50%)	TGA=66 Gains X, 1q & Losses 13, 1p, 16q
2	708	12%	CD 138(+)	14q32(IGH@2)(5'IGH@ dim x1 (98%); TP53x1/cep17 x2 (90%)	TGA=40 Gains 3, 5, 7, 9, 11, 15 & Losses 1p, 10q, 14q, p53, 20q
3	711	40%	CD 138(+)	13q14/q34 x1 (98%)	TGA=44 Gains 1q, 3, 6q, 7, 8q24, 9, 15, 18, 21 Losses X, 13, 16q, 20p
4	712	15%	CD 138(+)	13q14/q34 x1 (86%); 14q32(IGH@x2) (5'IGH@ sep 3'IGH@x1)(75%)	TGA=8 Losses 1p, 2p, 13, 14q22/q32, 22
5	716	40%	CD 138(+)	13q14/q34x1 (90%); 14q32(IGH@2) (5'IGH@ dim x1)(86%)	TGA=6 Loss 13
6	715	22%	CD 138(+)	13q14/q34x1 (60%)	TGA=25 Gains 5, 6p, 7q, 9, 10, 15, 18, 19 Losses X, 6q25/q27, 13
7	720	15%	CD 138(+)	14q32(IGH@2)(5'IGH@ dim x1) (96%)	TGA=42 Gains 1q, 3, 21 Losses Y, 1p, 6q, 12p, 14q, 16q, 22
8	721	16%	CD 138(+)	13q14/q34x1 (97%); 14q32(IGH@2) (5'IGH@ dim x1)(93%)	TGA=31 Gains 1q, 9, 15 Losses X, 6q, 13, 14, 16q, 22q11
9	726	13%	CD 138(+)	13q14/q34x1 (70%); 14q32(IGH@2) (5'IGH@ dim x1) (50%)	TGA=19 Gains 1q, 5, 7, 9, 15, 19 Losses 1p, 13, 16q
10	884	23%	CD 138(+)	NA*	TGA=24 Gains 5, 7, 19 Losses 8p, 14q22, 22

TGA – общ брой на геномни аберации, включващи полиморфни и MM специфични изменения
NA* – FISH анализ не е проведен поради липса на клетъчен материал след изолване на CD138(+) плазмочити

Изолиране на CD138(+) плазмоцити от КМ пунктат чрез MACs протокола е с висока успеваемост. Фиксирани клетъчните изолати, рутинно анализирани с FISH сонди за локусите IGH, TP53, 13q14 (RB) показаха наличие на аберации при всички проби (9/9). Докато преобразуване на IGH локуса се оказа повсеместна находка, делеция на 13q14 (RB) се намери при 7/9 пациента. При случаи № 5, FISH установи t(4;14), докато сондата IGH/MAF показва присъствие на допълнителен MAF сигнал, най-вероятно индикиращ екстра 16q. Загуба на TP53 се установи само при пациент №2. Информация за геномни аберации от aCGH се получи при всички проби (100%). Най-честата находка се оказа монозомията на хромозома № 13(70%), следвана от установените тризомии на хромозоми № 7, 9, 15 (50%). Доказа се и частична хромозомна загуба (делеция) на късото рамо на хромозома №1 (1p), дългото рамо на № 6 (6q), цялото или част от дългото рамо на №14 (14q), дългото рамо на № 16 (16q) и допълнително копие на дългото рамо на № 1 (1q).

Резултатите от FISH и aCGH анализа са еднопосочни при всички анализирани случаи. Нещо повече, при всички aCGH изследването идентифицира генетични промени, които се очаква да бъдат пропуснати от FISH анализа. При пациент № 5 aCGH потвърди загубата на хромозома 13 и не достави друга информация за допълнителни геномни промени, докато при всички останали проби, aCGH осигури данни за неслучайни допълнителни геномни аберации. Така загубата на дългото рамо на хромозома 16 се наблюдава при 6/10 проби, загуба на част от дългото рамо на хромозома 6 и също загуба на част или цялата хромозома 22 – при 4/10.



Фигура 2. Молекулярен кариотип на пациент № 7 от трета група (Workbench 5.0, Agilent). Червена линия от дясно на всяка хромозомна диаграма показва адреса на допълнителен геномен материал, докато зелената – показва геномните

загуби. Стрелките сочат някои аберации, засягащи известни онкогени или прогностични маркери за ММ. TGA- общ брой геномни аберации.

Добре известно е, че нормалните плазматични клетки (PLs) в КМ имат следната фенотипна характеристика: CD 38+, CD 138+, CD 19+, CD 45+, CD 56-. Туморните PLs са CD 38+, CD 138+, в 90% CD 19-, в 99% CD 45- и в 70% от случаите са CD 56+ [7]. Повърхностния антиген, който се експресира и при двете популации PLs – CD 138+ - се използва широко в практиката за маркиране и отделяне на плазмоцитите. Това значително повишава информативността на такива техники, като FISH и aCGH при ММ.

Докато при първа група FISH метода установи клонални аберации в 5 до 20% от КМ клетки, при третата група минимум 50% и по-често > 90% от CD 138+ плазмоцитите показаха генетични промени с клинична значимост - *Таблица № 3*.

Резултатите от втората група пациенти от нашето проучване показват, че aCGH не само потвърждава данните от FISH анализа, но и дава обща оценка на бройните аберации (загуба и/или амплификация) за целия геном. При това тази оценка на ДНК секвенциите се осъществява без да е необходимо да се изследват дялящи се плазмоцити. В това отношение изследванията на пациент № 7 са особено показателни - докато FISH намира частична IGH загуба, aCGH установява общо 42 геномни аберации, включително загуба на късото рамо на хромозома 12, с доказана роля на лош прогностичен маркер [1].

Прилагането на aCGH се обезмисля в случаите с ниска плазмоцитна инфилтрация и липсата на обогатен плазмоцитен субстрат. Това отлично се илюстрира от резултатите при първа група пациенти (*Таблица №1*). За разлика от нея, при втората група пациенти сравнителната геномна хибридизация предостави максимална информация за клинично-значимите хромозомни промени, което се обяснява с високия процент плазмоцитна инфилтрация в КМ (*Таблица № 2*).

Обсъждане

Наличието или липсата на хромозомни и/или молекулярно-цитогенетични аномалии предсказва отговора към избрания терапевтичен режим, продължителността на ремисията и общата преживяемост на пациентите с ММ [10]. Информацията, получена от конвенционален цитогенетичен анализ, е често лимитирана поради ниската пролиферативна активност на плазматичните клетки и е успешна само в 30-40% от случаите. Този метод е по-информативен при пациенти с висока плазмоцитна инфилтрация, което съответства на прогресия на заболяването.

В останалите случаи не се получават метафазни пластинки годни за анализ или се срещат нормални такива, получени от нетуморната популация (миелоидна например). Въпреки това този анализ има и своите предимства, като проследяване на клоналността, възникване и развитие на различни субклонове. Това несъмнено допълва познанията ни за разбиране природата на това заболяване. Методиката FISH и геномния анализ чрез aCGH значително увеличават възможността за отчитане на бройни и структурни хромозомни аномалии, като се предполага, че почти всеки пациент с MM има генетични промени [11]. Данните от научната литература сочат, че около 40% от новодиагностицираните болни имат нормален кариотип, установен с методите на конвенционалната цитогенетика или FISH, докато геномните промени са намерени в около 70% от тези пациентите, използвайки aCGH метода [3]. Предимствата на FISH метода са много: висока специфичност и чувствителност, отчитане на бройни и структурни хромозомни аберации в интерфазни ядра, доказване на малки субмикроскопски делеции, амплификации и др. Основни недостатъци – изисква предварителна информация за предполагаемите хромозомни аномалии и техните специфични локуси, методът не позволява цялостно геномно сканиране и доставя селектирана информация. От проведеното проучване се вижда, че FISH анализа предоставя очакваната информация за всички изследвани локуси и при двете групи пациенти (100%).

Въпреки, че позволява скрининг на целият геном, aCGH има и някои методични лимитации. Геномни промени, които не са съпроводени от загуба и/или амплификации остават неидентифицирани – т.е. балансиран хромозомни транслокации и инверсии не могат да бъдат установени. Освен това, прагът на чувствителност при aCGH е в границите на 15-20%.

Изводи

Анализът на получените от нас резултати потвърждава факта, че aCGH е високо-информативен директен метод за установяване на бройни геномни аберации с клинична значимост при MM. Той осигурява в рамките на един тест данни за множествени геномни локуси някои рутинно анализирани с поредица от FISH изследвания (икономически изгоден, пести време, консумативи и високоспециализиран труд). Предимствата и ограниченията на всеки от приложените методи подчертават необходимостта от едновременното им прилагане като изследователски подход. Дори при ниска плазмоклетъчна инфилтрация е възможно

получаването на достатъчна информация за генетичният статус на пациента, следвайки алгоритъма на третата група, а именно: CD 138+ сепариране, отделяне на материал за FISH и екстрахиране на ДНК за aCGH.

Заклучение

Патогенезата и клиничното протичане на мултиплиен миелом (MM) са свързани с отделни генетични нарушения. Тази малигнена хемопатия се характеризира с комплексни генетични нарушения, които по същество отразяват не само патогенезата на заболяването, но и определят прогностичната хетерогенност на установените аберации. Те помагат на клиничистите хематолози още в началото на болестта да оценят риска и стратифицират пациентите в отделни рискови групи, предопределящи терапевтичното поведение и проследяване. Използваните техники за генетичен анализ при миелома включват конвенционалния цитогенетичен метод, изолиране на CD138+ клетки, FISH и aCGH. Необходимо е точна преценка и правилен избор за тяхното използване, с оглед получаване на максимално прецизна информация, необходима за изграждане на индивидуален молекулярен профил на всеки пациент. В този смисъл aCGH може да бъде първо средство на избор за рутинна диагностика на множествения миелом.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, et al. Prognostic significance of copy-number alteration in multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27:4585-4590.
2. Avet-Loiseau H, Soulier J, Fermand J-P, Yakoub-Agha I, Attal M, et al. Impact of high-risk cytogenetics and prior therapy on outcomes in patients with advanced relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone. *Leukaemia*, 2010, 24(3), 623-628.
3. Dewald G, Therneau T, Larson D, et al. Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma. *Blood*, 2005, 106:3553-3558.
4. <https://milenyibiotec.com>
5. Kuehl WM, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(10):3456-3463
6. Liebis P, Hartmut D. Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *European Journal of Cancer*, 2006, 42:1520-1529.
7. Morgan GJ, Walker DA, Faith E Davies FD. The genetics architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12, 335
8. Nacheva E.P., Brazma D., Virgili A., Howard-Reeves J.,

Chanalaris A., Gancheva K., et al. Deletion of immunoglobulin heavy and T cell receptor gene regions are uniquely associated with lymphoid blast transformation of chronic myeloid leukemia. BMC Genomics, 2010, 1(4), 1471-2164.

9. 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.
10. Terpos E, Eleutherakis-Papaiaikovou V, Meletios-Athanasios D. Clinical implications of chromosomal abnormalities in multiple myeloma. Leukemia & Lymphoma, 2006, 47(5):803-814.
11. Zandecki M, Lai Jean-Luc, Facon T. Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. Br J Haematol, 1996, 94:217-227.

Адрес за кореспонденция

Д-р Теменужка Бонева,
Цитогенетична лаборатория, Катедра по
Клинична лаборатория и имунология, ВМА;
бул."Георги Софийски"3, 1606 София;
e-mail: dr_t.boneva@abv.bg

ВЛИЯНИЕ НА РАННИТЕ ХЕМОТРАНСФУЗИИ ВЪРХУ ПОКАЗАТЕЛИТЕ НА ЖЕЛЯЗНАТА ОБМЯНА ПРИ НЕДОНОСЕНИ ДЕЦА

В. Атанасова¹, Хр. Мумджиев², В. Негкова³, М. Кръстева⁴, Е. Христова⁵

¹АГ Клиника, Отделение по неонатология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД, Плевен;

²Клиника по неонатология, МБАЛ „Проф. Ст. Киркович“ АД, Ст. Загора;

³Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД, Плевен;

⁴АГ Клиника, Неонатологично отделение, УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, Пловдив;

⁵Факултет по обществено здраве, МУ-София

IMPACT OF EARLY BLOOD TRANSFUSIONS ON THE IRON INDICES IN PREMATURE INFANTS

V. Atanasova¹, Ch. Mumdjiev², V. Nedkova³, M. Krusteva⁴, E. Hristova⁵

¹ OG Clinic, Neonatology department, University hospital for active treatment „Dr. G. Stranski“ EAD, Pleven;

² Neonatology Clinic, Hospital for active treatment „Prof. St. Kirkovich“ AD, Stara Zagora;

³ Pediatrics Clinic, University hospital for active treatment „Dr. G. Stranski“ EAD, Pleven;

⁴ OG Clinic, Neonatology department, University hospital for active treatment „St. Georgi“ EAD, Plovdiv;

⁵ Faculty of Public Health, Medical University, Sofia

Резюме. ЦЕЛ: Да се проучи влиянието на хемотрансфузиите (ХТ) преди 28ми постнатален ден (ранни ХТ) върху показателите на желязната статус при недоносени деца. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ: Изследвани са 102 недоносени деца, родени преди 33та гестационна седмица (г.с.), разделени в две групи: група 0 – без ранни ХТ, и група 1 – с ранни ХТ. Проследяваните са серумните нива на феритина (Ferr), трансферина (Tf), разтворимите трансферинови рецептори (sTfR), желязото (Fe), тоталния желязо-свързващ капацитет (TIBC) и са-турацията на трансферина (SatTf). РЕЗУЛТАТИ: Група 1 е с по-високи стартови нива на Ferr и на Fe в 30та, 33та и 36та седмица коригирана възраст (с.к.в.), по-ниски нива на sTfR за целия проследяван период и на TIBC в 33та и 36та с.к.в. В група 0 средните нива на Tf рязко се покачват след 33та с.к.в., като разликите са значими в 36та и 39та с.к.в. Проучвайки SatTf, в група 1 значимо преобладават проби с желязното претоварване в 30та, 33та и 36та с.к.в. и е 3 пъти по-честа находка към термина в сравнение с нетрансфузираните деца. ИЗВОДИ: Ранните ХТ водят до сериозни разстройства на желязната статус и висок риск от желязно претоварване към термин при деца, родени преди 33та г.с.

Ключови думи: желязен метаболизъм, желязно претоварване, недоносеност, хемотрансфузия

Summary. PURPOSE: To investigate the impact of blood transfusions (BTs) before 28th postnatal day (early BTs) on the iron metabolism indices in premature infants. MATERIAL AND METHODS: 102 infants, born before 33rd gestational week (GW) are investigated, divided in two groups: group 0 – without early BTs, and group 1 – with early BTs. The serum level of ferritin (Ferr), transferrin (Tf), soluble transferrin receptors (sTfR), iron (Fe), total iron binding capacity (TIBC) and transferrin saturation (SatTf) are examined. RESULTS: Group 1: the start levels of Ferr and Fe in 30th, 33rd and 36th week corrected age (WCA) are higher; the levels of sTfR throughout monitored period and TIBC in 33rd and 36th WCA are lower. Group 0: the mean Tf levels rise sharply after 33rd WCA but the differences are significant in 36th and 39th WCA. Examining the SatTf, the iron overload samples predominate in 30th, 33rd and 36th WCA and are three times more often at the term comparing to non-transfused infants. CONCLUSION: The early BTs lead to serious disorders of iron status and high risk of iron overload at term in infants, born before 33rd GW.

Key words: blood transfusion, iron metabolism, iron overload, prematurity

ВЪВЕДЕНИЕ

Желязото е есенциален микроелемент, участващ в много биологични процеси: кислороден транспорт, дишане, ДНК-синтеза, регулация на клетъчния цикъл и много други [1, 2]. Желязото е от особено значение за ранния растеж и функции на човешкия мозък [3].

Трансплацентарният подвоз на Fe нараства паралелно на гестационната възраст (г.в.), респективно на феталните нужди, като най-интензивен е през последния триместър, а максимален – от 36та до 40та гестационна седмица (г.с.).

Свободното Fe обаче може да има и опасни ефекти. То отключва реакциите на оксидативния стрес, катализирайки образуването на високо реактивни цитотоксични хидроксидови радикали. Последните увреждат макромолекулярните компоненти на клетката, включително ДНК и протеините, и чрез това предизвикват целуларна деструкция. [3, 4]

Честите хемотрансфузии (ХТ), необходими за корекция на анемичните състояния при този контингент, водят до желязно претоварване поради физиологичния недостиг на свързващите протеини и незрелостта на антиоксидантните системи, от една страна, и до депресия на секрецията на еритропоетин (ЕРО), от друга. Разделянето на ХТ на ранни и късни се основава на разликите в патогенезата на анемичните състояния, които коригират: ранните анемии се развиват до 28ми постнатален ден (през неонаталния период) и обикновено се дължат на хеморагия и/или хемолиза, а късните анемии са характерни за кърмаческия период след 28ми постнатален ден и се дължат на хипофункция на костния мозък (ЕРО-депресия) или тежко заболяване (анемии при критични състояния). Логично е с напредване на постнаталната възраст да съзряват механизмите на желязната хомеостаза, респективно способността за справяне с разстройствата ѝ.

ЦЕЛ

Да се проучи влиянието на ранните ХТ върху показателите на желязния статус при недоносени деца.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е проспективно и контролирано.

КЛИНИЧНИЯТ КОНТИНГЕНТ включва 102 недоносени деца, родени преди 33та г.с., разделени в две групи: група 0 – без ранни ХТ, и група 1 – с ранни ХТ.

Спазван е приетият в отделението рестриктивен трансфузионен протокол.

Проследяваните показатели: серумни нива на феритина (Ferr), трансферина (Tf), разтворимите трансферинови рецептори (sTfR), желязото (Fe), тоталния желязо-свързващ капацитет (TIBC) са изследвани при раждане и при навършване на 27, 30, 33, 36 и 39 седмици коригирана възраст (с.к.в.). Пробите са събирани в серумни контейнери Primavette® (KABE Labortechnik). Серумното Fe е изследвано чрез калориметричен способ, а Ferr, Tf и sTfR – с реактиви на Roche чрез биохимичен анализатор COBAS INTEGRA 400. Допълнително е калкулирана сатурацията на трансферина (SatTf) по формулата: $\text{SatTf} (\%) = [\text{Fe}/\text{TIBC}] \times 100$.

Използвани норми на показателите: Достъпните литературни норми за показателите на желязната обмяна с изключение на Ferr са за доносени новородени на възраст 1 месец [5]. Нормите на Ferr са за ниско рискови недоносени деца [6].

Статистическа обработка: Данните от проучването са обработени със софтуерни статистически пакети STATGRAPHICS v. 4.0; SPSS v. 13.0 и EXCEL for Windows. Значимостта на изводите и заключенията е определена при $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Трансфузираните до 28ми ден деца (табл. 1) съставляват 2/3 от общата популация недоносени. Те са по-незрели, с по-ниско средно тегло, по-често се раждат инфектирани, но по-рядко се наслагват нозокомиални инфекции и по-рядко се налагат късни ХТ. Контролната група 0, въпреки по-големите си зрялост и средно тегло, страда по-често от нозокомиални инфекции, изисква повече късни ХТ, което сигнификантно удължава болничния престой.

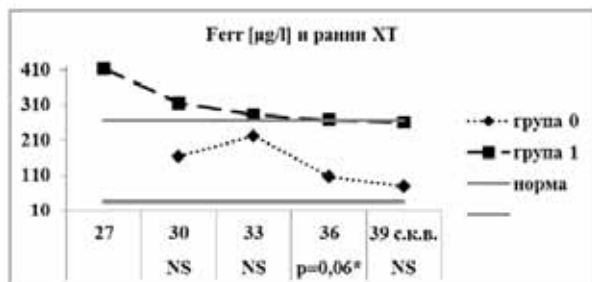
Табл. 1: Характеристика на контингента (група Б) – без ранни ХТ (група 0) и с ранни ХТ (група 1)

Показател	Група 0	Група 1	p
n	35	67	-
Средна г.в. (г.с.)	30,0±1,5	28,4±2,3	0,0003
Средно тегло при раждане (г)	1415±298	1220±325	0,004
Близнаци (%)	43	27	NS
Честота на вродени инфекции (%)	25	40	NS
Честота на нозокомиални инфекции (%)	37	3	0,0001
ЕРО-профилактирани (%)	69	52	NS
Честота на късни ХТ	0,9±0,9	0,3±0,4	0,0004
Среден престой в НИО* (дни)	57±25	40±22	0,0009

*неонатологично интензивно отделение

Динамиката на Ferr

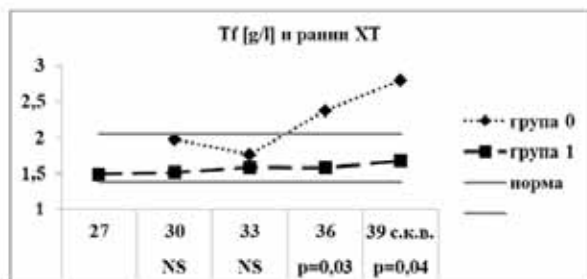
Група 1 е с по-високи стартови нива на Ferr (фиг. 1). В следващите възрастови проби стойностите на Ferr намаляват, но остават над 95ти перцентил на нормата. Група 0 е с пиково покачване на Ferr в 33та с.к.в. Към термина разликата в средните стойности на Ferr се задълбочава в полза на група 1, въпреки по-високата честота на късни ХТ при група 0.



Фиг. 1: Динамика на Ferr [µg/l] при пациенти без ранни ХТ (група 0) и с ранни ХТ (група 1)

Динамика на Tf

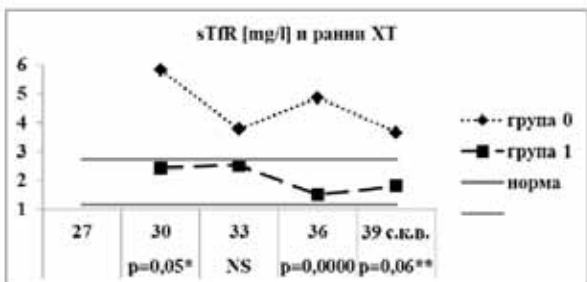
Средните нива на Tf рязко се покачват при пациентите от група 0, като разликите са значими в 36та и 39та с.к.в., когато минават горната граница на достъпната литературна норма (фиг. 2). В група 1 стойностите на показателя остават на долна граница на нормата.



Фиг. 2: Динамика на Tf [g/l] при пациенти без ранни ХТ (група 0) и с ранни ХТ (група 1).

Динамика на sTfR

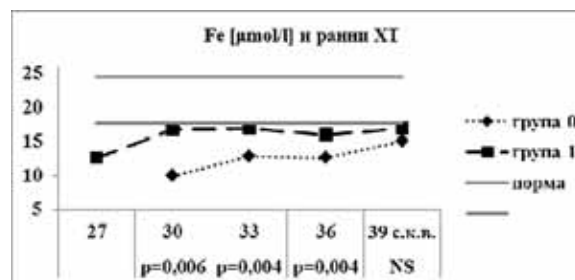
Този показател е с по-високи средни стойности (над 95ти перцентил на достъпната литературна норма) при нетрансфузираните деца за целия проследяван период. Виждаме два отчетливи спада на кривата: първият е от 30та до 33та с.к.в., а вторият – от 36та до 39та с.к.в. (фиг. 3).



Фиг. 3: Динамика на sTfR [mg/l] при пациенти без ранни ХТ (група 0) и с ранни ХТ (група 1)

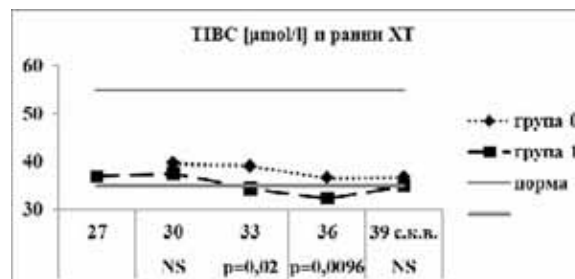
Динамика на Fe и TIBC

Деца с ранни ХТ (група 1) са със сигнификантно по-високи средни стойности на Fe в 30та, 33та и 36та с.к.в., но към термина стойностите на двете групи се изравняват (фиг. 4). Интересен факт е, че в същата група пациенти за целия проследяван период нивата на Fe остават почти стационарни, въпреки по-младата г.в., по-ниското тегло и по-редките късни ХТ. Освен това и в двете групи средните стойности на Fe са под долната граница на литературната норма.



Фиг. 4: Динамика на Fe [µmol/l] при пациенти без ранни ХТ (група 0) и с ранни ХТ (група 1)

При трансфузираните деца са налице значимо по-ниски нива на TIBC в 33та и 36та с.к.в. (фиг. 5). Това корелира с по-високите стойности на Fe в същата група. Към термина средните стойности на показателя за двете групи се изравняват.



Фиг. 5: Динамика на TIBC [µmol/l] при пациенти без ранни ХТ (група 0) и с ранни ХТ (група 1)

Ранните ХТ внасят с адултия Hgb биологично Fe, което потенциално може да се реутилизира. Това обстоятелство е заложено в основата на схващането, че рестриктивната трансфузионна политика при ELBW води до по-често развитие на желязен дефицит към термина. [7] От друга страна, при наличие на съпътстващи фактори, повлияващи механизмите на желязната обмяна, е възможно да се толерира желязно претоварване. [8]

Ferr, Tf, sTfR, Fe и TIBC са биомаркери на желязната обмяна.

Ferr е главна форма за съхранение на Fe. Нуклеарният Ferr служи за неутрализация на Fe, което иначе може да катализира оксидативно ДНК-увреждане. [6, 9] Фактори, повлияващи феритиновите концентрации при раждането, са г.в., пол, майчин желязен статус и състояния,

увреждащи майчино-феталната желязна обмяна [6].

Ниски феритинови концентрации се установяват само при желязен дефицит. Високи феритинови концентрации при новороденото се наблюдават при неонатална хемохроматоза, ексцесивен внос на Fe или ХТ. Серумните феритинови концентрации се повишават също така обаче и при инфекция, възпаление и неоплазия. При тези състояния Ferr е реактант на острата фаза и маскира желязния дефицит. [6, 9]

Най-ниската нормална стойност на плазмен Ferr при недоносените не е установена. При деца и възрастни с гHuЕРО-стимулирана еритропоеза клиницистите използват cut off стойност на плазмения Ferr 60-100 µg/l. [5, 10] Нормалните стойности варират от 100 до 800 ng/ml. При критично болни пациенти обаче тези стойности може да са различни. [5, 29] Няма приети стандарти за минималната стойност на Ferr при деца, родени преди 30та г.с., тъй като липсват достатъчно такива проучвания. Според Siddappa et al [10] за ниско рисковите недоносени деца минималната граница на Ferr от пълна кръв е 35, а максималната – 267 µg/l.

В нашето проучване пиковите нива на Ferr след раждането в група 1 и в 33та с.к.в. в група 0 асоциираме с по-високата честота на вродените инфекции при първите и наслояването на нозокомиална инфекция при вторите, т.е. с ролята на Ferr като острофазов белтък.

Tf реално отразява биохимичния капацитет за залавяне и транспорт на ендегенното Fe. В норма всичкото нехемово Fe в циркулацията е свързано с Tf, но само около 30% от Tf-свързващите страни са окупирани от Fe. При желязно претоварване се среща Fe, несвързано с Tf. [9] Плазмените трансферинови нива на недоносените деца са по-ниски от тези на възрастните и могат да бъдат високо наситени с Fe. [10]

В нашето проучване Tf при пациентите от група 0 се покачва стръмно след 33та с.к.в. Това обстоятелство ние интерпретираме като отговор на желязната хомеостаза за неутрализиране на свободното Fe, което се натрупва поради наслагването на нозокомиална инфекция, разстройваща желязния метаболизъм, и повечето късни ХТ при тези деца.

Въпреки че нивата на TfRс се съобщават като отразяващи желязния статус при новородени недоносени деца, според някои автори [11] те корелират със стимулацията на еритропоезата, а не с желязния статус.

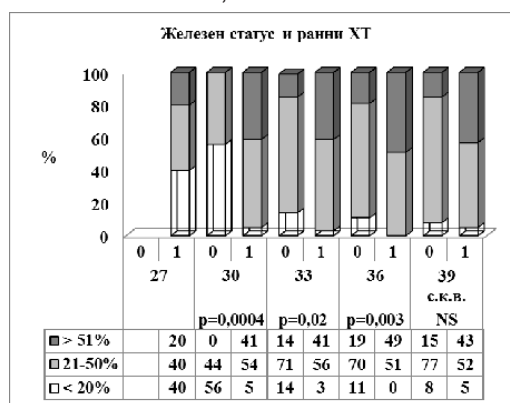
В нашето проучване sTfR са с по-високи стойности за целия проследяван период при нетрансфузираните деца, което свързваме с хипоксия-индуцирана еритропоеза. Двата спада на стойностите към 33та и 39та с.к.в. обясняваме с наслояването на нозокомиална инфекция и с по-високата честота на късни ХТ.

Серумното Fe се влияе от дневните вариации и състояния като възпаление, инфекция, неоплазми, чернодробни болести. Затова рядко се използва самостоятелно за уточняване етиологията на анемията. Нива под 9 µg/l индикират желязен дефицит [5, 12].

При нашите пациенти стойностите на Fe са сигнификантно по-високи до 36та с.к.в. в групата на трансфузираните деца. Това обстоятелство, интерпретирано в контекста на по-високите нива на Ferr, по-ниските – на Tf и TIBC, насочва към натрупване на свободно желязо, което напъва значимо механизмите на желязната хомеостаза. В същото време естественият път на ангажиране на Fe, включвайки го в хема на Hgb е потиснат, което се доказва с по-ниските стойности на sTfR. SatTf е показател, даващ обобщена оценка за желязния статус и не се повлиява от системна възпалителна реакция. Серумното Fe и SatTf дават информация за количеството на непосредствено достъпното за еритропоезата Fe. Препоръчаните стойности на SatTf според National Kidney Foundation са 20-50%. SatTf под 20% индицира намалена достъпност на Fe и, в зависимост от клиничната картина, необходимостта от желязната суплементация. Обратно на това, SatTf над 55% насочва към възможно желязно претоварване. При критично болни пациенти с висок Ferr и ниска SatTf се подозира функционален желязен дефицит. [13]

По-нагледна обобщена информация за желязния статус в различните групи се получава, ако пациентите се разделят на 3 подгрупи: с желязен дефицит (SatTf ≤ 20%), с нормален желязен статус (SatTf 21-50%) и с желязно претоварване (SatTf ≥ 51%) – фиг. 6.

В нетрансфузираната група 0 в 30та с.к.в. преобладават проби с желязен дефицит. С нарастване на п.в. е налице тенденция към нормализация на желязния статус в същата група. При рано трансфузираната група 1 желязното претоварване е факт при повече от 1/3 от децата и е 3 пъти по-честа находка към термина в сравнение с нетрансфузираните деца. Разликата е значима в 30та, 33та и 36та с.к.в.



Фиг. 6: Сравнителна характеристика на SatTf [%] между група 0 (без ранни ХТ) и група 1 (с ранни ХТ)

ИЗВОДИ

В нашето проучване ранните ХТ водят до сериозни разстройства на желязната статус. Механизмите за регулация на желязната обмяна се напругат значимо при тези пациенти, което се демонстрира с покачване на средните стойности на желязо-складиращия субстрат – Ferr, серумното Fe и SatTf. Това резултира във висок риск от желязно претоварване към термин при трансфузираните деца – при ~ 45% от тях.

При група 0 желязната хомеостаза реагира адекватно на наслагането на нозокомиална инфекция и късните ХТ, като повишава нивата на Fe-свързващия белтък Tf, с което свободното Fe се секвестрира от плазмата. Освен това ефективно стимулираната от раждането еритропоезата ангажира свободното Fe и го насочва там, където му е мястото – в хема на Hgb. Вероятно значение тук има и по-високата зрялост на Fe-регулирущите механизми с нарастване на постконцептуалната възраст. Затова към термина желязно претоварване се среща три пъти по-рядко, отколкото при рано трансфузираните деца.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Beaumont C, Delaby C: Recycling iron in normal and pathological states. *Semin Hematol* 2009 Oct;46(4):328-38
2. Pacal L, Kankova K: New knowledge on iron metabolism and its disorders. *Cas Lek Cesk* 2004;143(1):9-14
3. Rao R, Georgieff MK: Iron therapy for preterm infants. *Clin Perinatol* 2009 March;36(1):27-42
4. Кръстева, М., М. Малинова: Оксидативен стрес при недоносени новородени. *Акуш и Гинекол* 2012;3:35-41
5. De Alarcon PA, Werner EJ: Neonatal hematology. Cambridge University Press 2005

6. Siddappa AM, Rao R, Long JD et al: The assessment of newborn iron stores at birth: a review of the literature and standards for ferritin concentrations. *Neonatology* 2007;92(2):73-82
7. Kirpalani H, Whyte RK, Andersen C et al: The Premature Infants in Need of Transfusion (PINT) study: a randomized, controlled trial of a restrictive (low) versus liberal (high) transfusion threshold for extremely low birth weight infants. *J Pediatr* 2006 Sep;149(3):301-307
8. Fleming RE, Ponka P: Iron overload in human disease. *N Engl J Med* 2012;366:348-59
9. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M: Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001 Oct;33(10):940-59
10. Kling PJ, Winzerling JJ: Iron status and the treatment of the anemia of prematurity. *Clin Perinatol* 2002;29:283-294
11. Schiza V, Giapros V, Pantou K et al: Serum transferrin receptor, ferritin, and reticulocyte maturity indices during the first year of life in 'large' preterm infants. *Eur J Haematol* 2007 Nov;79(5):439-46
12. World Health Organization: Assessing the iron status of populations: report of a Joint World Health Organization/ Centers for Disease Control and Prevention technical consultation on the assessment of iron status at the population level. Geneva, Switzerland 2004 Apr 6-8
13. Asare K: Anemia of critical illness. *Pharmacotherapy*. 2008;28(10):1267-1282

Адрес за кореспонденция

Д-р Виктория Атанасова Георгиева, д.м.
УМБАЛ Д-р Г. Странски ЕАД, Втора Клинична База
АГ Клиника, Отделение по неонатология
Плевен 5800, Ул. „Ген. Вл. Вазов“ №91
e-mail: victoria_atanasova@yahoo.co.uk
GSM: +359887591823

ВЛИЯНИЕ НА РАННИТЕ ХЕМОТРАНСФУЗИИ ВЪРХУ ПОКАЗАТЕЛИТЕ НА КРЪВНАТА КАРТИНА ПРИ НЕДОНОСЕНИ ДЕЦА

Атанасова В.¹, Хр. Мумджиев², В. Недкова³, М. Кръстева⁴, Е. Христова⁵

¹АГ Клиника, Отделение по неонатология, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД, Плевен;

²Клиника по неонатология, МБАЛ „Проф. Ст. Киркович“ АД, Ст. Загора;

³Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ ЕАД, Плевен;

⁴АГ Клиника, Неонатологично отделение, УМБАЛ „Св. Георги“ ЕАД, Пловдив;

⁵Факултет по обществено здраве, МУ-София

IMPACT OF THE EARLY BLOOD TRANSFUSIONS ON THE BLOOD COUNT INDICES IN PREMATURE INFANTS

V. Atanasova¹, Ch. Mumdjiev², V. Nedkova³, M. Krusteva⁴, E. Hristova⁵

¹OG Clinic, Neonatology department, University hospital for active treatment „Dr. G. Stranski“ EAD, Pleven;

²Neonatology Clinic, Hospital for active treatment „Prof. St. Kirkovich“ AD, Stara Zagora;

³Pediatrics Clinic, University hospital for active treatment „Dr. G. Stranski“ EAD, Pleven;

⁴OG Clinic, Neonatology department, University hospital for active treatment „St. Georgi“ EAD, Plovdiv;

⁵Faculty of Public Health, Medical University, Sofia

Резюме: ЦЕЛ: Да се проучи влиянието на хемотрансфузиите (ХТ) преди 28ми постнатален ден (ранни ХТ) върху показателите на кръвната картина при недоносени деца. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ: Изследвани са 299 недоносени деца, родени преди 33та гестационна седмица (г.с.), разделени на две групи според г.в. при раждане (≤ 29 г.с. и 30-33 г.с.). Всяка група е разделена на 2 подгрупи: контролна група 0 – без ранни ХТ, и работна група 1 – с ранни ХТ. Проследявани са хемоглобин (Hgb), хематокрит (Hct), среден корпускуларен обем (MCV), средна корпускуларна концентрация на Hgb (MCHC) и периферни ретикулоцити (Ret). РЕЗУЛТАТИ: Децата с ранни анемии са с по-ниско средно тегло, по-често страдат от нозокомиални инфекции и изискват по-често късни ХТ. Стойностите на Hgb и Hct в група 1 са сигнификантно по-ниски през неонаталния период, след което те се изравняват с тези на група 0, като при по-незрелите деца са по-високи към термина. При по-незрелите деца MCHC не показва значима разлика във всички проследявани постнатални проби, но при по-зрелите НЕтрансфузирани деца се отчитат сигнификантно по-високи стойности към термина. MCV е без значима разлика за целия проследяван период при по-незрелите деца. При анемичните по-зрели деца средните стойности на MCV са по-ниски от раждането, като към термина тази разлика се задълбочава и е значима във всички възрастови проби. Стойностите на Ret не показват значима разлика в динамика и в двете възрастови групи. ИЗВОДИ: Ранните ХТ повлияват негативно в дългосрочен план хематологичния статус на недоносените деца, родени преди 33та г.с.

Ключови думи: еритропоеза, недоносеност, хемотрансфузии

Summary. PURPOSE: To investigate the impact of blood transfusions (BTs) before 28th postnatal day (early BTs) on the blood count indices in premature infants. **MATERIAL AND METHODS:** 299 premature infants, born before 33rd gestational week (GW), are investigated, divided in 2 groups according to the gestational age at birth (≤ 29 GW and 30-33 GW). Each group is divided in 2 subgroups: control group 0 – without early BTs, case group 1 – with early BTs. Hemoglobin (Hgb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular Hgb concentration (MCHC) and peripheral reticulocytes (Ret) are examined. **RESULTS:** The anemic infants are with lower average birth weight, more often with nosocomial infections and late BTs. The Hgb and Hct values of group 1 are significantly lower in the neonatal period, aligned with those of group 0 later, but stayed higher in the less mature group at the term. MCHC of the less mature infants displays no significant difference in the entire monitored period, but significant higher values of the more mature NON-transfused infants are observed at the term. MCV of the less mature infants does not show

a significant difference throughout the monitored period. The average MCV values of the anemic more mature infants are lower from the birth and that difference is extending to the term and is significant in all age samples. There is not a significant difference of the Ret values dynamics in both age groups. **CONCLUSIONS:** The early BTs influence negatively long-term the hematological status of the premature infants, born before 33rd GW.

Key words: blood transfusion, erythropoiesis, prematurity

ВЪВЕДЕНИЕ

Недоносеното дете е изложено на по-висок риск от анемизация в сравнение с всички останали възрастови групи. В зависимост от патогенезата неонаталните анемии са [1]: постхеморагични, хемолитични, хипорегенераторни и анемии при критични състояния [2, 3], при които, освен първите три, се намесват и други механизми: инфекция, имунна дисфункция, метаболитни нарушения.

Различните патогенетични типове неонатални анемии са характерни за различна постнатална възраст (п.в.). Така за неонаталния период (до 28ми постнатален ден) са характерни анемиите, следствие на кръвозагуба и /или хемолиза, а след това – анемиите от хипопластичен тип с типичен представител анемията на недоносеността (АН) и анемиите при критични състояния. В зависимост от това хемотрансфузиите (ХТ), коригиращи анемиите до 28ми постнатален ден, се означават като ранни, а тези след това – като късни.

Въпреки еволюцията на клиничната практика относно грижите за децата с много и екстремно ниско тегло при раждане, те продължават да изискват много ХТ по време на болничния си престой.

ЦЕЛ

Да се проучи влиянието на ранните ХТ върху показателите на кръвната картина при недоносени деца.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е проспективно и контролирано. Изследвани са 299 недоносени деца, родени преди 33та гестационна седмица (г.с.), преживели ранния неонатален период (7ми постнатален ден) и без хирургични компликации по време на болничния си престой.

Спазван е приетият в отделението рестриктивен трансфузионен протокол.

Общата популация от 299 пациенти е разделена на две групи според г.в. при раждане (≤ 29 г.с. и 30-33 г.с.). Мотивацията за това разделяне е различната степен на зрялост, което се очаква да се отрази върху динамиката на проучваните показатели. Всяка група е разделена на 2

подгрупи: контролна група 0 – без ранни ХТ, и работна група 1 – трансфузирани до 28ми ден.

Проследяваните показатели: хемоглобин (Hgb), хематокрит (Hct), среден корпускуларен обем (MCV), средна корпускуларна концентрация на Hgb (MCHC), периферни ретикулоцити (Ret), са изследвани при раждане и при навършване на 27, 30, 33, 36 и 39 седмици коригирана възраст (с.к.в.) с помощта на биохимичен анализатор COBAS INTEGRA 400 и хематологичен анализатор MICROS. Използвани са само проби от венозна кръв, събирани в стандартни фабрични контейнери за венозна кръв с добавен EDTA. Стойностите на Ret са калкулирани на 1000 еритроцита (Rbc) чрез изброяване в натривки.

Използвани норми за показателите: Използвали сме нормите за показателите на кръвната картина за 1ви постнатален ден, като след 30та г.с. стойностите на Hgb, MCV и MCHC са адаптирани към постнаталната възраст [4, 5]. Достъпните стандарти за венозния Hct и Ret са само за 1ви постнатален ден и няма адаптирани норми за венозни кръвни проби на деца, родени преди 30та г.с. [4, 6].

Данните от проучването са обработени със софтуерни статистически пакети STATGRAPHICS v. 4.0; SPSS v. 13.0 и EXCEL for Windows. Значимостта на изводите и заключенията е определена при $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Втабл. 1 е отразена сравнителната характеристика на групите с и без ранни ХТ при деца, родени до навършване на 29 г.с. Ранни ХТ при този контингент се налагат често – при $\sim 84\%$ от пациентите. Децата, които се раждат анемични, са с около 100 грама по-ниско средно тегло, по-често страдат от нозокомиални инфекции, което допълнително удължава болничния им престой и налага по-често късни ХТ. Децата без ранни анемии са по-често с вродени инфекции, но вътреболничните компликации са по-малко, което се отразява позитивно на продължителността на болничния им престой и честотата на късните ХТ.

Табл. 1: Характеристика на контингента ≤ 29 г.с. – група 1 (с ранни ХТ) и група 0 (без ранни ХТ)

Показател	Група 1	Група 0	p
n	113	22	-
Средна г.в. (г.с.)	27,4 $\pm$ 1,5	28,1 $\pm$ 1,0	0,045

Средно тегло при раждане (г)	1078±222	1262±269	0,0008
Близнаци (%)	27	23	NS
Честота на вродени инфекции (%)	21	59	0,0002
Честота на нозоком. инфекции (%)	56	23	0,0044
Среден престой в НИО* (дни)	60±26	42±23	0,004
Честота на късни ХТ	1,3±1,2	0,5±0,8	0,007

*неонатологично интензивно отделение

При по-зрелите деца (табл. 2) ранни ХТ се налагат по-рядко, отколкото в по-малката възрастова група. Отново обаче анемичните деца са с по-ниско средно тегло, по-често се разболяват от вътреболнични инфекции, което удължава болничния им престой и се налагат по-често късни ХТ.

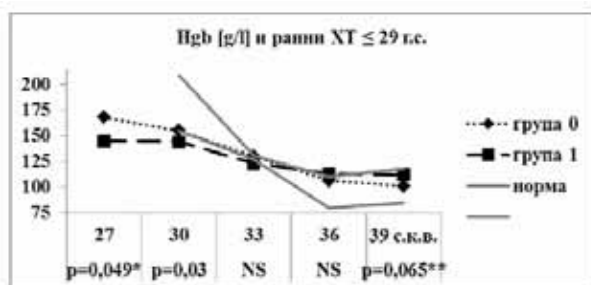
Табл. 2: Характеристика на контингента 30-33 г.с. – група 1 (с ранни ХТ) и група 0 (без ранни ХТ)

Показател	Група 1	Група 0	p
n	82	82	-
Средна г.в. (г.с.)	30,7±0,7	31,1±0,8	0,002
Средно тегло при раждане (г)	1456±290	1554±260	0,02
Близнаци (%)	24	27	NS
Честота на вродени инфекции (%)	20	24	NS
Честота на нозоком. инфекции (%)	28	4	0,0000
Среден престой в НИО (дни)	31±13	25±14	0,002
Честота на късни ХТ	0,3±0,5	0,2±0,4	0,02

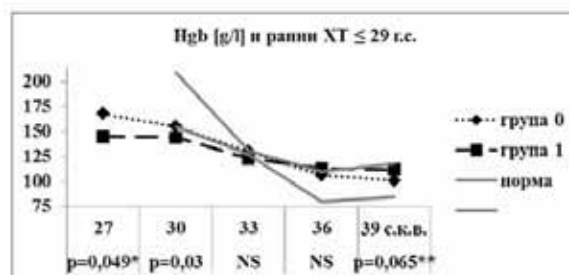
Динамика на Hgb и Hct

Във фиг. 1 при децата, родени до навършване на 29 г.с., е документирана ранната анемия (значимо по-ниски Hgb-стойности при трансфузираните в 27ма и 30та с.к.в.). С нарастване на п.в. тези стойности се изравняват, а към термина трансфузираните деца се отличават със сигнификантно по-високи средни Hgb-нива от нетрансфузираните (повисока честота на късни ХТ).

Проследявайки средните стойности на Hct в същата възрастова група се наблюдават същите закономерности, както при Hgb – към термина трансфузираните деца са със сигнификантно по-висок Hct от нетрансфузираните (фиг. 2).

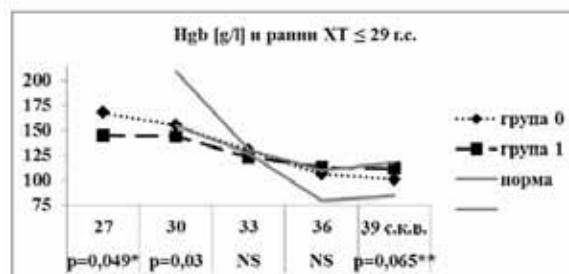


Фиг. 1: Динамика на Hgb [g/l] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) ≤ 29 г.с.

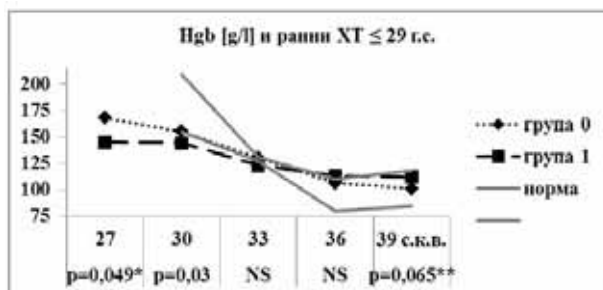


Фиг. 2: Динамика на Hct – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) ≤ 29 г.с.

Средните стойности на Hgb и Hct при по-зрелите анемични и неанемични деца са без значима разлика към термина (фиг. 3 и 4).



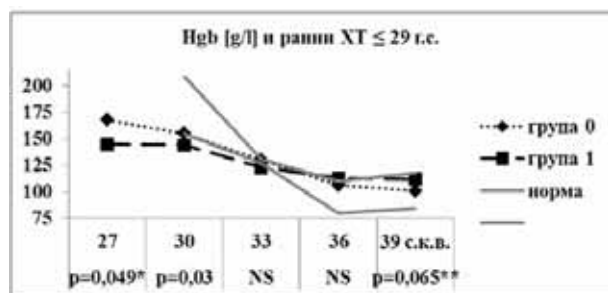
Фиг. 3: Динамика на Hgb [g/l] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) 30-33 г.с.



Фиг. 4: Динамика на Hct – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) 30-33 г.с.

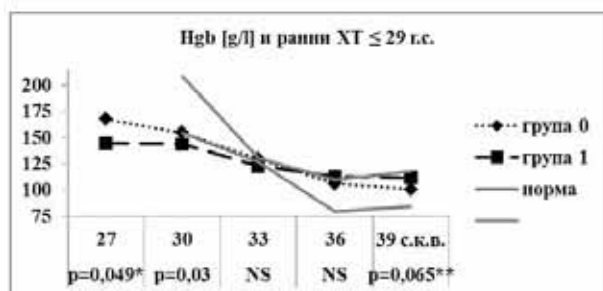
Динамика на МСНС

МСНС е индикатор на желязните запаси, получени интраутеринно [7]. При по-незрелите деца МСНС не показва значима разлика във всички проследявани постнатални проби (фиг. 5). Средните стойности и при двете групи пациенти са на горна граница на нормата.



Фиг. 5: Динамика на МСНС [g/l] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) ≤ 29 г.с.

Стартовите нива на МСНС при по-зрелите деца също са съизмерими, но се отчитат сигнификантно по-високи стойности към термина при НЕтрансфузираните (фиг. 6).

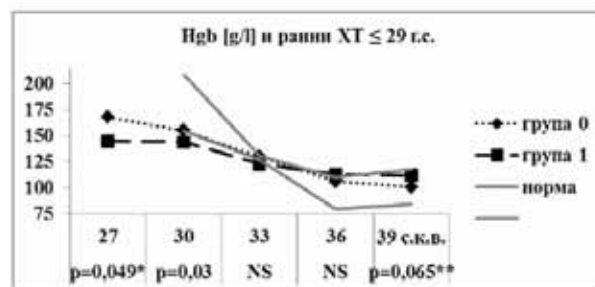


Фиг. 6: Динамика на МСНС [g/l] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) 30-33 г.с.

Динамика на MCV

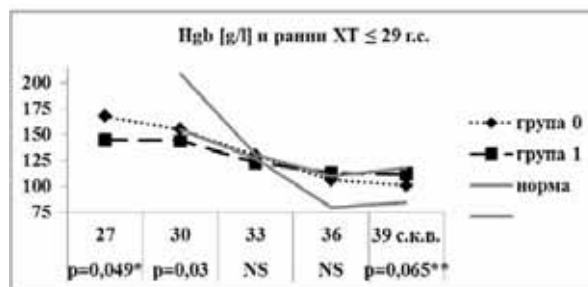
Хемолизата на неонаталните Rbc през първите дни, следствие на оксидативния стрес, повлиява MCV [3]. Но освен това MCV е и маркер за различни нутритивни дефицити [6, 8]. По отношение на MCV анемичните деца, родени до навършване на 29 г.с., се раждат с по-ниски стойности, но към

термина те са по-високи от тези на неанемичните. Разликата обаче не е значима (фиг. 7). При нашите пациенти и за двете групи средните стойности са под долна граница на нормата.



Фиг. 7: Динамика на MCV [fl] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) ≤ 29 г.с.

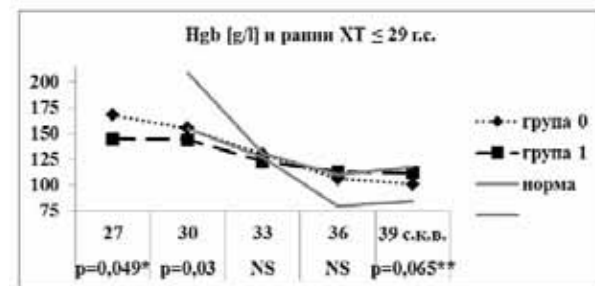
При анемичните по-зрели деца средните стойности на MCV са по-ниски от раждането, като към термина тази разлика се задълбочава в полза на неанемичните деца и е статистически значима във всички възрастови проби (фиг. 8). В сравнение с нормата неанемичните деца са в по-изгодна позиция.



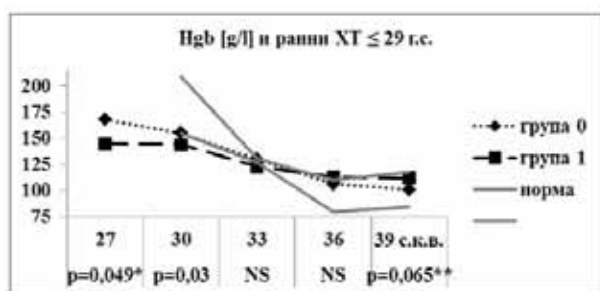
Фиг. 8: Динамика на MCV [fl] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) 30-33 г.с.

Динамика на Ret

Въпреки различните трансфузионни нужди, при нашите пациенти стойностите на Ret не показват значима разлика в динамика между трансфузираните и нетрансфузираните деца и в двете възрастови групи (фиг. 9 и 10). Наблюдаваме обаче широк диапазон на вариране на стойностите (coeff. of variation 50-70%), свидетелстващ за индивидуалния характер на енергичността на костно-мозъчния отговор към хипоксемията.



Фиг. 9: Динамика на Ret [0/00] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) ≤ 29 г.с.



Фиг. 10: Динамика на Ret [0/00] – с ранни ХТ (група 1) и без ранни ХТ (група 0) 30-33 г.с.

Хемопоезата започва през 2ра-3та г.с. в кръвните островчета на жълтъчния сак. Периферните клетки на тези острови формират първични кръвоносни съдове, докато централните клетки се развиват в примитивни Rbc или хематобласти. Тук се продуцират само Rbc и макрофаги. След 3ти лунарен месец (л.м.) кръвната продукция в жълтъчния сак се прекратява. [9] През 5та-6та г.с., непосредствено след началото на кръвната циркулация, черният дроб става главно място на еритропоезата. Хепаталната фаза на еритропоезата трае до 6ти л.м., след което костният мозък постепенно става главен хемопоетичен орган. [9]

Растежни фактори контролират пролиферацията, диференциацията и преживяемостта на хемопоетичните стволови и съответните прогениторни клетки. Тези фактори са специфични и неспецифични за съответните клетъчни линии. Първичен специфичен растежен фактор, регулиращ еритропоезата, е еритропоетинът (ЕРО). Секретира се в отговор на хипоксия, а неговият таргетен орган е костният мозък. Във фетуса първичният източник на ЕРО са Купферовите клетки в черния дроб. Постнатално тази роля се поема от перитубуларните ренални клетки. [9, 10] Превключването от хепатална към ренална продукция на ЕРО започва през последните седмици на бременността и продължава до 4та-6та постнатална седмица. [11] ЕРО не преминава през плацентата, така че майчината и феталната продукция са независими една от друга и нивата на ЕРО у фетуса отразяват собствената му еритропоеза. [12] Повишаване на еритроцитната продукция е нужно за поддържане на повишаващите се кръвен обем и Hct, асоциирани с феталния растеж, особено през последния триместър. [11, 12]

Преждевременното раждане прекъсва процесите на онтогенеза на еритропоезата, което логично води до разстройствата ѝ, особено в условията на компрометиран имунитет и повишена заболяемост, каквито са характерни за недоносените деца.

По литературни данни хематологичните

показатели при раждане зависят от зрелостта на новороденото. Общата тенденция е нарастване на стойностите пропорционално на г.в. за пробите от пълна връв или през 1ви постнатален ден и намаляването им с нарастване на п.в. на недоносените. [4, 5] Нивата на Hgb при раждането се покачват от 145 до 180 g/l с нарастване на гестацията [5]. При недоносените деца с нарастване на п.в. обаче е налице закономерна тенденция към намаляване на Hgb-нива от 182 ± 27 g/l при раждане до 95 ± 15 g/l на 49ти постнатален ден. Същото се наблюдава със стойностите на Hct, MCV и Ret, докато MCHC е относително константна величина, логично следваща високите O₂-нужди на бързо растящия организъм на недоносеното дете.

Ранните ХТ могат да бъдат фактор с нееднозначно влияние върху постнаталната еритропоеза: адултният Hgb с по-високия си афинитет към O₂ води до потискане на хипоксия-индуцираната хемопоеза – от една страна, но и до внос на хемово Fe с възможност за реутилизация, от друга. С въвеждането на рестриктивната трансфузионна политика при недоносените деца се натрупаха данни, доказващи негативното ѝ влияние върху железните запаси при най-незрелите деца с тегло при раждане под 1000 г. [13, 14] Приложението на рекомбинантен човешки ЕРО за профилактика или лечение на АН при този контингент се очаква допълнително да влоши железния им баланс към термин. В същото време несъстоятелността на железните хомеостазни механизми при недоносените може да генерира желязно претоварване след повтарящи се ХТ [15, 16].

Според нашето проучване децата, които получават повече ранни ХТ, по-често боледуват от нозокомиални инфекции и по-често изискват късни ХТ. Затова смятаме, че ранната анемизация е съществен фактор, повлияващ както еритропоезата в дългосрочен план, така и имунната реактивност на този контингент.

Динамиката на Hgb и Hct се отличава при по-незрелите деца: те показват значимо по-високи стойности на показателите при трансфузираните към изписването. Това може да е свързано с по-високата честота на късни ХТ при тях, но от друга страна доказва способността на този контингент да реутилизират Fe, получено от донорските ХТ. В полза на последното твърдение е фактът, че при раждането средните стойности на MCHC при анемичните и неанемичните не се различават статистически, което доказва еднаквите интраутеринно получени железни запаси. Освен това MCV при анемичните деца, родени до навършване на 29 г.с., е с по-ниски стойности при раждане, но към термина те са по-високи от тези на неанемичните, въпреки повишения внос на

адултни Rbc.

При по-зрелите деца наличието на ранни ХТ е индикатор за интраутеринен компромат. Това са деца, родени с ниски запаси и лоши възможности за компенсация постнатално. Доказателство за това са задълбочаването на разликата в средните стойности на MCV и MCHC в полза на НЕтрансфузираните към термина и по-малкото вътреболнични компликации при тях.

Стойностите на MCHC при нашите пациенти са на горна граница на нормата, което доказва добри интраутеринни доставки. MCV обаче е с по-ниски средни стойности от нормата, като това е по-подчертано при по-незрелите и рано трансфузирани пациенти. Този факт интерпретира неефективност на еритропоезата, следствие на постнатални нутритивни дефицити или като популационна черта на неонаталните Rbc при нашите недоносени деца.

ИЗВОДИ

Ранните ХТ повлияват негативно в дългосрочен план хематологичния статус на недоносените деца, родени преди 33та г.с. Към термина децата, родени до навършване на 29 г.с., компенсират по-ефективно тези нарушения в сравнение с тези, родени в 30та-33та г.с. При последните наличието на ранни ХТ е индикатор за интраутеринен компромат.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 7th Ed. Saunders 2009
2. Asare K: Anemia of critical illness. Pharmacotherapy. 2008;28(10):1267-1282
3. Iron overload with anemia: clinical evaluation and management protocol. Iron Disorders Institute 2010
4. Alur P, Devapatla SS, Super DM et al.: Impact of race and gestational age on red blood cell indices in very low birth weight infants. Pediatrics 2000;106:306-310
5. De Alarcon PA, Werner EJ: Neonatal hematology. Cambridge University Press 2005
6. Carley A: Anemia: When is it iron deficiency? Pediatr Nurs 2003;29(2):127-133
7. Balogh A, Bosze S, Horváti K et al: Role of iron metabolism-regulator hepcidin in perinatal iron homeostasis. Orv Hetil 2010 Jan 17;151(3):83-91
8. Siddappa AM, Rao R, Long JD et al: The assessment of newborn iron stores at birth: a review of the literature and standards for ferritin concentrations. Neonatology 2007;92(2):73-82
9. Zon LI: Developmental biology of hematopoiesis. Blood 1995 Oct;86(8):2876-2891
10. Ohls RK: Erythropoietin and hypoxia inducible factor-1 expression in the mid-trimester human fetus. Acta Paediatr Suppl 2002;91(438):27-30
11. Polin RA, Fox WW, Abman SH: Fetal and neonatal physi-

ology. 4th Ed. Saunders 2011

12. Deborah L: Recombinant erythropoietin for the treatment of anemia of prematurity: Is it beneficial? NBIN 2004;4(3):156-161
13. Istaphanous GK, Wheeler DS, Lisco SJ, Shander A: Red Blood Cell Transfusion in Critically Ill Children. Pediatr Crit Care Med 2011;12(2):174-183
14. Kirpalani H, Whyte RK, Andersen C et al: The Premature Infants in Need of Transfusion (PINT) study: a randomized, controlled trial of a restrictive (low) versus liberal (high) transfusion threshold for extremely low birth weight infants. J Pediatr 2006 Sep;149(3):301-307
15. Basile LA: Transfusion therapy. NBIN 2004;4(4):223-230
16. Handbook of iron overload. Cambridge University Press 2010

Адрес за кореспонденция

Д-р Виктория Атанасова Георгиева, д.м.
УМБАЛ Д-р Г. Странски ЕАД, Втора Клинична База
АГ Клиника, Отделение по неонатология
Плевен 5800, Ул. „Ген. Вл. Вазов“ №91
e-mail: victoria_atanasova@yahoo.co.uk
GSM: +359887591823

ТЕРАПЕВТИЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПРИ ТЕРАПИЯТА НА ПАЦИЕНТИТЕ С ОСТРА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕВКЕМИЯ В НСБАЛХЗ ЗА ПЕРИОДА 01.2008 – 05.2013

С. Лозенов¹, Б. Спасов¹, М. Дончев¹, К. Игнатова¹, П. Ганева², Ю. Жечев¹, В. Стоева¹, В. Върбанова¹, С. Симеонов¹, М. Генова⁴, С. Ангелова³, Г. Балаценко³, Д. Пейчев¹, Г. Арnaudov², Г. Михайлов¹

¹Отделение по кл. хематология, ²От-е по транспл. на хемопоеитични стволови клетки, ³Лаб-я по мол. биология и цитогенетика, ⁴Лаб-я по хематопатология и имунология – НСБАЛХЗ ЕАД, София

THERAPEUTIC RESULTS FROM THE THERAPY OF NSHATHD'S PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA FOR THE PERIOD 01.2008 – 05.2013

S. Lozenov¹, B. Spassov¹, M. Donchev¹, K. Ignatova¹, P. Ganeva², Y. Zhechev¹, V. Stoeva¹, V. Varbanova¹, S. Simeonov¹, M. Genova⁴, S. Angelova³, G. Balatsenko³, D. Peichev¹, G. Arnaudov², G. Mihaylov¹

¹Department of Clinical Hematology, ²Department of Hematopoietic stem cell transplantation, ³Laboratory of Cytogenetics and Molecular Biology, ⁴Laboratory of Hematopathology & Immunology – NSHATHD, Sofia

Резюме. Въпреки огромния прогрес в терапията на острата лимфобластна левкемия през последните две десетилетия, тази нозологична единица остава предизвикателство. Нашият колектив си постави за цел чрез оценка на показателите за терапевтичен отговор и преживяемост при пациентите с ОЛЛ, лекувани в НСБАЛХЗ, да направи оценка и да съпостави различните терапевтични стратегии при първа и при втора линия терапия на ОЛЛ. За да се изпълни тази цел, се извърши оценка на всички болни, диагностицирани с ОЛЛ и лекувани в НСБАЛХЗ за периода от 01.2008 до 05.2013, като групата включва общо 65 пациента на възраст от 18 до 65 години с медиана на възрастта от 41,67, рисковите и високо рисковите пациенти съставляват 66% от наблюдаваната група. Прилаганите протоколи на първа линия терапия, за които е извършена оценка, са GMALL 07/03, LALA 94, HyperCVAD, GALGB 8811, а на втора линия GMALL 07/03 и HyperCVAD. Пациентите са стратифицирани по използвана терапия, степен на риск и според възрастовата група. При първа линия терапия се наблюдава CR от 67,8%, а след втора линия терапия 38%. Общата 5-годишна преживяемост за цялата пациентска група е 23%, медианата на общата преживяемост свободна от заболяване е 9,93 месеца. Не се доказва статистически значима разлика между използваните протоколи на първа линия по отношение на общата преживяемост. На втора линия терапия най-добри резултати са наблюдавани при GMALL 07/03 и HyperCVAD с постигане на CR респективно в 54,5% и 43,75%. Сред най-високата възрастова група се наблюдава OS от 15,7%. Въпреки напредъка, ограничените резултати очертават широкото поле пред алогенната трансплантационна програма при тези пациенти.

Ключови думи: Остра лимфобластна левкемия, GMALL 07/03, LALA 94, HyperCVAD, GALGB 8811, рискова стратификация, възрастова стратификация, обща преживяемост, пълна ремисия,

Summary. Despite the huge progress in the therapy of acute lymphoblastic leukemia during the past two decades, this nosology remains a challenge. Our team set the aim of evaluating and comparing the results from the different first and second line therapeutic strategies in ALL, by evaluating overall survival and response rate. To achieve this goal, we performed an evaluation of all ALL patients, who received therapy in NSHATHD for the period between 01.2008 and 05.2013, who comprised a group of 65 patients with a median age of 41,67 years, the youngest patient being 18 years old and the oldest 65 years old, and with 66% very high risk and high risk patients in the group. The main protocols used as a first line therapy included GMALL 07/03, LALA 94, HyperCVAD, GALGB 8811, and the main second line regimens were GMALL 07/03 and HyperCVAD. The patients were stratified according their risk and age groups. We identified a CR rate of 67,8% for the first line therapy of the entire group and a 38% CR rate for the second line therapy. The five-year OS for the whole group was 23%, the median of the disease free survival was 9,93 months. No statistically significant difference could be established between the first line protocols, regarding OS. GMALL 07/03 and HyperCVAD demonstrated best results in terms of CR rate as a second line treatment with CR of 54.5% and 43.75% respectively. The OS amongst the eldest age group was 15.7%. In spite of the progress in the therapy of ALL, the limited results imply the growing significance of the allogeneic transplantation strategy for the ALL patients.

Key terms: Acute lymphoblastic leukemia, GMALL 07/03, LALA 94, HyperCVAD, GALGB 8811, risk stratification, age stratification, overall survival, complete remission

ВЪВЕДЕНИЕ

Въпреки огромния прогрес в терапията на острата лимфобластна левкемия през последните две десетилетия и въпреки изцяло новата философия на педиатрично вдъхновените протоколи, прилагани при възрастни пациенти, стратегическите параметри, свързани с резултатите от лечението, а именно 5-годишна преживяемост и 5-годишната преживяемост свободна от заболяване остават на незадоволителни нива. Западните автори, прилагащи основните съвременни протоколи за терапия на ОЛЛ - UKALL, GMALL, GALGB, HyperCVAD, цитират високи резултати за постигане на пълна ремисия от първа линия терапия, в порядъка на 80% до 91% [1], [2], [4], [6], [7]. Тези високи нива на постигната ремисия, обаче не корелират с толкова добри нива на общата пет годишна преживяемост, които за същите протоколи се движат в порядъка на 30% до 40% [1], [2], [4], [6], [7]. Много съществено при оценката дори на тези резултати е внимателният анализ на дефинирането на пациентската популация голяма част от групите дефинират възрастови групи с долна граница под 18 години и горна варираща между 40 и 65 години, като средната възраст на наблюдаваната популация най-често е в границите между 17.9 и 39.5, такива са и границите на възрастта в цитираните по-горе резултати [1,5,7,8]. Съществена при оценката на терапевтичните резултати е и оценката на рисковата структура на популацията и особено на рисковата структура по отношение на много високия цитогенетичен риск, свързан с t(9;22) [3]. Наблюдаваната честота на t(9;22) при пациенти с ОЛЛ варира в широки граници и корелира и с възрастовата структура на популацията, Френската хематологична цитогенетична група демонстрира честота от 29% при пациенти над 15 годишна възраст, с пик на честотата във възрастовата група 40 до 50 годишни [9]. Същевременно някои от колективите цитират данни от проследявани пациентски групи, за които честотата на транслокацията е била 19,26% или дори 3% [1, 5]. Резултатите от терапията при рецидив на ОЛЛ са също незадоволителни, общ отговор от 41% и пълна ремисия от 31% при Т-ОЛЛ/ЛБЛ за Неларабина [10], 41% постигане на пълна ремисия за усиления HyperCVAD [11]. Предвид известната противоречивост в международните резултати и водени от липсата на богати данни за българска популация, ние поставихме за цел на нашето проучване да оценим резултатите от провежданата терапия по актуалните протоколи за ОЛЛ при възрастни пациенти в България, да оценим значимостта на рисковите фактори в нашата популация от пациенти и на базата на получените стратегии да обобщим оптималното терапевтично поведение на първа и на втора линия чрез съпоставка на на-

блюдаваните показатели за обща преживяемост и за степен на отговор на терапията на първа и втора линия.

ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

Пациенти

В проучването са включени всички пациенти, които са били лекувани в НСБАЛХЗ за периода от 01.2008 до 05.2013 с диагнозата ОЛЛ, установена по критериите на СЗО с наличие на над 20% бластни клетки с морфология на лимфобласти в костния мозък, установени цитоморфологично и цитохимично или < 20% клетки с морфологията на лимфобласти, но при наличие на типичен ОЛЛ молекулярен или генетичен маркер [19]. По отношение на допускането на пациентите до проучването не са прилагани никакви изключващи критерии нито по възраст, нито по рискова група, нито по изходен пърформанс статус, нито по изходен коморбиден индекс. Минималният обем диагностичиращи и стратификационни изследвания включват костномозъчно цитологично изследване и/или хистологично такова, имунофенотипизация, цитогенетика и молекулярнобиологично изследване, ПКК с ДКК.

Използвани терапевтични протоколи

Пациентите са получавали терапия на първа линия по протоколите GMALL 07/03 – 41 пациента, LALA 94 – 8 пациента, HyperCVAD – 4 пациента, GALGB 8811 – 5 пациента, BFM, ACVBP, GIMEMA, GRAALL – общо 7 пациента, на втора линия е работено по протокол GMALL 07/03 при 12 пациента, по протокол HyperCVAD – 17 пациента, и по BFM, Clofarabine ALL, Ida-Flag ALL, Nelarabine, - общо при 5 пациента. [2, 5, 6, 7, 12, 13, 14].

Рискова стратификация на пациентите

По-голямата част от съвременни протоколи за третиране на острата лимфобластна левкемия при възрастни пациенти използват рискова стратификация на болните за прецизиране и индивидуализиране на терапията. При стратифицирането според риска за целите на настоящето проучване сме използвали критериите на GMALL групата от нейното проучване 07/2003, които включват три рискови групи: Стандартен риск (SR) – В – прекурсорна ОЛЛ с постигане на пълна цитологична ремисия до 26 ден от протокола, инициален левкоцитен брой под $30 \times 10^9/L$, Тимусна Т-ОЛЛ, Висок риск (HR) – В-прекурсорна ОЛЛ с постигната ремисия на 46-ия ден от протокола или с инициален левкоцитен брой над $30 \times 10^9/L$, Про В-ОЛЛ, t(4;11), Прекурсорна или зряла Т-ОЛЛ, Много висок риск (VHR) – t(9;22).[15]. За целите на проучването

и за оценка на резултатите от терапията по възрастови групи пациентите са стратифицирани и по възрастови групи в три групи: 18-29, 30-59 и над 60 годишни.

Критерии за оценка на терапевтичния отговор

Използван е цитологичен критерий за пълна ремисия (CR) – Достигане на ниво на лимфобласти в костния мозък под 5% при нормоцелуларен костен мозък, неутрофили над $1.5 \times 10^9/L$, хемоглобин над 100 g/L и тромбоцити над $100 \times 10^9/L$ и пълното обратно развитие на екстрамедуларните туморни маси, ако такива са били налични при поставянето на диагнозата. За частичен отговор е приемана редукцията на процента лимфобласти в костния мозък с над 50% и ниво на бластите в костния мозък между 5 и 25%. [3, 6, 7, 10]

Статистически методи

За изпълнение на целите на проучването е използван информационния масив на болничната информационна система – БИС на НСБАЛХЗ. Чрез информацията за пациентите, попълвана в хода на всяка хоспитализация от лекуващите лекари, е създадена база данни, които са позволили статистическата оценка на изследваните величини. За статистическата оценка на базата данни е използван софтуерен продукт SPSS версия 18. Общата преживяемост е оценявана по метода на Каплън-Майер [16], а статистическата значимост е оценявана чрез лог ранк критерия. Пациентите, за които няма данни или които са изгубени за проследяването са цензурирани към последната си визита в болницата в статуса, в който са били към последната си визита в болницата.

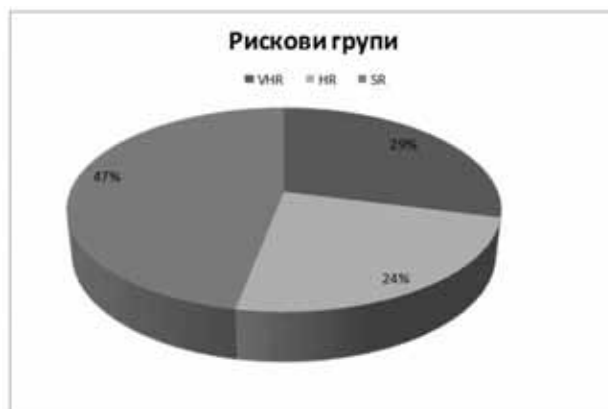
Резултати

Характеристика на пациентите

За периода на наблюдението са обхванати 65 пациента като най-младият е на възраст от 18 години, а най-възрастният на 81г, медианата на възрастта е 41,67 години. Разпределението по възрастови групи е както следва в първата група 18-29 годишни пациенти – 12 пациента, 30-59 годишни – 26 пациента и над 60 годишни – 27 пациента. Рисковата структура на пациентите е била както следва стандартен риск – 47%, висок риск – 24%, много висок риск – 29%. Схематично структурата на наблюдаваната популация е представена на таблица 1 и фигура 1.

Таблица 1. Структура на наблюдаваната пациентска популация

Пациенти	
Пол	
- мъже	38
- жени	27
Възраст	
-Медиана на възрастта	41,67
-Разпределение по възрастови групи	
-- 18 - 29 години	18,47% (12)
-- 30 - 59 години	41,54% (27)
-- над 60 години	40,00% (26)
Класификация по СЗО	
- B-ALL t(9;22)	26,15% (17)
- B-ALL t(1;19)	1,54% (1)
- B-ALL Неуточнена по друг начин	46,15% (30)
- B-ALL Хиперплоиден тип	1,54%(1)
- B-ALL Хипоплоиден тип	1,54%(1)
- B-ALL MLL пренареждане	1,54%(1)
- T-ALL	21,54%(14)
Общо B-ALL	79,46% (51)
Общо T-ALL	21,54%(14)



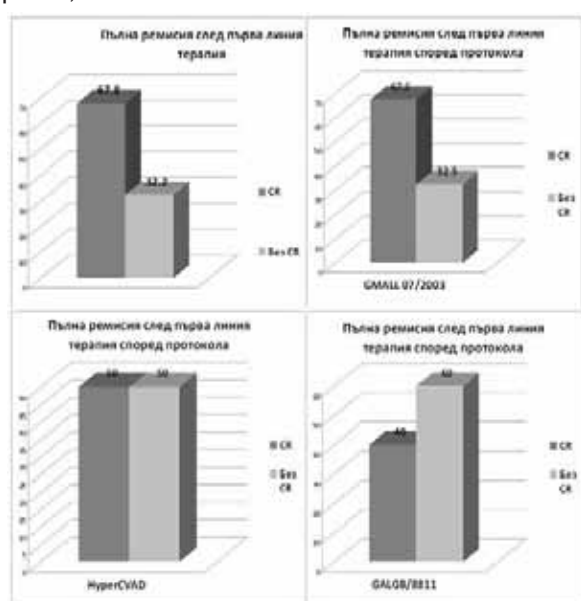
Фигура 1

Постигане на отговор на първа и на втора линия терапия

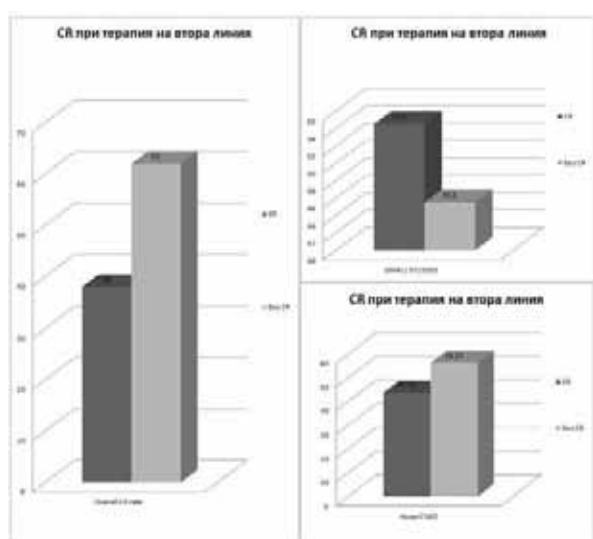
След първа линия терапия пълна цитологична ремисия е постигната при 67.8% от проследяваните болни. По отделни терапевтични режими при GMALL 07/2003 нивото на пълна ремисия е 67.5%, при GALGB/8811 е 40%, при HyperCVAD е 50% (фигура 2). След терапия на втора линия пълна ремисия е постигната при 38% от проследяваните пациенти, като GMALL 07/2003 е довел до 54,5% постигане на пълна ремисия, а HyperCVAD до 43,75% (фигура 3). Резултатите от GMALL 07/2003 на втора линия са най-добри след пълна ремисия, продължила повече от 6 месеца, постигната

при терапия на първа линия, включително и при лечение на първа линия по протокол GMALL 07/2003, като всички наблюдавани 7 пациента в тази подгрупа са постигнали отговор. Измежду 5-те пациента, които са имали пълна ремисия по-кратка от 6 месеца, нито един не е постигнал терапевтичен отговор, докато HyperCVAD демонстрира по-добри резултати в подгрупата пациенти, при които терапията на първа линия е била по GMALL 07/2003 или друг педиатрично вдъхновен протокол и не е била постигната ремисия или пък е настъпил рецидив след по-малко от 6 месеца.

По възрастови групи в ниската възрастова група (18—29 години) се наблюдава постигане на пълна ремисия в 81,8% от пациентите, в средната възрастова група (30—59 години) при 70,8%, а при най-високата възрастова група (над 60 години) при 64,3%.



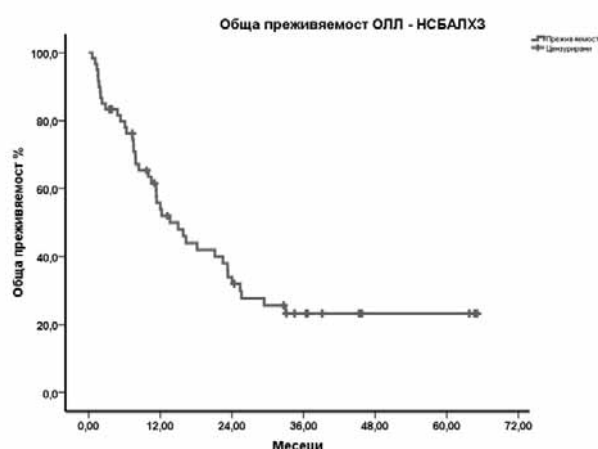
Фигура 2 – Постигане на пълна ремисия след първа линия терапия



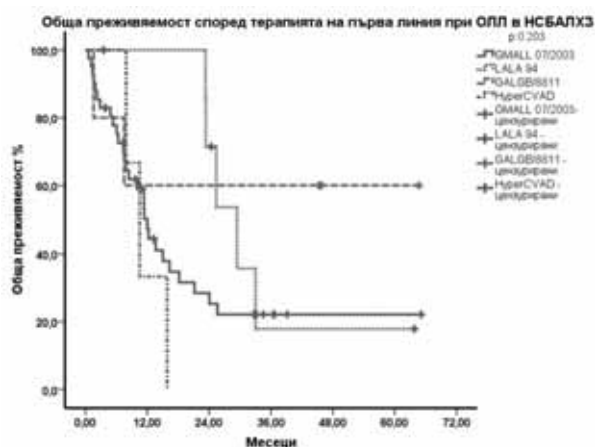
Фигура 3 – Постигане на терапевтичен отговор след втора линия терапия

Обща преживяемост и преживяемост свободна от прогресия

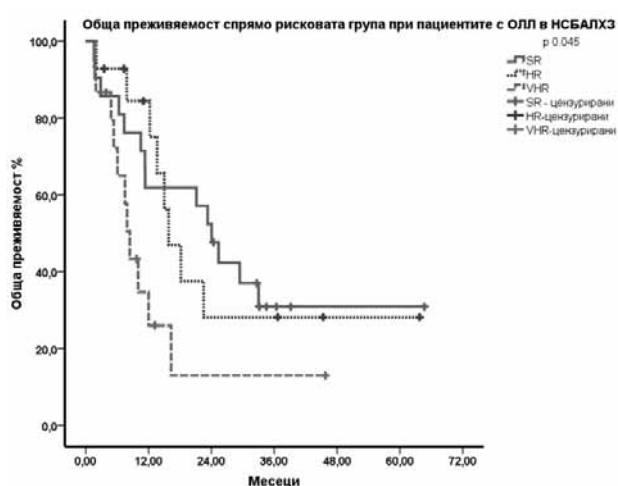
Общата 5-годишна преживяемост за цялата пациентска група е 23%, като се наблюдава плато на преживяемостта още на третата година (фигура 4). Преживяемостта свободна от заболяване е 23% на 3-тата година като медианата на преживяемостта свободна от прогресия е 9,93 месеца (фигура 4). Резултатите за 5 годишна преживяемост спрямо първа линия терапия GMALL 07/2003, LALA 94, GALGB/8811, HyperCVAD са както следва: 22,1%, 17,9%, 60%, 0%. Разликите между протоколите не достигат обаче ниво на статистическа значимост при коефициент на статистическа значимост $p=0.437$ (фигура 6). 5-годишната преживяемост по групи, спрямо изходната степен на риск на заболяването е 13% за групата с много висок риск, 28,1% за групата във висок риск, 30,1% за групата със стандартен риск, разликата между групите е статистически значима при $p=0.045$ (фигура 7). 5-годишната преживяемост при различните възрастови групи достига нива от 35.3% за ниската възрастова група (18—29 години), 17% за средната възрастова група (30—59 години), 15,7% за високата възрастова група (над 60 години), като разликата при съпоставката на високата и ниската възрастова група е статистически значима при $p=0.011$ (фигура 8).



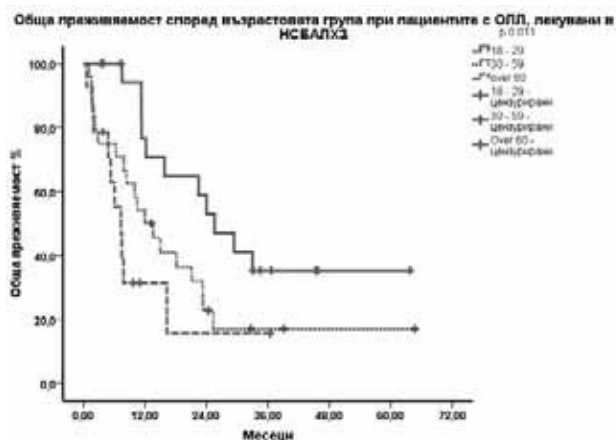
Фигура 4 – Обща преживяемост при пациентите с ОЛЛ



Фигура 6 – Обща преживяемост спрямо първа линия терапия – разликите не достигат статистическа значимост $p = 0.203$



Фигура 7 Преживяемост според рисковата група



Фигура 8 Преживяемост според възрастовата група

Обсъждане

На пръв поглед правят впечатление по-ниските стойности на постигане на пълна ремисия при първа линия терапия и по-лошата обща преживяемост, при внимателно разглеждане обаче прави впечатление и изключително

неблагоприятната възрастова структура и значително по-високата медиана на възрастта на наблюдаваната популация, спрямо цитираните в западните наблюдения, като възрастта е оценявана от повечето автори, като силно влияещ върху преживяемостта фактор. Значително впечатление прави и крайно неблагоприятната рискова структура на популацията с много висок дял на $t(9; 22)$. Неблагоприятна структура на наблюдаваната пациентска популация по възраст и рискова стратификация обуславя резултатите по отношение на отговор и преживяемост сред популацията и поставя въпроса за адекватно таргетиране на високо рисковите групи пациенти с ОЛЛ сред българската популация.

На базата на анализирания резултат върху неголямата популация от пациенти не се очертава категорично преимущество в постигнатите резултати за някои от педиатричните протоколи. Препоръчаната терапия при възрастни пациенти над 60 години често е най-добра поддържаща грижа [17]. Наблюденията върху тази възрастова група при приложение на интензивните индукционни протоколи са силно ограничени и често върху много малки популационни групи. Нашите данни демонстрират наличието на терапевтични ползи по отношение на обща преживяемост при активното третиране на тези пациенти.

При терапията на втора линия с водещо значение в нашия център се очертават протоколите GMALL 07/2003 и HyperCVAD. Сравнително ниските резултати при постигане на отговор на втора линия терапия, високите нива на рецидив дори и в групите със стандартен риск, особено при тези със средно или високо ниво на МРБ [18], както и липсата на статистически значима разлика по отношение на постигането на втора ремисия, в зависимост от степента на риск ($p=0.545$), очертават насоката към алогенна трансплантационна програма за почти всички пациенти с остра лимфобластна левкемия в първа ремисия, чийто статус позволява такова лечение и които имат подходящ донор.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Lazarus H., Franklin I, Litzow M. et al Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALLXII/ECOG E2993 Blood 2005 106: 3760-3767
2. Gökbüget N, Hoelzer D, Arnold R et al. Treatment of Adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL). Hematol Oncol Clin North Am. 2000 Dec;14(6):1307-25
3. Dombret H, Gabert J, Boiron J-M, et al. Outcome of treatment in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia—results of the prospective multicenter LALA-94 trial. Blood 2002 100:

2357-2366

4. European Leukemia Net. European Leukemia Trial Registry - Trial: ALL GMALL 07/2003. Available at: http://www.leukemia-net.org/trial/download/public/ALL_GMALL07-03_ShortProtEN.pdf?id=489. Accessed September 28, 2006.
5. Boissel N, Auclerc M, Lhéritier V et al., Should Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Be Treated as Old Children or Young Adults? Comparison of the French FRALLE-93 and LALA-94 Trials Journal of Clinical Oncology, Vol 21, No 5 (March 1), 2003: pp 774-780
6. Larson R, Dodge R, Burns C, A Five-Drug Remission Induction Regimen With Intensive Consolidation for Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 8811 Blood 1995 85:2025-2037
7. Kantarjian H, O'Brien S, Smith T, Results of Treatment With Hyper-CVAD, a Dose-Intensive Regimen, in Adult Acute Lymphocytic Leukemia J Clin Oncol 18:547-561
8. Gökbuğet N, Hoelzer D Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2006:133-41.
9. Groupe Français de Cytothétique Hematologique Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: Correlations with Hematologic Findings and Outcome. A Collaborative Study of the Groupe Français de Cytothétique Hematologique Blood 1996 87: 3135-3142
10. DeAngelo D, Yu D, Johnson J, et al Nelarabine induces complete remissions in adults with relapsed or refractory T-lineage acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma: Cancer and Leukemia Group B study 19801 Blood 2007 109: 5136-5142
11. Faderl S, Thomas DA, O'Brien S et al Augmented hyper-CVAD based on dose-intensified vincristine, dexamethasone, and asparaginase in adult acute lymphoblastic leukemia salvage therapy. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011 Feb;11(1):54-9.
12. Thomas X, Boiron J, Huguet F et al., Outcome of Treatment in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia: Analysis of the LALA-94 Trial
13. Annino L, Vegna M, Camera A et al., Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): long-term follow-up of the GIMEMAALL 0288 randomized study Blood 2002 99: 863-871
14. Hijiya N, Thomson B, Isakoff M et al., Phase 2 trial of clofarabine in combination with etoposide and cyclophosphamide in pediatric patients with refractory or relapsed acute lymphoblastic leukemia Blood 2011 118: 6043-6049
15. Gökbuğet N, Kneba M, Raff T et al, Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies Blood 2012 120: 1868-1876
16. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assn. 1958;53:457-481.
17. National comprehensive cancer network. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/all.pdf Clinical practice guidelines for Acute lymphoblastic leukemia
18. Raff T, Gökbuğet N, Lüschen S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials
19. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edition 2008

Адрес за кореспонденция:

С. Лозенов
Отделение по клинична хематология
НСБАЛХЗ ЕАД,
София 1756
ул. "Пловдивско поле" № 6
e-mail: dr_lozenov@abv.bg

ВЪЗМОЖНОСТИ НА ^{99m}Tc MIBI И БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИН ПРИ СТАДИРАНЕ И ОТЧИТАНЕ ЕФЕКТА ОТ ТЕРАПИЯТА ПРИ ПАЦИЕНТИ С НЕХОДЖКИНОВИ ЛИМФОМИ

Д. Василева*, С. Сергиева **

* Лаборатория „Нуклеарно-медицинска диагностика“, Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

** Отделение по нуклеарна медицина, Специализирана болница за активно лечение на онкологични заболявания, София

99mTc MIBI SCINTIGRAPHY AND BETA-2-MICROGLOBULIN IN STAGING AND THERAPY CONTROL IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMA

D. Vassileva*, S. Sergieva **

*Department of Nuclear Medicine, National Hospital of Active Treatment of Haematological Diseases, Sofia

**Department of Nuclear Medicine, Sofia Cancer Center

Резюме. При пациенти с малигнени лимфоми екзактното диагностициране и стадиране е важно за лечението и прогнозата на тези заболявания. Приложеният ^{99m}Tc MIBI като радиомаркер за изследване на миокардна перфузия, по-късно намира широко приложение като туморотропен агент. Серумните нива на бета-2-микроглобулин са от значение за доказване на туморната регресия или прогресия на заболяването. Цел на настоящето проучване е да представи възможностите на сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI, определянето на бета-2-микроглобулин в серума и корелацията между тях при диагностициране, стадиране и терапевтичен контрол на пациенти с лимфоми.

Материал и методи: Изследвани бяха 105 болни с неходжкинови лимфоми. Планарни и SPECT, а при необходимост и последващи SPECT/CT изследвания бяха проведени 30 минути и 3 часа след венозно инжектиране на 555-740 MBq ^{99m}Tc MIBI. Серумните нива на бета-2-микроглобулин бяха определени с помощта на радиоимунологичен анализ.

Резултати: При 57 пациенти с НХЛ в начален стадий на заболяването бяха визуализирани 79 позитивни лезии, от тях - 62 с нодална и 17 с екстранодална локализация. Повишено натрупване на радиомаркера в лимфните възли бе регистрирано в областта на шията, аксилите, медиастинума и ингвинално. Екстранодално натрупване на радиомаркера бе отбелязано в белите дробове и костите. При пациенти с активност на заболяването, бе отчетена сигнификантна корелация между позитивните ^{99m}Tc MIBI сцинтиграфии и повишените нива на бета-2-микроглобулин. При 36 пациенти след проведена терапия сцинтиграфските изследвания бяха негативни, при 12 болни сцинтиграфиите бяха позитивни.

Заклучение: Резултатите показват перспективността на ^{99m}Tc MIBI сцинтиграфията като неинвазивен и чувствителен метод при диагностициране, стадиране и терапевтичен контрол при пациенти с неходжкинови лимфоми. Сцинтиграфските данни показват добра корелация със стойностите на бета-2-микроглобулин в серума.

Ключови думи: неходжкинови лимфоми, диагностика и терапевтичен контрол, сцинтиграфия с ^{99m}Tc MIBI, бета-2-микроглобулин в серума

Summary. In patients with malignant lymphomas exact diagnosis and staging is important for the treatment and prognosis of the disease. ^{99m}Tc MIBI is currently use to study myocardial perfusion, but also been reported to localize various types of malignant tumours. Serum beta-2-microglobulin have recently been used to detect tumour regression and progression of the disease. The aim of the study was to assess the clinical value of ^{99m}Tc MIBI scintigraphy and serum beta-2-microglobulin and the correlation between them for diagnosis, staging and therapy control of patients with lymphomas.

Material and methods: 105 patients with non-Hodgkin's lymphoma were investigated. Planar images and SPECT with additional SPECT/CT studies if it was necessary were performed 30 minutes and 3 hours after i.v. injection of

555-740 MBq 99mTc MIBI. Serum beta-2-microglobulin levels were measured by radioimmunoassay using the Immunotech international microtest.

Results: In 57 patients with non-Hodgkin's lymphoma were identified 79 positive lesions, 62 of them were with nodal and 17 with extranodal localization. Increased uptake of the radiotracer was demonstrated in cervical, axillary, mediastinal and inguinal lymph nodes. Extranodal uptake of the radiotracer was seen in lungs and bones. Significant correlation was found in patients with true positive 99mTc MIBI scintigraphy and the higher serum beta-2-microglobulin levels in patients with advanced disease. In 36 patients were obtained a true negative scintigraphy and in 12 patients – positive scintigraphy after treatment.

Conclusion: The results suggested that the scintigraphy with 99m Tc MIBI represents as non-invasive and sensitive imaging method in the diagnosis, staging and therapy control of patients with non- Hodgkin's lymphoma. The positive scintigraphy shows a good correlation with the data of serum beta-2-microglobulin.

Key words: non- Hodgkin's lymphoma, diagnosis and therapy control, scintigraphy with 99m Tc MIBI, serum beta-2-microglobulin

Въведение

При пациенти с неходжкинови лимфоми екзактната диагноза и стадиране са изключително важни за лечението и прогнозата на тези заболявания. Клиничните, лабораторни и рентгенологични признаци често се позитивират, когато заболяването е напреднало значително.

В последните години радионуклидните методи на изследване завоюват значително място в стадирането и рестадирането на малигнените лимфоми. Големите възможности на тези методи в нуклеарната медицина са тясно свързани с непрекъснато въвеждане на нова съвременна апаратура, приложение на нови радиофармацевтици и внедряване на модерни информационни системи при обработка и систематизиране на данните. Предимствата на радионуклидните методи са свързани с възможността им за отличаване на активната от фиброзна тъкан; при използване на SPECT и SPECT/CT, за определяне точната локализация на туморния процес и за определяне степента на натрупване на радиомаркера в туморната тъкан. 99m Tc MIBI е радиофармацевтик, въведен за изследване на миокардна перфузия (1). Наскоро след това започва приложението му при изследване на болни с карциноми – на тиреоидеята, паращитовидните жлези, мозъка (2,9,12). 99m Tc MIBI е катионен комплекс, чиято степен на дифузия в клетката е в зависимост от липофилната му природа и от електропотенциала на клетъчната мембрана. 90% от радиофармацевтика се включва в митохондриите. Разликата в електрозарядите, от една страна – положителният на катионния комплекс 99m Tc MIBI и от друга – електроотрицателният на митохондриалната мембрана, опосредстват включването на радиомаркера в клетката. Натрупването на 99m Tc MIBI в туморните клетки е свързано със силно негативните мембранни потенциали, в резултат на повишения клетъчен

метаболизъм (2).

Бета-2-микроглобулин ($\beta_2\text{M}$) е нискомолекулярен протеин, прилаган като основен туморен маркер при лимфопрлиферативни процеси.

Понастоящем изнесените данни относно приложението на сцинтиграфията с 99m Tc MIBI, както и връзката между данните от сцинтиграфските изследвания и стойностите на $\beta_2\text{M}$ при пациенти с неходжкинови лимфоми (НХЛ) са оскъдни.

Цел

Цел на настоящето проучване е да установи диагностичните възможности на сцинтиграфията с 99m Tc MIBI и бета-2-микроглобулин в серума при диагностика, стадиране и проследяване ефекта от проведената терапия при болни с неходжкинови лимфоми.

Материал и методи

Сцинтиграфски изследвания с 99m Tc MIBI и бета-2-микроглобулин бяха проведени при 105 болни с неходжкинови лимфоми. От тях – 71 мъже и 34 жени, на възраст от 18 до 82 години.

Изследването бе проведено на 30 минута и 3-ти час след венозно инжектиране на 555 -740 MBq 99m Tc MIBI. Планарни и томографски изображения бяха получени на ротационна гама камера Diacam (Siemens), снабдена с нискоенергиен колimator с висока разделителна способност. При необходимост, при част от изследваните болни бяха проведени SPECT/CT изследвания с 99m Tc MIBI на SPECT/CT камера, Siemens, Symbia T2, комплектована с нискодозов CT (130 KeV, 30 mA), с оглед уточняване на трудно доказващи се лезии при планарни изследвания.

Сцинтиграфските резултати бяха сравнени с данните от други конвенционални образни методи – компютърномографски, рентгенологични и ехографски. Данните от сцинтиграфските изследвания бяха верифицирани морфологично

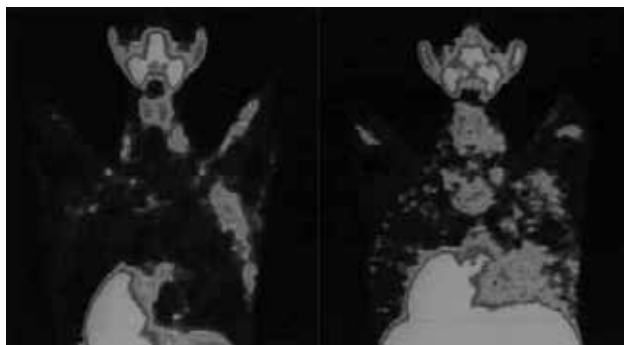
– миелограма, трепанобиопсия и биопсия на лимфни възли или засегнати органи от лимфомния процес. В съображение идват и данните от клиничното проследяване – анамнеза и статус. С оглед определяне активността на процеса бяха проследявани промените в показателите на периферната кръв и някои важни биохимични параметри на кръвта.

Серумните нива на бета-2-микроглобулин бяха определени чрез радиоимунологичен анализ. За статистическа обработка на данните от бета-2-M е приложен вариационен анализ.

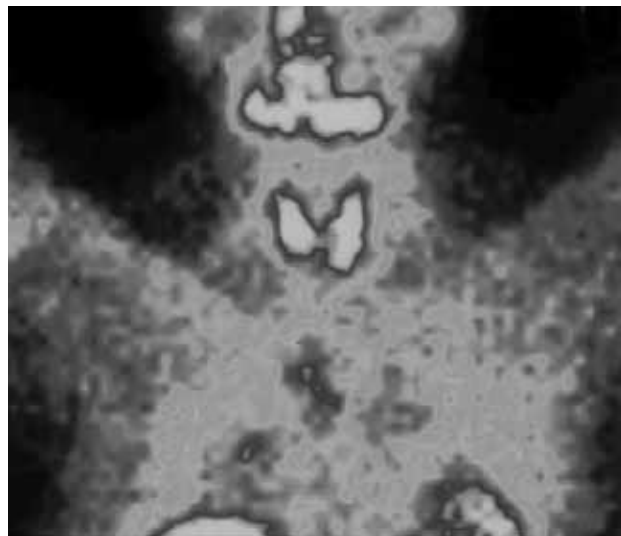
Резултати

При болни с НХЛ след провеждане на сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc MIBI бяха установени огнищни промени, свързани с основния процес. При изследваните от нас пациенти се визуализираха както туморно-ангажирани лимфни възли, така и екстранодално разположени туморни инфилтрати.

При пациенти с НХЛ в начален стадий на заболяването бяха проведени сцинтиграфии с ^{99m}Tc MIBI при 57 болни. При 53 от тях се визуализираха 79 истински позитивни лезии. От тях 62 бяха с нодална локализация – 17-шийно, 7-аксиларно, 10- в областта на хилусите, 22 - медиастинално и 6- ингвинално. 17 от лезиите бяха с екстранодална локализация – бели дробове и кости.



Фиг. 1. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc MIBI при пациент с НХЛ – повишено натрупване на радиомаркера в лимфни възли в областта на медиастинума, дясната аксила и шийно в дясно.



Фиг. 2. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc MIBI при пациент с НХЛ – хиперфиксация на радиомаркера в областта на медиастинума и паренхима на десния бял дроб.

Сцинтиграфските резултати при изследваните болни с НХЛ корелират с тези от компютър-томографските и рентгенови изследвания. При изследваните пациенти бяха регистрирани отклонения в периферната кръв, както и на някои биохимични показатели – фибриноген, ЛДХ, серумно желязо. Средните стойности на $\beta 2\text{M}$ бяха $4,70 \pm 0,52$.

При изследваните болни с НХЛ диагнозата бе потвърдена морфологично след биопсия, миелограма и трепанобиопсия.

При двама пациенти с НХЛ с анемия и тромбопения, сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI показва патологично натрупване на радиомаркера в плоски кости, свързано с костномозъчното ангажиране от туморния процес. Морфологичните изследвания доказаха инфилтрация на костния мозък от малигнените клетки, в потвърждение на сцинтиграфските данни.

При трима пациенти негативните сцинтиграфски резултати бяха отчетени като фалшиво негативни при данни за активност на заболяването, позитивна компютър-томографска находка за увеличени параортални и ретроперитонеални лимфни възли и повишени стойности на бета-2-микроглобулин.

При един пациент позитивната находка от сцинтиграфското изследване с ^{99m}Tc MIBI не бе потвърдена при биопсия и лезията бе отчетена като фалшиво позитивна.

При 48 пациенти с НХЛ са проведени контролни сцинтиграфски изследвания след приключване на терапията. Истински негативни бяха резултатите при 36 болни, при които $\beta 2\text{M}$ и другите биохимични показатели бяха в стойности, близки до нормата. При 12 пациенти с НХЛ след преминаване на стандартните курсове на лечение, при сцинти-

графските изследвания бяха регистрирани 18 истински позитивни лезии, израз на непълен терапевтичен отговор. 11 от тях бяха с нодална и 7 с екстранодална локализация. При тези болни бяха налице данни за активност на процеса – позитивни компютъртомографски находки, отклонения в биохимичните показатели и тези на периферната кръв. Средната стойност на $\beta 2M$ бе $4,40 \pm 0,70$.

Обсъждане

Сцинтиграфските изследвания с ^{99m}Tc MIBI при НХЛ, както в нашите изследвания, така и на други автори, показваха възможността да се визуализират, както туморно-ангажирани лимфни възли, така и екстранодално разположени туморни инфилтрати (3,5,10).

Имайки предвид физиологичното натрупване на радиомаркера в коремните органи, в повечето случаи е трудно разграничаването на патологичните нодални и екстранодални лезии в корема, поради което някои автори препоръчват скениране в първите минути след инжектиране на радиофармацевтика (4). Dobrovolskiene посочва в своите изследвания, че точността на сцинтиграфските изследвания са в зависимост и от големината на туморната лезия (5).

С напредване на болестния процес при някои пациенти туморните клетки инфилтрират костния мозък. Възможностите на сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI при визуализиране на костномозъчното ангажиране от лимфомния процес са посочени, както при нашето проучване, така и от Moon и съавт. (7). Получените данни от проведените изследвания биха били от полза при определяне подходящо място за биопсия, с оглед морфологична преценка.

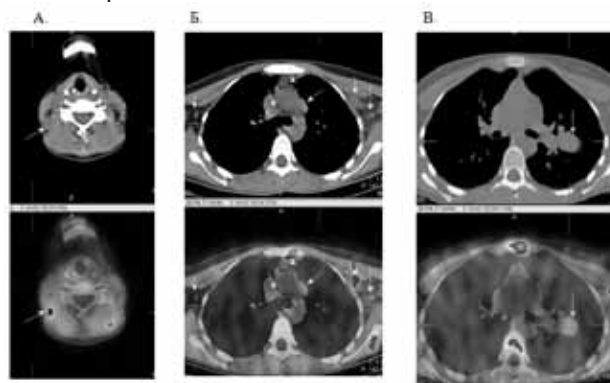
Фалшиво негативните резултати в нашето проучване са свързани с лезии, разположени под диафрагмата, във връзка с физиологичното разпределение на радиомаркера в черен дроб, далак, черва. Това налага изследването да се прилага при доказване на патологични огнища на натрупване на радиомаркера основно над диафрагмата.

Данните относно диагностичните туморотропни възможности на сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI при изследваните от нас пациенти с НХЛ са близки по стойности и на други автори (8,10).

Проведените сцинтиграфски изследвания в динамика, в началото и след преклещване на стандартните курсове на лечение, дава възможност за отчитане ефекта от терапията при НХЛ. Израз на пълен терапевтичен отговор са истински негативните сцинтиграфски резултати, показани както в нашите изследвания, така и на други автори (6,9,11). Независимо от проведено-

то лечение при част от болните сцинтиграфските образи бяха позитивни в потвърждение на активност на процеса, налагащо продължение на цитостатичната терапия.

Допълнителните SPECT/CT изследвания, проведени при част от болните, показваха точната топография на огнищата с абнормно натрупване на въведения радиофармацевтик. Това е особено приложимо при болни с екстензия на заболяването под диафрагмата, където е необходимо разграничаване на зоните с физиологична активност от тези с патологична фиксация на радиомаркера. SPECT/CT намира приложение при изследване на процесите в обемни структури на човешкото тяло, каквито са например гръдния кош и корема. КТ образите дават възможност за определяне обема и локализацията на мекотъканните формации, което в съчетание със SPECT образите, позволява отдиференциране на фиброзната от резидуална туморна тъкан, което при лимфопролиферативните заболявания е от особено значение след провеждане на лъче/химиотерапия.



Фиг. 3. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc MIBI, с последващо SPECT/CT изследване при пациент с НХЛ - повишено натрупване на радиофармацевтика в областта на латероцервикалните лимфни възли в ясно (3А), медиастиналните и двустранно аксиларните лимфни възли (3Б) и инфилтрация на десния бял дроб (3В).

Съпоставяйки данните от сцинтиграфските изследвания и стойностите на бета-2-микроглобулин в серума се явява еднопосочност в резултатите. Стойностите на бета-2-микроглобулин в серума корелират с клиничния стадий на заболяването. В начален стадий и рецидив се покачват, при ремисия стойностите са близки до нормата

Заклучение

Въз основа на данните от проведените изследвания, могат да се направят следните изводи:

Нуклеарно-медицинските методи, като чувствителни и неинвазивни методи дават възможност за визуализиране както на туморно-инфилтрирани лимфни възли, така и на

екстранодално разположени туморни инфилтрати при пациенти с НХЛ. Те играят важна роля при диагностициране, стадиране и отчитане ефекта от приложената терапия.

Диагностичната точност на SPECT изследванията се подобри в значителна степен от приложението на хибридните SPECT/CT методи. Чрез тях се повиши специфичността на скинтиграфските образи чрез редуциране на фалшиво позитивните резултати.

Стойностите на бета-2-микроглобулин в серума са в корелация с данните от скинтиграфските изследвания. Проследяването на стойностите на бета-2-микроглобулин в динамика по време на ремисия дава възможност за ранно откриване на рецидива.

Комплексният подход, приложен при проведените от нас изследвания, а именно определяне на бета-2-микроглобулин едновременно със скинтиграфското изследване, дава възможност за по-точна интерпретация на резултатите от ^{99m}Tc MIBI скинтиграфията.

lymphoma. Clin. Nucl. Med, 28,2003,6,457-462.

12. Taher, MA., V. WArbey, JR. Buscombe. Differential uptake of Technetium-99m Metoxy-isobutyl-isonitrile in follicular lymphoma and parathyroid adenoma. J HK Coll Radiol, 9,2006,4, 33-35.

Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р Д. Василева, дм
Лаборатория „Нуклеарно-медицинска
диагностика“,
Специализирана болница за активно лечение
на хематологични заболявания,
ул. Пловдивско поле №6
1756 София
Служ. тел. 02/9701 102
GSM – 0879 104 904
e-mail: vassileva@excite.com

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Alexanderson, E. et al. Using Technetium-99m –Sestamibi SPECT myocardial perfusion imaging in patients with complete left bundle branch block. Arch Med Res. 35,2004,3,150-156.
2. Barbet J. et al. Which radionuclides will nuclear oncology need tomorrow. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 33,2006,6, 1, 632-639.
3. Barbieri E. et al. Primary non-Hodgkins lymphoma of the bone treatment and analysis of prognostic factors for stage I and stage II. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 59,2004,3,760-764.
4. Butkeviciene, L. et al. Diagnosis of malignant lymphoma of the stomach. Medicina (Kaunas), 38,2002,2,172-175.
5. Dobrovolskiene, L., J. Balukeviciute, J. Maksimaitiene. Radiographic diagnosis of gastrointestinal lymphoma. Medicina (Kaunas), 38,2002,2,165-171.
6. Lasarowski, A., et al. 99m Technetium – SESTAMIBI uptake in malignant lymphomas. Correlation with chemotherapy response. Lymphatic research and Biology, 4,2006,1,23-28.
7. Moon, SH., SW. Oh, JC. Paeng. Diffuse bone marrow uptake of ^{99m}Tc- MIBI in a case of intravascular large B-cell lymphoma. Nucl Med Mol Imaging, 43, 2009,4,352-356.
8. Ohta, M. et al. Clinical role of Tc-99m MIBI scintigraphy in non-Hodgkin's lymphoma. Oncol Rep 23, 2001,8,841-845.
9. Rankin SC. Assessment of response to therapy using conventional imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 30,2003,suppl 1, 54-63.
10. Solano Bravo et al. Value of scintigraphy with ^{99m}Tc-MIBI in the diagnosis and follow up of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. Rev. Esp. Med. Nucl, 19,200,2,85-91.
11. Song, HC. et al. Double – phase Tc-99m MIBI scintigraphy as a therapeutic predictor in patients with non-Hodgkin's

99m Tc MIBI СЦИНТИГРАФИЯ И БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИН ПРИ ПАЦИЕНТИ С БОЛЕСТТА НА ХОДЖКИН

Д. Василева*, С. Сергиева **

* Лаборатория „Нуклеарно-медицинска диагностика“, Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

** Отделение по нуклеарна медицина, Специализирана болница за активно лечение на онкологични заболявания, София

99m Tc MIBI SCINTIGRAPHY AND SERUM BETA-2-MICROGLOBULIN IN PATIENTS WITH HODGKIN'S DISEASE

D. Vassileva*, S. Sergieva **

*Department of Nuclear Medicine, National Hospital of Active Treatment of Haematological Diseases, Sofia

**Department of Nuclear Medicine, Sofia Cancer Center

Резюме. При болни с болестта на Ходжкин екзактното диагностициране и стадиране е важно за терапията и прогнозата на заболяването. 99m Tc MIBI, приложен за изследване в началото за сърдечна перфузия, намира по – късно приложение при визуализиране на различни тумори. Серумните нива на бета-2-микроглобулин се определят за доказване регресията или прогресията на заболяването. Цел на настоящето проучване е да представи възможностите на сцинтиграфията с 99m Tc MIBI, определяне нивото на бета-2-микроглобулин в серума и корелацията между тях при диагностициране и проследяване ефекта от терапията при пациенти с болестта на Ходжкин. Материал и методи: Изследвани бяха 182 болни с болестта на Ходжкин. Планарни, а при необходимост и последващи SPECT изследвания бяха проведени 30 минути и 3 часа след венозно инжектиране на 555-740 MBq 99m Tc MIBI. Серумните нива на бета-2-микроглобулин бяха определени с помощта на радиоимунологичен анализ.

Резултати: При 101 пациенти в начален стадий с БХ бяха визуализирани 119 лезии, от тях- 85 с нодална и 34 с екстранодална локализация. Повишено натрупване на радиомаркера в лимфните възли бе регистрирано в областта на шията, аксилите, медиастинума и ингвинално. Екстранодално натрупване на радиомаркера бе отбелязано в белите дробове, щитовидната жлеза, млечната жлеза и костите. При пациенти с активност на заболяването, бе отчетена сигнификантна корелация между позитивните 99m Tc MIBI сцинтиграфии и повишените нива на бета-2-микроглобулин. При 79 пациенти след проведена терапия сцинтиграфските изследвания бяха негативни при 67 пациенти и позитивни при 11 болни.

Заклучение: Резултатите показват перспективността на 99m Tc MIBI сцинтиграфията като неинвазивен и чувствителен метод при диагностициране, стадиране и терапевтичен контрол при пациенти с болестта на Ходжкин. Сцинтиграфските данни показват добра корелация със стойностите на бета-2-микроглобулин в серума.

Ключови думи: Болест на Ходжкин, диагностика и терапевтичен контрол, сцинтиграфия с 99m Tc MIBI, бета-2-микроглобулин в серума

Summary. In patients with Hodgkin's disease exact diagnosis and staging is very important for the treatment and prognosis of these patients. 99m Tc MIBI is currently used to study myocardial perfusion, but also been reported to be localized in various types of malignant tumours. Serum beta-2-microglobulin have recently been used to detect tumour regression and progression in malignant lymphomas. The aim of the study was to assess the clinical value of 99m Tc MIBI scintigraphy and serum level of beta-2-microglobulin and correlation between them for diagnosis and therapy control of patients with Hodgkin's disease. Material and methods: 182 patients with Hodgkin's disease were investigated. Planar images and SPECT studies if it was necessary were performed 30 minutes and 3 hours after i.v. injection of 555-740 MBq 99mTc MIBI. Serum beta-2-microglobulin levels were measured by radioimmunoassay using the Immunotech international microtest.

Results: In 101 patients with Hodgkin's disease were identified 119 lesions - 85 of them were with nodal and 34

with extranodal localization. Increased uptake of the radiotracer was demonstrated in cervical, axillary, mediastinal and inguinal lymph nodes. Extranodal uptake of the radiotracer was seen in lungs, thyroid gland, breasts and bones. Significant correlation was found in patients with true positive 99mTc MIBI scintigraphy and the higher serum beta-2-microglobulin levels in patients with advanced disease. In 79 patients after treatment were obtained 67 true negative and 11 positive scintigraphy.

Conclusion: The scintigraphy with 99mTc MIBI represents a useful imaging method in the staging and therapy control of patients with Hodgkin's disease. The positive scintigraphy shows a good correlation with the data of the serum beta-2-microglobulin levels.

Key words: Hodgkin's disease diagnosis and therapy control, scintigraphy with 99m Tc MIBI, serum beta-2-microglobulin

Въведение

Прогнозата на пациенти с малигнени лимфоми в последните години значително се подобри, което се дължи от една страна на подобрената и разширена диагностика и от друга на включването на нови лекарствени средства в терапевтичните схеми. Приложението на съвременни нуклеарно-медицински методи подпомогна диагностиката и стадирането, което е важно и критично при избор на успешна терапия при тези пациенти. Предимство на сцинтиграфските изследвания пред компютъртомографските и ядреномагнитни методи е възможността за оценка на функционалното състояние на изследваните органи и системи (1,13).

Натрупването на 99m Tc MIBI, използван като радиомаркер, в туморните клетки е свързано със силно негативните мембранни потенциали, в резултат на повишения клетъчен метаболизъм. Независимо от приложението напоследък на хибридните технологии в рутинната практика и понастоящем се прилага сцинтиграфията с 99m Tc MIBI, особено за наддиафрагмално разположени туморни формации. След проведена терапия при някои пациенти остава мекотъканна маса, която може да бъде остатъчен тумор или фибротична тъкан. Възможността за включване на радиомаркера в туморните клетки при сцинтиграфските изследвания, позволява разграничаването на активен процес от фиброза. При КТ изследване не може да се разграничат тези находки, а отдиференцирането им е важно и критично за по-нататъшното поведение при тези болни. Липсващото натрупване на радиомаркера във фибротичната тъкан при положителни компютъртомографски лезии го прави атрактивен тест при оценка ефекта от проведената терапия. Определянето на бета-2-микроглобулин в серума (β_2M), като туморен маркер е от значение, както при поставяне на диагнозата, така и проследяване на болни с БХ.

Понастоящем в литературата публикуваните резултати относно приложението на сцинтиграфията с 99m Tc MIBI са оскъдни и липсват данни за комплексно нуклеарно-медицинско и радиоимунологично изследване при пациенти с БХ.

Цел

Цел на настоящето проучване е представяне възможностите на сцинтиграфията с 99m Tc MIBI и определянето на бета-2-микроглобулин в серума при диагностициране и проследяване ефекта от проведената терапия при болни с болестта на Ходжкин.

Материали и методи

Сцинтиграфски изследвания с 99m Tc MIBI и серумно ниво на бета-2-микроглобулин бяха проведени при 182 болни с болест на Ходжкин. От тях - 104 мъже и 78 - жени, на възраст от 21 до 79 години. Стадирането на пациентите бе по приета международна класификация.

Сцинтиграфското изследване бе проведено след интравенозно инжектиране на 555-740 MBq 99m Tc MIBI. Радиофармацевтиктът започва бързо натрупване в патологичните зони минути след аплициране и оптималното време за скениране бе 30 минута и 3 час. Изследването бе проведено на ротационна гама камера Diascam (Siemens) в автоматичен режим на работа в предна и задна проекция. При диагностична необходимост бяха проведени и SPECT изследвания.

Сцинтиграфските резултати бяха сравнени с тези от други визуализиращи методи – компютъртомография, ехография, рентгенография и верифицирани морфологично-миелограма, трепанобиопсия и биопсия на лимфни възли или засегнати органи от лимфомния процес. С оглед определяне активността на процеса бяха проследявани промените в показателите на периферната кръв и някои важни биохимични параметри на кръвта.

Бета-2-микроглобулин е нискомолекулярен протеин, чиято серумна концентрация варира в зависимост от стадия на заболяването. Определянето на β_2M с помощта на имунорадиометричен кит е базирано на конкурентна реакция между маркирано моноклонално анти тяло в течна фаза и бета-2 поликлонално анти тяло, фиксирано върху стената на епруветката. Небелязаното анти тяло, фиксирано върху повърхността на епруветката се свързва с подлежащия на количествено

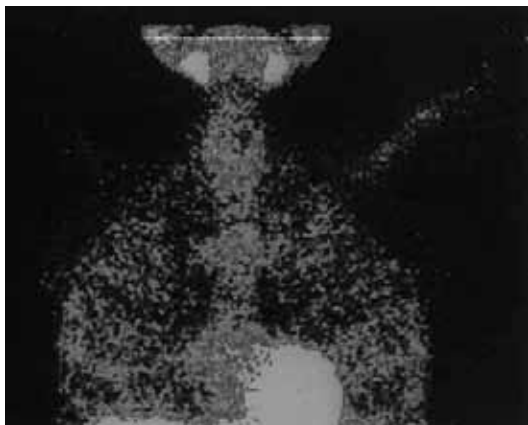
определяне антиген. Прибавеното в излишък анти тяло реагира със свързания антиген и се оказва свързан двустранно с антителата. Концентрацията на $\beta 2M$ е пропорционална на радиоактивността, отчетена в епруветката. Стойностите на $\beta 2M$, като индикатор на активност на заболяването, бяха проследявани в динамика – в началото, при поставяне на диагнозата по време на лечението и след приключването му. За статистическа обработка на данните от изследването на бета-2-микроглобулин бе приложен вариационен анализ.

Резултати

Нашите проучвания показаха, че сцинтиграфските изследвания дават възможност при БХ да се визуализират, както туморно-ангажирани лимфни възли, така и екстранодално разположени туморни инфилтрати.

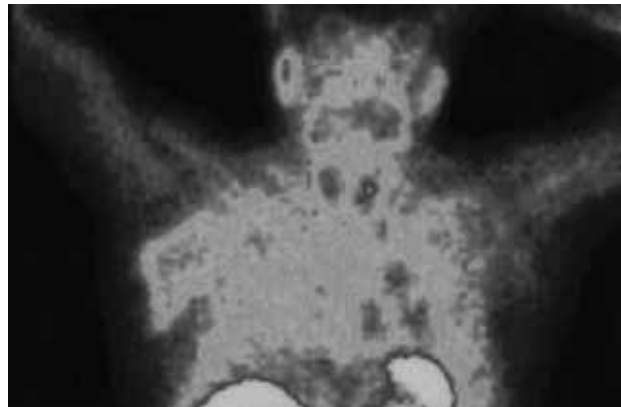
При лимфоми оптималното време за визуализиране на областите с висока активност, отговаряща на локализацията на лимфните възли и тъканите, инфилтрирани от основния процес, бе 30 минута и третия час след венозното инжектиране на радиофармацевтика

Сцинтиграфии с ^{99m}Tc MIBI бяха проведени при 103 болни с БХ в начален стадий на заболяването. Сцинтиграфските изследвания бяха позитивни при 101 болни с БХ, при които бяха визуализирани 119 истински позитивни лезии. От тях 85 бяха с нодална и 34 с екстранодална локализация. Повишена активност бе регистрирана в лимфни възли, разположени в областта на шия-17, аксил-6, медиастиnum-39, хилуси-15 и ингвинално-8.

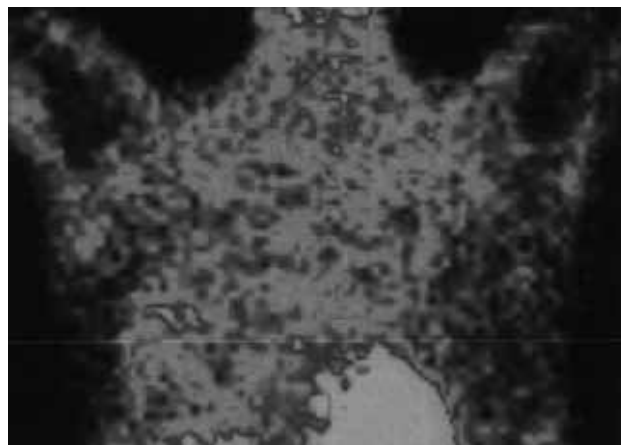


Фиг.1. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc MIBI при пациент с БХ – повишено натрупване на радиомаркера в областта на медиастиnumа

Екстранодално натрупване на радиофармацевтика бе отбелязано в 34 лезии, от тях в белите дробове - 29, тиреоидея -1 и кости -3 и млечна жлеза – 1.. Находките съответстват на данните от компютърнотомографските и рентгенови изследвания.



Фиг.2. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc MIBI при пациент с БХ – хиперфиксация на радиомаркера екстранодално в паренхима на лявия бял дроб и дясната аксила



Фиг.3. Сцинтиграфия с ^{99m}Tc MIBI при пациент с БХ - повишено натрупване на радиомаркера в областта на дясната млечна жлеза.

При изследваните пациенти бяха регистрирани повишени стойности на биохимичните показатели в кръвта – фибриноген, ЛДХ, алкална фосфатаза, както и промяна на показателите в периферната кръв- анемия, левкоцитоза и лимфопения, израз на активност на заболяването. Средната стойност на $\beta 2M$ бе $3,20 \pm 0,29$ mg/L (норма 1,00-2,40 mg/L). Допълнителни огнища на активност на заболяването, недоказани чрез конвенционалните визуализиращи методи, бяха открити при двама пациенти . При тези болни бе коригиран стадият на заболяването, както и съответната терапия.

При двама пациенти с клинични данни за активност, палпиращи се туморни формации в корема, доказани с други визуализиращи методи, сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI бе фалшиво негативна. Бета-2-микроглобулин в серума бе повишен – $3,00 \pm 0,18$ mg/L.

При 79 пациенти с БХ, преминали химио- и/или радиотерапия, бяха проведени сцинтиграфски изследвания. При 67 болни с пълен терапевтичен отговор, негативният резултат от сцинтиграфиите установи положителния ефект от проведената терапия. При тези пациенти бета-2-микроглобулин

и биохимичните показатели на кръвта бяха нормализирани.

Независимо от проведеното лечение при 11 пациенти с БХ при сцинтиграфското изследване бяха визуализирани 28 лезии. 19 от тях бяха с нодална и 9 с екстранодална локализация. При тези болни бяха налице данни за активност на процеса – повишени стойности на $\beta 2M$, отклонения в някои биохимични показатели на кръвта и позитивни компютъртомографски находки.

При един пациент с клинични и лабораторни данни за активност на процеса, неповлияващ се от цитостатичната терапия, сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI бе фалшиво негативна. Имайки предвид общия механизъм на включване на цитостатиците и на ^{99m}Tc MIBI в туморната клетка, негативните сцинтиграфски резултати бяха в корелация с проявената резистентност към проведената цитостатична терапия.

Обсъждане

Представените резултати са в съответствие с публикуваните данни и от други автори, което налага сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI като надежден метод при диагностициране и стадирание на пациенти с БХ (2,3,4).

Проведените от нас сцинтиграфски изследвания с ^{99m}Tc MIBI при БХ, и тези на други автори, дадоха възможност да се визуализират, както туморно-ангажирани лимфни възли, така и екстранодално разположени туморни инфилтрати (6,10,12). Независимо от приложението напоследък на хибридните технологии в рутинната практика и понастоящем се прилага сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI, особено за наддиафрагмално разположени туморни формации. Имайки предвид физиологичното натрупване на радиомаркера в нодални и екстранодални лезии в корема, визуализирането им изисква скениране в първите минути след инжектиране на радиофармацевтика (9). Dobrovolskiene посочва в своите изследвания, че точността на сцинтиграфските изследвания са във зависимост от големината на туморната лезия и вида използвана апаратура (4).

Фалшиво негативните резултати в нашето проучване са свързани с лезии, разположени под диафрагмата, във връзка с физиологичното разпределение на радиомаркера в черен дроб, далак, черва. Това налага изследването да се прилага при доказване на патологични огнища на натрупване на радиомаркера основно над диафрагмата.

Данните, относно диагностичните туморотропни възможности на сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI при изследваните от нас пациенти с БХ, са близки по стойности и на други автори (12).

Проведените сцинтиграфски изследвания в

динамика, в началото и след приключване на стандартните курсове на лечение, дава възможност за отчитане ефекта от проведената терапия при пациенти с БХ. Израз на пълен терапевтичен отговор са истински негативните сцинтиграфски резултати, показани както в нашите изследвания, така и на други автори (5,7,8). Независимо от проведеното лечение при част от болните остава мекотъканна маса, която може да бъде остатъчен тумор или фибротична тъкан. Данните от КТ изследвания не дават отговор за вида на тези лезии, с оглед преценка последващото терапевтично поведение при тези болни. Възможността за включване на радиомаркера в туморните клетки при сцинтиграфските изследвания позволява разграничаването на активен процес от фиброза. Позитивните сцинтиграфските образи бяха показателни за прогресия на болестния процес. Липсващото натрупване на радиомаркера във фибротичната тъкан при положителни компютъртомографски лезии го прави атрактивен тест при оценка ефекта от проведената терапия.

Както в нашето проучване, така и от други автори, фалшиво негативните сцинтиграфии при пациенти с клинични и лабораторни данни за активност на процеса, са свързани с еднаквото поведение на радиомаркера и цитостатиците при наличие на проявена лекарствена резистентност. Проучванията на редица автори (8,9,10) показват връзката между натрупването на радиомаркера ^{99m}Tc MIBI в клетката и степента на повърхностноклетъчната експресия на P-glycoprotein (Pgp), кодиран от MDR-1 гена, който функционира като АТФ зависима помпа за много цитостатични субстанции. Liang и съавт. имайки предвид резултатите от своите сцинтиграфски изследвания, прогнозираха ефекта от цитостатичната терапия (9,11). При новооткрити и нелекувани пациенти негативната ^{99m}Tc MIBI сцинтиграфия при началното изследване е индикатор за лош терапевтичен отговор. При тези болни изследването на Pgp е показало високи стойности. При пациенти с техническа невъзможност за изследване на Pgp, сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI е приложима като индиректен диагностичен тест за прогнозиране ефекта от лечението.

Заклучение

Въз основа на данните от проведените изследвания, могат да се направят следните изводи:

Нуклеарно-медицинските изследвания като чувствителни и неинвазивни методи дават възможност за визуализиране на туморно-инфилтрирани лимфни възли, на екстранодално

разположени туморни инфилтрати и за отдиференциране на активни туморни лезии от фиброза след проведено лечение при пациенти с БХ.

Сцинтиграфията с ^{99m}Tc MIBI показва възможността за оценка степента на изява на лекарствена резистентност при пациенти, неповлияващи се при цитостатична терапия.

При сцинтиграфските изследвания е налице възможността за доказване на туморни лезии, нерегистрирани при други образни изследвания. Стойностите на бета-2-микроглобулин в серума са в корелация с данните от сцинтиграфските изследвания, което дава възможност за точна интерпретация на резултатите от визуализиращите методи.

Проследяването на стойностите на бета-2-микроглобулин в динамика по време на ремисия дава възможност за ранно откриване на рецидива. Приложението на посочените нуклеарно-медицински методи на изследване при БХ са от значение както при диагностициране на болните в началото на заболяването, така и при отчитане ефекта от проведената терапия.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Barbet J. et al. Which radionuclides will nuclear oncology need tomorrow. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 33,2006,6, 1, 632-639.
2. Bierman, P.J. et al. The International prognostic factors project score for advanced Hodgkin's disease is useful for predicting outcome of autologous hematopoietic stem cell transplantation. Ann Oncol. 13,2002,9,1370-1377.
3. Ding HJ. et al. Uptake of ^{99m}Tc tetrofosmin in lymphoma cell lines: a comparative study with ^{99m}Tc sestamibi. Appl Radiat Isot, 56,2002,6,853-856.
4. Dobrovolskiene, L., N.Jurkiene. Scintigraphy of lymphomatous masses using ^{99m}Tc - MIBI. Medicina (Kau-nas), 38,2002,2,151-158.
5. Hoskin J. et al. Lymphoma: Diagnosis and management introduction. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 30,2003,suppl 1, 1-2.
6. Josting A. et al. New prognostic score based on treatment outcome of patients with relapsed Hodgkin's lymphoma registered in database of the German Hodgkin's lymphoma study group. J Clin Oncol. 20, 2002, 1, 221-230.
7. Kao CH. et al. Evaluation of chemotherapy response using technetium 99m sestamibi scintigraphy in untreated adult malignant lymphoma and comparison with other prognosis factors: a preliminary report. Int J Cancer, 95, 2001,4,228-231.
8. Lasarowski, A. et al. ^{99m}Tc Sestamibi uptake in malignant lymphomas. Correlation with chemotherapy response. Lymphatic research and Biology, 4,2006,1,23-28.
9. Liang, JA. et al. Prediction of chemotherapy response in untreated malignant lymphomas using Technetium- 99m

M scan: comparison with P-glycoprotein expression and other prognostic factors. A preliminary report. Jpn J Clin Oncol,32,2002,4,140-145.

10. Moretti ,JL. et al. To use MIBI or not to use MIBI? That is the question when assessing tumour cells. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 32,2005,7, 837-851.
11. Rankin SC. Assessment of response to therapy using conventional imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 30,2003,suppl 1, 54-63.
12. Solano Bravo et al. Value of scintigraphy with ^{99m}Tc -MIBI in the diagnosis and follow up of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. Rev.Esp.Med.Nucl, 19,200,2,85-91.
13. Tomura, N et al. Comparison of ^{201}Tl -chloride SPECT with ^{99m}Tc MIBI in the depiction of malignant head and neck tumours. Annals of nucl Med,20,2006,2,107-114.

Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р Д. Василева, дм

Лаборатория „Нуклеарно-медицинска диагностика”,

Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания,

ул. Пловдивско поле №6

1756 София

Служ. тел. 02/9701 102

GSM – 0879 104 904

e-mail: vassileva@excite.com

**МИГРАЦИОННИ И АНТИАПОПТОТИЧНИ МАРКЕРИ КАТО ВЪЗМОЖНИ
ПРОГНОСТИЧНИ ФАКТОРИ ПРИ ХРОНИЧНАТА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ**
***Р. Владимирова¹, Е. Викентиева¹, Д. Попова¹, Л. Митев¹, И. Николов², Р. Станчев², И. Дамянов²,
Т. Кънчева², Н. Петкова², К. Милчева², И. Гигов², Ю. Райнов²***

¹Лаборатория по цитогенетика и имунология; ²Клиника по Хематология;
Военномедицинска академия, София

**MIGRATION AND ANTIAPOPTOTIC MARKERS AS POTENTIAL PREDICTORS IN
CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA**

***R. Vladimirova¹, E. Vikentieva¹, D. Popova¹, L. Mitev¹, I. Nikolov², R. Stanchev², I. Damianov²,
T. Kuncheva², N. Petkova², K. Milcheva², I. Gigov², J. Rainov²***

¹Laboratory of Cytogenetics and Immunology; ²Clinic of Hematology;
Military Medical Academy, Sofia

Резюме. Цел: Прогресиращата хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) се характеризира с натрупване на неопластични В-клетки в тъканите и корелира с експресията на прогностични биомаркери като CD38, Zap-70 и CD49d. Целта на нашето проучване е изследване на връзките между тези маркери, адхезионните молекули CD44, CD62L и експресията на хемокиновите рецептори CXCR4 (CD184), CCR3 (CD193) и CCR7 (CD197).

Материал и методи: Периферно кръвни проби от 46 пациента с ХЛЛ бяха маркирани със 7-цветно имунофлуоресцентно оцветяване и отчетени флуоцитометрично на FACS CANTO II; FACS DIVA софтуер.

Резултати: Намерени бяха значими статистически разлики и зависимости между изследваните молекули и клиничния ход на болестта.

Изводи: Вероятно заедно CD62L, CD197 и CD193 биха предоставили по-пълна информация за прогнозата при ХЛЛ, за което са необходими проследяващи проучвания.

Ключови думи: хронична лимфоцитна левкемия, миграционни молекули, прогноза

Summary. Aim: Progressive chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is characterised by the accumulation of neoplastic B-cells in the tissues and correlates with the expression of prognostic biomarkers, such as CD38, Zap-70 and CD49d. In this study we investigated the relationship between these markers, cell adhesion molecules CD44, CD62L and expression of chemokine receptors CXCR4 (CD184), CCR3 (CD193) and CCR7 (CD197).

Material and Methods: Peripheral blood mononuclear cells from 44 patients with CLL were stained for 7-color flowcytometric assay, using FACS CANTO II and FACS DIVA software.

Results: We found significant differences and correlations between investigated molecules and clinical course of the disease.

Conclusion: CD62L, CD197 and CD193 may be used together as prognostic markers in CLL, because they provide additional biologic information, but more studies are necessary.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, migration molecules, prognosis

ВЪВЕДЕНИЕ

Основна характеристика на хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е вариабилността на клиничната картина и курса на протичане. Независимо от установените в последните години връзки на генетични и фенотипни маркери с прогнозата на заболяването, биологичната основа на клиничната хетерогенност остава неизяснена. Прогресията на ХЛЛ се определя от разрастването на неопластичния клон и акумулацията му в костния мозък и вторичните лимфоидни органи. Тази ин-

филтрация води до характерна клинична картина: лимфаденопатия, спленомегалия, нарушения в хемопоезата и имунната функция. Пролиферационните центрове са отличителна черта на ХЛЛ, те не се установяват при други В-клетъчни малигнни заболявания, но се наблюдават във възпалителни тъкани на пациенти със системни автоимунни/възпалителни болести. Взаимодействието на левкемичната клетка с микросредата са комплексни, клетките мигрират към костния мозък и вторичните лимфоидни тъкани, следвайки

хемокиновите градиенти на съответната среда. В тъканите В-клетката получава антиапоптотични и активационни сигнали, активиращи вътреклетъчни сигнални пътища, чиито крайни ефекти са пролиферация и оцеляване (*Фигура 1*) [1]. Редица неблагоприятни биологични прогностични маркери са свързани с повишения миграционен потенциал на ХЛЛ лимфоцита. CD38 и Zap-70, два от най-често описваните флоуцитометрични прогностични маркери, са функционално свързани и определят клетките с висок миграционен потенциал [2]. Лигандът на CD38 - CD31, се експресира от клетките на съдовия ендотел и подпомага клетъчната адхезия. CD62L участва в първата фаза на клетъчната адхезия към ендотела и насочва лимфоцитите към вторичните лимфоидни органи. Кооперацията на CD44 с CD49d (VLA-4), повишава трансендотелната миграция на лимфоцита [3] и играе важна роля в процеса на екстравазация [4].



Фигура 1. Взаимодействия на левкемичната клетка с микросредата.

Цел на настоящото проучване е търсене на връзки между експресията на хомеостатичните хемокинови рецептори CXCR4 (CD184), CCR7 (CD197), възпалителният хемокинов рецептор CCR3 (CD193), CD62L и CD44 с утвърдените клинични и флоуцитометрични прогностични маркери CD38, Zap-70 и CD49d.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛ

Изследвани са 46 нелекувани пациенти с ХЛЛ (30 мъже и 16 жени, на възраст от 40 до 84 години), стадираны за оценка на риска според Rai стадиращата система: стадий 0 (10 пациента), стадий I (9 пациента), стадий II (8 пациента), стадий III (11 пациента), стадий IV (8 пациента). Разпределени са в 3 групи с нисък (10 пациента), среден (17 пациента) и висок риск (19 пациента); абсолютният лимфоцитен брой е между 7,90 – 279,0 $10^9/L$. Контролната група включва 11 здрави лица.

ФЛОУЦИТОМЕТРИЯ

Изследвана е периферна кръв, взета с антикоагулант K_2EDTA , обработена чрез стандартна wash / lysis техника за маркиране в директен имунофлуоресцентен тест, отчетен флоуцитометрично за експресия на мембранни и цитоплазмени антигени.

Панелът, определящ диагностичния за ХЛЛ имунофенотип и утвърдените флоуцитометрични прогностични маркери включва: CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b, CD5, CD10, CD23, k и l леки вериги CD38, CD49d, Zap-70, Bcl-2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Изследвани са миграционните рецептори: CCR3 (CD193); CCR7 (CD197); CD44; CD62L (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и CXCR4 (CD184) (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA).

Апаратурата: FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и програмен продукт FACSDiva 6.0.

Резултатите се представят като процент от CD19 положителната популация.

СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

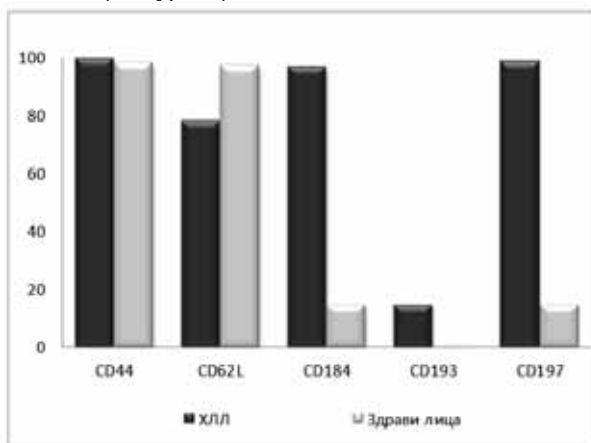
Методи за проверка на хипотези: Shapiro-Wilk W тест за определяне на нормалност в разпределението на данните и избор на по-нататъшни подходящи статистически методи. При $p < 0,05$ от теста на Shapiro-Wilk се представят медианни стойности и персентили P25 и P75 като показатели за средна тенденция и дисперсия. Двупосочен Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum) тест е използван за сравнение между групите.

Корелационният анализ е извършен с теста на Spearman (коефициент на линейна корелация) за определяне на връзка между групите от данни, използващ оценъчната скала на Colton. Статистическата обработка на получените резултати е направена с компютърната програма SPSS 21.0. Като ниво на статистическа значимост е прието $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

При сравнение на медианната експресия на изследваните маркери, между пациентите с ХЛЛ и контролна група от 11 здрави лица се установява значимо понижение на експресионните нива на CD62L при пациентите с ХЛЛ и повишение на CD184 и CD197. Аберантна експресия на CD193 се отчита при 74% от пациентите с експресионни нива от 1,5% до 100%. CD44 е високо експресиран и при двете групи (*Фигура 2*). Корелационният анализ с установени прогностични фактори показва значима положителна връзка на CD197, CD184 и CD44 и обратна корелация на CD62L с абсолютния брой левкоцити, лимфоцити и моноклонални В-лимфоцити. Нивото на хемоглобина

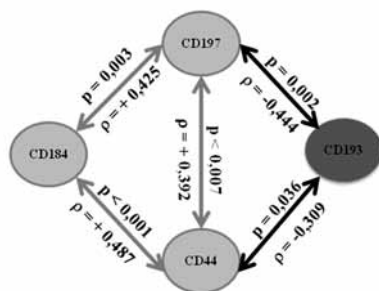
показва обратна връзка с експресионните нива на CD44 и права корелация с CD62L (Таблица 1). Намира се и обратна корелация на CD62L с нивото на b2-микроглобулина ($p = 0,029$; $r = -0,322$), а за CD197 се отчита връзка с нивата на Bcl-2 ($p = 0,038$; $r = +0,307$) и CD49d ($p = 0,001$; $r = -0,457$). Изследваните миграционни рецептори показват връзки и помежду си, като те са положителни между CD44, CD184 и CD197 и отрицателни при CD193 – CD197, CD193 – CD44 (Фигура 3). При съпоставка на медианната експресия на изследваните повърхностни маркери между рисковите групи, прави впечатление значимо по-ниското ниво на CD62L в стадии Rai I и Rai II и повишената аберантна експресия на CD193 в стадии Rai III и Rai IV (Фигура 4).



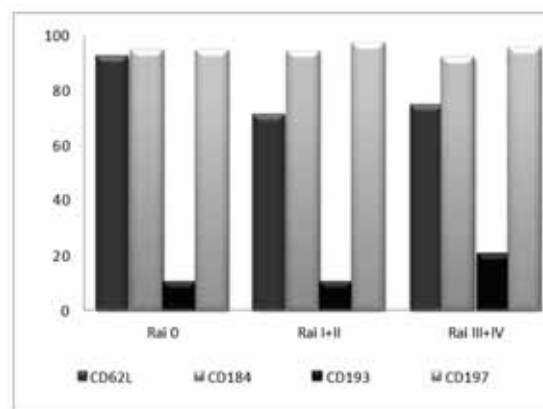
Фигура 2. Сравнение на медианната експресия на изследваните маркери с контролна група здрави лица

Таблица 1. Статистически значими корелации с утвърдени рискови фактори (стрелките показват посоката на отклонение при пациентите с ХЛЛ, в сравнение със здравите контроли).

	CD44	CD62L	CD184	CD197
Лейкоцити $\times 10^9/l$	$p = 0,029$ $r = -0,322$	$p = 0,015$ $r = -0,378$	$p = 0,010$ $r = -0,378$	$p = 0,001$ $r = -0,571$
Le абе, Брой $\times 10^9/l$	$p = 0,015$ $r = -0,354$	$p = 0,015$ $r = -0,355$	$p = 0,001$ $r = -0,369$	$p = 0,001$ $r = -0,570$
CD19 абе, Брой $\times 10^9/l$	$p = 0,015$ $r = -0,362$	$p = 0,010$ $r = -0,387$	$p = 0,010$ $r = -0,369$	$p = 0,001$ $r = -0,562$
Хемоглобин g/l	$p = 0,001$ $r = -0,539$	$p = 0,008$ $r = -0,386$		



Фигура 3. Статистически значими корелации между миграционните рецептори



Фигура 4. Сравнение на медианната експресия на изследваните маркери между рисковите групи

ДИСКУСИЯ

Тъканната инвазия и взаимодействието с компонентите на средата се осъществява чрез активация на набор миграционни молекули и подпомага клоналната експанзия. CD44 участва в молекулни комплекси съставени от $\alpha 4 \beta 1$ интегрин (CD49d е $\alpha 4$ субединицата), сплайс вариант на CD44 (CD44v) и MMP-9, чиито нива са свързани с лимфаденопатия и/или неблагоприятен изход [5]. Понижената експресия на CD62L в резултат на сигналите на В-клетъчния рецептор, води до инхибиране на апоптозата, нарушена адхезия, миграция и натрупване на туморни клетки в кръвта. CD184 е високо експресиран върху клоналните лимфоцити в периферна кръв, опосредства хемотаксиса и миграцията към костномозъчните стромални клетки [6]. CD193 насочва Th2-лимфоцитите към местата на възпаление [7]. Експресията му при ХЛЛ е аберантна и усилва миграционната активност [8]. CD197 повишената експресия върху ZAP-70(+) В-клетки засилва лиганд – рецепторното взаимодействие [9], CD5 фосфорилацията води до допълнително повишение на хемокиновия рецептор върху клетъчната повърхност [10] и лиганд-рецепторното взаимодействие инхибира апоптозата чрез активацията на ERK1/2 и Akt сигналните пътища [11]. Утвърдените при проследяващи проучвания флоуцитометрични прогностични фактори CD38, CD49d и ZAP-70 при настоящото “case control” изследване не показаха значими корелации с класическите прогностични фактори. Намерените статистически значими връзки: експресията на CD44, CD62L, CD184, CD197 с лейкоцитния, лимфоцитния брой и количеството на моноклоналните В-клетки; CD197 включително и с рисковите групи според стадиращата система по Rai; CD62L понижаваната експресия, по-ясно изразена в стадий Rai I и II; CD193 аберантната експресия и различните стимули, получавани чрез множеството свързващи го лиганди, показват необходи-

мостта от допълнителни проучвания за оценка на вероятно комплексното прогностично значение на миграционните и антиапоптотични рецептори. От значение за рутинната практика е отчетливата промяна в експресионните нива: CD44 и CD184 показват конституционално висока експресия при ХЛЛ, докато CD62L и CD197 имат вариабилна експресия, а CD193 – аберантна вариабилна експресия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

CD62L, CD197 и CD193 биха могли да бъдат разглеждани като миграционни рецептори, даващи информация за процесите, протичащи при конкретен пациент, в сложните взаимоотношения на малигнената клетка със средата.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Edelmann J, Klein-Hitpass L, Carpinteiro A, et al. (2008) Bone marrow fibroblasts induce expression of PI3K/NF-kappa B pathway genes and a pro-angiogenic phenotype in CLL cells. *Leuk Res*; **32**, 1565-72.
2. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al. (2007) CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood*; **110**: 4012-21.
3. Wang H, Hung Y, Su C, et al. (2005) CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 (alphaL beta2) and VLA-4 (alpha4 beta1). *Exp. Cell Res*; **304**(1):116-26.
4. Nandi A, Estess P, Siegelman M. (2004) Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity*; **20**(4):455-65.
5. Buggins A, Levi A, Gohil S, et al. (2011) Evidence For A Macromolecular Complex In Poor Prognosis CLL That Contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. *Br. J. of Haematol.* **154**(2): 216-22.
6. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, et al. (2009) Down-regulation of CXCR4 and CD62L in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Triggered by B-Cell Receptor Ligation and Associated with Progressive Disease. *Cancer Res*; **69**(16): 6387-95.
7. Jinquan T, Jacobi H, Jing C, et al. (2003) CCR3 Expression Induced by IL-2 and IL-4 Functioning as a Death Receptor for B Cells. *J Immunol*; **171**: 1722-31.
8. Trentin L, Cabrelle A, Facco M, et al. (2004) Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood*; **104**(2): 502-08.
9. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, et al. (2006) ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*; **107**:3584–92.
10. Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Marteau JB, et al. (2007) Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. *J. Immunol*; **179**:4335–44.
11. Ticchioni M, Essafi M, Jeandel PY, et al. (2007) Homeostatic chemokines increase survival of B-chronic lymphocytic leukemia cells through inactivation of transcription factor FOXO3a. *Oncogene*; **26**:7081–91.

Адрес за кореспонденция

Росица Владимирова Андреева
Лаборатория по цитогенетика и имунология
Военномедицинска академия
София 1606
Бул. „Георги Софийски“ №3
Тел: 0888 351 777
e-mail: rossy_vladimirova@yahoo.com

ЕКСПРЕСИЯ НА CD80/CD86 ПРИ ХРОНИЧНАТА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ – ВРЪЗКА С ПРОЛИФЕРАТИВНАТА АКТИВНОСТ

Р. Владимирова, И. Гълабова, Е. Викентиева, Д. Попова, Л. Митев, И. Николов, Р. Станчев, И. Дамянов, Т. Кънчева, Н. Петкова, К. Милчева, И. Гигов, Ю. Райнов

Военномедицинска академия, София

CD80/CD86 EXPRESSION IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA – RELATIONSHIP WITH PROLIFERATION ACTIVITY

R. Vladimirova, I. Galabova, E. Vikentieva, D. Popova, L. Mitev, I. Nikolov, R. Stanchev, I. Damianov, T. Kunchewa, N. Petkova, K. Milcheva, I. Gigov, J. Rainov

Military Medical Academy, Sofia

Резюме. Цел: Взаимодействията между моноклоналните В-лимфоцити и Т-клетките е важна част от всички контакт-зависими механизми при хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ), водещи до активация, пролиферация и акумулация на левкемични клетки. При настоящото проучване ние си поставихме за цел да съпоставим експресионните нива на CD80, CD86 в В-клетъчната популация, лиганда им CD28 в Т-клетъчната популация и връзката между тези сигнални молекули с пролиферационния маркер серумна тимидин киназа 1 (sTK1) за установяване на корелации помежду им.

Материал и методи: Изследвана е периферна кръв от 55 пациента с ХЛЛ преди лечението им. Мононуклеарните клетки бяха маркирани със 7-цветно имунофлуоресцентно оцветяване, отчетено флуцитометрично на FACSCanto II с FACSDiva v.6.0 софтуер.

Серумите бяха изследвани за определяне на sTK1 ензимна активност с радиоензимен метод.

Резултати: Молекулите CD80 и CD86 участващи в Т-В взаимодействията, показват различна експресия между лимфоцитите на ХЛЛ пациентите и здравите лица. Нивата на CD80 са по-високи върху нормалните лимфоцити сравнени с левкемичните клетки (медианни стойности съответно 27,3% и 5,8%), докато CD86 експресията е по-висока върху ХЛЛ-клетките (медиана = 14,0%; контролна група - 9,5%). Нивата на CD28 върху Т-клетките са сходни в двете групи. Намерена е обратна корелация между нивото на CD80 на левкемичните В-клетки и sTK1 ($p = 0,047$; $r = -0,322$) и положителна връзка между CD80 и CD86 ($p < 0,001$; $r = +0,506$).

Изводи: CD80 и CD86 биха могли да служат като сурогатни пролиферационни маркери при ХЛЛ, поради значимите връзки с нивата на sTK1, при натрупване на допълнителни данни в тази посока.

Ключови думи: хронична лимфоцитна левкемия, пролиферация, CD28, CD80, CD86, sTK1

Summary. Aim: Interactions between monoclonal B-lymphocytes and T-cells are an important part of all contact dependent mechanisms in chronic lymphocytic leukemia (CLL), leading to activation, proliferation and accumulation of leukemic B cells. In the present study, we have investigated expression levels of CD80, CD86 on B-cells, their ligand CD28 on T-cells and the relationships between these signal molecules and the proliferation marker thymidine kinase 1 (sTK1) to establish correlations between them.

Material and methods: Peripheral blood from 55 patients with CLL was collected before treatment. Mononuclear cells were stained for 7-color flowcytometric assay, read on a FACSCanto II, using FACSDiva v.6.0 software. Sera were tested with radioenzymatic assay for in vitro determination of sTK1 enzymatic activity.

Results: CD80 and CD86 molecules, involved in T-B cooperation, showed inverse expression in CLL patients and healthy subjects. CD80 was higher on normal than leukemic B cells (median values respectively 27.3% and 5.8%), while CD86 expression was higher on CLL B cells (median = 14.0% and 9.5% in controls). Expression of CD28 on T-cells was similar in both groups. We found significant reverse correlation between CD80 expression on leukemic B cells and sTK1 ($p = 0,047$; $r = -0,322$); positive correlation was observed between CD80 and CD86 ($p < 0,001$; $r = +0,506$).

Conclusion: CD80 and CD86 might be used as surrogate proliferation markers in CLL, because they show significant relationships with sTK1 levels, but more studies are necessary.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, proliferation, CD28, CD80, CD86, sTK1

ВЪВЕДЕНИЕ

Взаимодействието на моноклоналните В лимфоцити с Т лимфоцитите при хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е важен компонент на малигнения процес, стимул за В и Т-клетъчна активация и пролиферация [1]. При пациенти с ХЛЛ, Т лимфоцитите са значима фракция от лимфоидния инфилтрат, локализиран около и в пролиферационните центрове във вторичните лимфоидни органи [2]. Основни молекули за взаимодействие между В и Т лимфоцитите са костимулаторните / коинхибиторни молекули CD80 и CD86, експресирани върху В-клетките. CD80 и CD86 играят различни роли в имунната модулация, в зависимост от лиганда, с който се свързват - CD28 или CD152, на повърхността на Т лимфоцита. Връзката с CD28 провежда костимулаторни сигнали водещи до активация, диференциация и ефективен клетъчен и хуморален имунен отговор. Този продуктивен имунен отговор се балансира (инхибира) от сигналите чрез CD152 рецептора. Връзката CD80 – CD152 е с по-висок афинитет от тази на CD86 с CD152, докато CD28 свързва CD86 по-ефективно от CD80. Клетките в покой експресират ниски нива на CD86 [3]. За разлика от нормалните В лимфоцити, малигнените клетки са слаби антиген-презентиращи клетки поради редуцираната експресия на костимулаторни молекули, което води до дефект във формирането на имунологичен синнапс с Т-клетките [4]. Ензимът серумна тимидин киназа 1 (sTK1) е цитозолен ензим участващ в ДНК синтезата, като катализира конверсията на дезокситимидина до дезокситимидин монофосфат. Той е единственият серумен маркер за клетъчна пролиферация, поради което е независим прогностичен маркер при ХЛЛ, с различни нива при пациенти с тлеещи и по-бързо развиващи се форми на заболяването. Ниво на sTK1 под и над 7,0 U/l разделя пациентите в стадий А по Binet на две групи със средна свободна от прогресия преживяемост съответно 9 и 49 месеца [5] При друго проучване, ниво на sTK1 > 15,0 U/l се оказва маркер корелиращ с IGHV мутационния статус [6].

Цел на настоящото проучване е търсене на връзки между експресията на CD80, CD86 и активационния им лиганд CD28 с пролиферационния маркер sTK1.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛ

Изследвани са 55 нелекувани пациенти с ХЛЛ (36 мъже и 19 жени, на възраст от 37 до 84 години), стадири за оценка на риска според Rai стадиращата система: стадий 0 (14 пациента), стадий I (10 пациента), стадий II (10 пациента), стадий III (11 пациента), стадий IV (10 пациента). Разпределени са в 3 групи с нисък (Rai 0 - 14 пациента), среден (Rai I + II - 20 пациента) и висок риск (Rai III + IV - 21 пациента); абсолютният лимфоцитен брой е между 7,90 – 405,95 $10^9/L$. Контролната група включва 11 здрави лица.

МЕТОДИ

ФЛОУЦИТОМЕТРИЯ

Изследвана е периферна кръв, взета с антикоагулант K_2EDTA , обработена чрез стандартна wash / lysis техника за маркиране в директен имунофлуоресцентен тест, отчетен флуоцитометрично за експресия на мембранни антигени.

Панелът определящ диагностичния за ХЛЛ имунофенотип включва: CD19, CD20, CD22, CD79b, CD5, CD10, CD23, k и l леки вериги, CD3, CD4, CD8, CD16+56 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Панелът за изследване на рецепторите участващи в Т-В-клетъчните взаимодействия включва: CD28, CD40, CD80, CD86, CD154, CD197 (CCR7) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

Апаратурата: FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и програмен продукт FACSDiva 6.0.

Резултатите се представят като процент от CD19 положителната популация за В-клетъчните рецептори и като процент от CD3 положителната популация за Т-клетъчните рецептори.

РАДИОЕНЗИМЕН МЕТОД ЗА ИЗМЕРВАНЕ НА sTK1.

Изследвани са серуми, взети по стандартна процедура, съхранявани на -20° при изследвания за период по-голям от 24 часа. Използван е комерсиален кит TK-REA (Beckman Coulter) за количествено радиоензимно измерване на sTK1

активност, която превръща ^{125}I -дезоксисуридин в измервания ^{125}I -дезоксисуридин монофосфат. За нормално ниво на sTK1 е прието до 5 U/l.

СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Методи за проверка на хипотези: Shapiro-Wilk W тест за определяне на нормалност в разпределението на данните и избор на по-нататъшни подходящи статистически методи. При $p < 0,05$ от теста на Shapiro-Wilk се представят медианни стойности и персентили P25 и P75 като показатели за средна тенденция и дисперсия. Двупосочен Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum) тест е използван за сравнение между групите.

Корелационният анализ е извършен с теста на Spearman (коефициент на линейна корелация) за определяне на връзка между групите от данни, използващ оценъчната скала на Colton. Статистическата обработка на получените

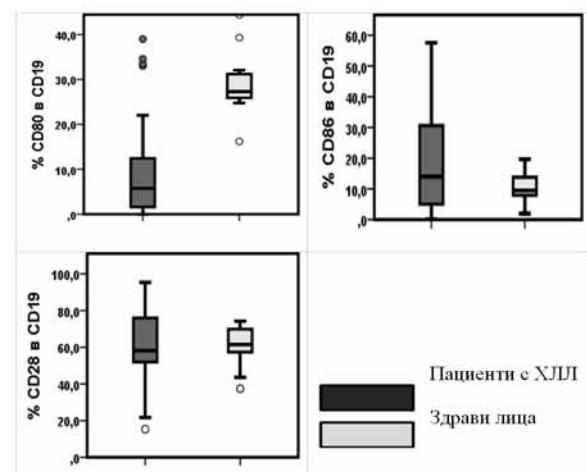
резултати е направена с компютърната програма SPSS 21.0. Като ниво на статистическа значимост е приет $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Съпоставка между общата група пациенти и контролната група. Установява се повишено медианно и максимално ниво на CD86 и петкратно понижение на медианното и максимално ниво на CD80 при лицата със заболяване. Сравнителният анализ на експресията на Т-клетъчния рецептор CD28 показва сходни величини на експресия на медианното ниво и повишение на максималното ниво (Таблица 1; Фигура 1). Медианното ниво на sTK1 в цялата група пациенти е слабо повишено в сравнение с референтните граници, но максималното ниво е много високо (432,3 U/l)

	ХЛЛ	Контроли	Rai 0	Rai I + II	Rai III + IV
% CD80 в CD19	5,8 %	27,3 %	7,3 %	6,35 %	4,0 %
% CD86 в CD19	14,0 %	9,5 %	10,0 %	17,05 %	14,2 %
% CD28 в CD3	58,1 %	61,0 %	65,75 %	57,9 %	58,6 %
sTK1 U/l	13,8 U/l	< 5 U/l	0,655 U/l	1,6 U/l	16,4 U/l

Таблица 1: Медианни експресии на изследваните молекули при пациенти с ХЛЛ, контролна група здрави лица и рисковите групи според стайиите по Rai.



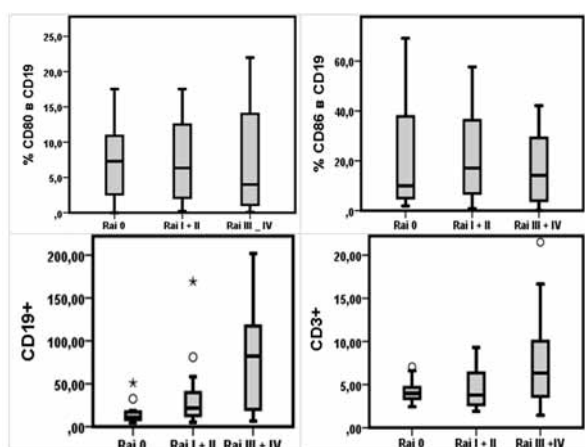
Фигура 1: Сравнение между експресията на регулаторните молекули CD80 и CD86 представени като процент от CD19+ клетки и CD28 представен като процент от CD3+ лимфоцити

Съпоставка на експресията на изследваните повърхностно активни молекули и количеството

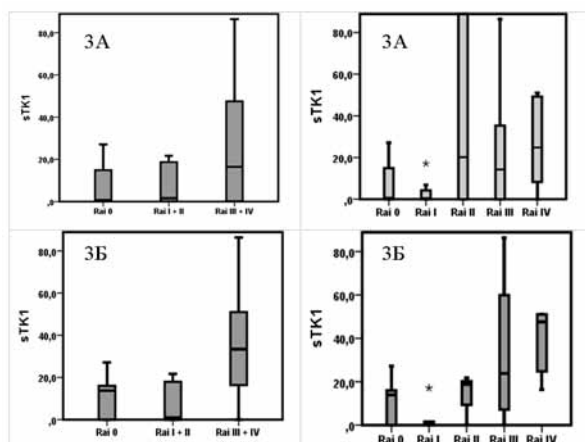
на sTK1 между рисковите групи. Успоредно с повишението на абсолютния брой на моноклоналните В лимфоцити и Т лимфоцитите с увеличаването на риска, медианната експресия на CD80 намалява, но максималното ниво се повишава, като то е най-високо в групата с висок риск. Максималните нива на CD86 се понижават, а медианната експресия е най-висока в групата с междинен риск. Медианната и максимална експресия на CD28 са най-ниски в групата с междинен риск (Таблица 1; Фигура 2). Медианната концентрация на sTK1 не показва разлика при групите с нисък и среден риск, повишава се само максималното ниво, но в групата с висок риск, значимо се покачват медианните и максимални концентрации (Таблица 1; Фигура 3А).

Изследване на зависимостите в цялата група пациенти. CD80 показва положителна корелация

с CD86 ($p < 0,001$; $r = +0,506$) и отрицателна със sTK1 ($p = 0,047$; $r = -0,322$). CD86 и активационният рецептор на Т лимфоцитите CD28 не показват връзка с изследваните маркери. При високи нива на CD80 – над 10% (17 пациента), рецепторът показва положителна връзка с абсолютния левкоцитен брой ($p = 0,023$; $r = +0,548$), абсолютния лимфоцитен брой ($p = 0,035$; $r = +0,514$), абсолютния брой Т-клетки ($p = 0,004$; $r = +0,615$), но не и с моноклоналните В-клетки. При ниски стойности на CD86 – под 15% (30 пациента), силата на отрицателната корелация на CD80 със sTK1 нараства ($p = 0,004$; $r = -0,549$). Медианната концентрация на sTK1 нараства при експресия на CD80 < 10% в групите с нисък и висок риск (Фигура 3Б).



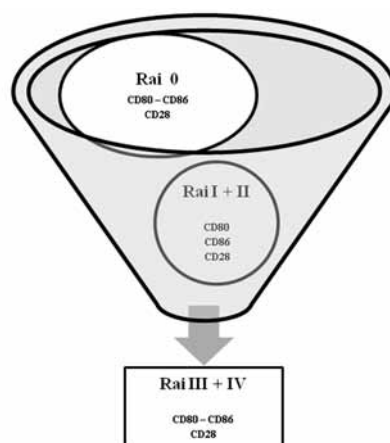
Фигура 2: Сравнение на експресията на CD80 и CD86 в рисковите групи според стайите по Rai, представена, като процент от CD19+ клетки и абсолютен брой CD19+ и CD3+ лимфоцити $\times 10^9/l$



Фигура 3: 3А – Концентрации на sTK1 според рисковите групи и стайите по Rai.

3Б – Концентрации на sTK1 според рисковите групи и стайите по Rai, при нива на CD80 < 10%

Промяна на корелационните зависимости в рисковите групи. В стадия с нисък риск CD80 показва положителна връзка с CD86 ($p = 0,045$; $r = +0,563$). При пациентите с междинен риск не се установяват корелации, а групата с висок риск отново показва положителна връзка между CD80 и CD86 ($p = 0,008$; $r = +0,565$) (Фигура 4).



Фигура 4: Корелационни зависимости между изследваните рецептори в групите по риск според стайирането по Rai

ДИСКУСИЯ

Променена експресия на костимулаторните молекули CD80 и CD86 е доказана при редица В-клетъчни лимфопролиферативни заболявания. След *in vitro* активация на фоликуларно-лимфомни клетки, нивата на CD80 и CD86 се повишават, успоредно с други костимулаторни и адхезионни молекули [7]. ХЛЛ лимфоцитите също имат ниски нива на експресия преди стимулация [8]. При изследване на пациенти с дребноклетъчен лимфом само 43% от случаите експресират CD80, в нива по-ниски от останалите изследвани В-клетъчни лимфоми. Тази ниска експресия се свързва с наивен или неактивиран В-клетъчен имунофенотип [9]. Повишената експресия на CD86 в общата група пациенти с ХЛЛ в нашето проучване показва активиране на малигнените лимфоцити и предвид факта, че CD86 има по-висок афинитет към провеждащия активационен сигнал CD28 [3], логично следва изводът за активация и пролиферация на Т и В клетките по този костимулаторен път. Успоредно с това, намереното петкратно понижаване на CD80, молекула с по-висок афинитет към рецептора

CD152 [3] в цялата група пациенти, говори за нисък инхибиторен (регулаторен) сигнал между двете основни лимфоцитни популации. Имайки предвид сходните величини на медианна експресия на CD28 в общата група пациенти, в рисковите групи и контролната група, ние предполагахме, че основна роля във взаимоотношенията между основните лимфоцитни популации играе фракцията на моноклоналните В-клетки. Понижението на медианната и повишението на максималната експресия на CD80, успоредно с понижението на CD86 при съпоставка на рисковите групи според нас е отражение на нарастващата неефективност на междуклетъчните взаимодействия. Клетъчният ензим sTK1 участва в ДНК синтезата. Основната форма на ензима се намира в дялящи се клетки и липсва в неделящи се клетки. Това прави sTK1 полезен маркер за пролиферативна активност, свързана с бърза прогресия и напреднал стадий на заболяването [10]. Установеното повишение на медианната концентрация на sTK1 при експресия на CD80 < 10% в групите с нисък и висок риск, както и повишаването на силата на отрицателната връзка на CD80 със sTK1 при нива на CD86 < 15% дава основание да се предположи, че CD80 е рецептор свързан с пролиферационната активност и понижаването на инхибиторните сигнали е важен механизъм за прогресия на ХЛЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регулационните рецептори CD80 и CD86, експресирани от малигнените В лимфоцити, поради връзката си с концентрационните нива на sTK1, биха могли да служат като сурогатни флоуцитометрични маркери за клетъчна пролиферация при натрупване на допълнителни данни.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Devereux S. Two-faced T cells in CLL. *Blood*. 2011; 117 (20): 5273–4.
2. Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 2008; 111 (10): 5173–81.
3. Greaves P, Gribben JG. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood*. 2013; 121 (5): 734–44.
4. Herishanu Y, Katz B, Lipsky A, et al. Biology of Chronic

Lymphocytic Leukemia in Different Microenvironments: Clinical and Therapeutic Implications. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013; 27 (2): 173–206.

5. Hallek M, Langenmayer I, Nerl Ch, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease-progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 93 (5): 1732–7.
6. Magnac C, Porcher R, Davi F, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia*. 2003; 17 (1): 133–7.
7. Schultze J, Cardoso A, Freeman G, et al. Follicular lymphomas can be induced to present alloantigen efficiently: a conceptual model to improve their tumor immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92 (18): 200–4.
8. Ranheim E, Kipps T. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med*. 1993; 177 (4): 925–35.
9. Dakappagari N, Ho S, Gascoyne R, et al. CD80 (B7.1) is expressed on both malignant B cells and nonmalignant stromal cells in non-Hodgkin lymphoma. *Cytometry Part B*. 2012; 82B: 112–9.
10. Konoplev S, Fritsche H, O'Brien S, et al. High Serum Thymidine Kinase 1 Level Predicts Poorer Survival in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134: (3) 472–7.

Адрес за кореспонденция

Росица Владимирова Андреева
Лаборатория по цитогенетика и имунология
Военномедицинска академия
София 1606
Бул. „Св. Георги Софийски“ № 3
Тел: 0888 351 777
e-mail: rossy_vladimirova@yahoo.com

**ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ И ПЕРСИСТИРАЩА
ПОЛИКЛОНАЛНА В-КЛЕТЪЧНА ЛИМФОЦИТОЗА – ФЕНОТИПНА СЪПОСТАВКА**

Р. Владимирова, Е. Викентиева, И. Николов, Р. Станчев, Л. Митев, Д. Попова

Военномедицинска академия, София

**CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA v/s PERSISTENT POLYCLONAL
B-CELL LYMPHOCYTOSIS**

R. Vladimirova, E. Vikentieva, I. Nikolov, R. Stanchev, L. Mitev, D. Popova

Military Medical Academy, Sofia

Резюме. Увод: Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) се характеризира с натрупване на моноклонални В-клетки в периферната кръв $\geq 5 \times 10^9/L$ с характерен имунофенотип: CD5+, CD23+, CD19+, CD20+, CD22+, FMC-7-, за разлика от персистиращата поликлонална В-клетъчна лимфоцитоза, където е налице доброкачествена експанзия на В-лимфоцити с имунофенотип: CD19+, CD20+, CD22+ обикновено CD5-, CD23-, но положителни за К и I вериги.

Материали и методи: Касае се за 35-годишна жена пушачка с лимфоцитоза - $11,22 \times 10^9/l$, без анемия и тромбоцитопения и без анамнестични данни за фамилна обремененост свързана с лимфопролиферативно заболяване. От натривката – около 15% двуйдрени лимфоцити. Перифернокръвната проба беше маркирана със 7-цветно имунофлуоресцентно оцветяване (CD19, CD20, CD22, CD23, CD79b, CD5, CD10, CD15, CD11c, CD30) и отчетена флуоцитометрично на FACSCanto II; FACSDiva софтуер.

Резултати: Установеният имунофенотип на В-клетъчната популация е: CD19+, CD20+, CD22+, CD23+, CD5+, FMC7-, CD79b+, CD11c+, K+, I+, k/I = 0,88.

Изводи: Антигенният профил на представения случай е типичен за ХЛЛ, като единствено съотношението k/I насочва към правилната диагноза – персистираща поликлонална В-клетъчна лимфоцитоза.

Ключови думи: хронична лимфоцитна левкемия, персистираща поликлонална В-клетъчна лимфоцитоза, имунофенотип

Summary. Background: Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is characterised by the accumulation of monoclonal B-cells in peripheral blood $\geq 5 \times 10^9/L$. CLL lymphocytes have a characteristic immunophenotype: CD5+, CD23+, CD19+, CD20+, CD22+, FMC-7-. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL) is an unusual chronic expansion of B-lymphocytes, with a benign clinical course. The lymphocytosis is of B-cell type: CD19+, CD20+, CD22+ usually CD5-, CD23-, both kappa and lambda-chains are positive.

Materials and methods: 35-year-old smoking woman with lymphocytosis ($11,22 \times 10^9/L$) without anemia and thrombocytopenia. Peripheral blood smear shows 15% of the lymphocytes as binucleated. There was no family history of lymphoid disorders.

Peripheral blood was stained for 7-color flow cytometric assay with CD19, CD20, CD22, CD23, CD79b, CD5, CD10, CD15, CD11c and CD30. Analysis was made with FACSCanto II and FACSDiva software.

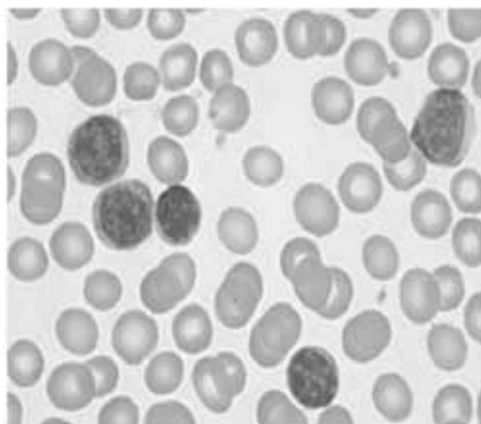
Results: Immunophenotyping demonstrated a population of B-lymphocytes: CD19+, CD20+, CD22+, CD23+, CD5+, FMC7-, CD79b+, CD11c+, k+, I+, k/I = 0,88.

Conclusion: The antigen profile in this case is typical for CLL, only k/I ratio indicates the right diagnosis - persistent polyclonal B-cell lymphocytosis.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, persistent polyclonal B-cell lymphocytosis, immunophenotype

ВЪВЕДЕНИЕ

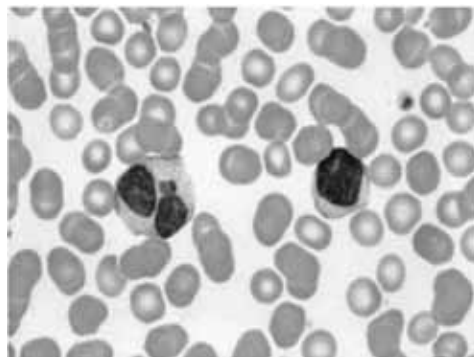
Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е най-честата левкемия при възрастни, като в последните години се наблюдава тенденция към по-честа изява при пациенти под 50 г. възраст. Съотношението мъже : жени е 2 : 1. ХЛЛ е неоплазия съставена от мономорфни малки, зрели В-лимфоцити в периферната кръв, костния мозък и вторичните лимфоидни органи, примесени с пролимфоцити и параимунобласти, формиращи пролиферационни центрове (Фигура 1). Клиничната картина е вариабилна по отношение на дебют, ход и изход на заболяването [1].



Фигура 1. ХЛЛ - типично клетките са малки, с вид на зрели лимфоцити с плътна структура на ядрото, скупчен хроматин, без различни нуклеоли. Цитоплазмата е под формата на тесен блед до умерено базофилен пръстен.

Персистиращата поликлонална В-клетъчна лимфоцитоза (ППВКЛ) е рядко, описано в последни-

те години бенигнено заболяване (1982 г. за първи път), с експанзия на зрели, често двуядрени и големи В-лимфоцити с базофилна цитоплазма в периферната кръв и костния мозък (Фигура 2).



Фигура 2. ППВКЛ - клетките са със средна големина, с умерено обилна базофилна цитоплазма. Хроматинът е зрял, с асиметрично билобулирано ядро и видими една до две нуклеоли.

Засяга предимно жени, пушачи на средна възраст (40-50 год.) [2]. Възникването ѝ се свързва с тютюнопушенето, вирусни инфекции (Epstein-Barr) и най-вероятно с генетично предразположение. Повечето пациенти носят HLA-DR7. В-лимфоцитите се определят като паметови CD27+ IgD+ IgM+ клетки, продуциращи повишени количества IgM. Натрупването им се дължи на дефекти в сигналните пътища, индуциращи апоптоза и „хоуминга“ на лимфоцитите във вторичните лимфоидни органи. Пациентите са предимно асимптоматични, но се наблюдават случаи със спленомегалия, хепатомегалия и аденопатия (Таблица 1).

ХЛЛ – диагностични критерии	ППВКЛ – диагностични критерии
Моноклонални В лимфоцити с фенотип на ХЛЛ $\geq 5 \times 10^9/l$ в периферната кръв при липса на екстрамедуларно тъканно ангажиране. Допустим по-нисък брой при наличие на цитопении и симптоматика.	Хронична, персистираща, стабилна средна до абсолютна лимфоцитоза $> 4 \times 10^9/l$ в периферната кръв. Поликлонални В-лимфоцити според експресията на леките вериги κ appa и λ lambda [3].
Персистиране на моноклонална В-клетъчна лимфоцитоза > 3 месеца в периферната кръв.	Персистиране на поликлоналната В-клетъчна лимфоцитоза > 6 месеца в периферната кръв.
Костен мозък: ангажиране от зрели лимфоцити $> 30\%$ от всички клетки.	Костен мозък: нормална хистология.
Антигенен профил: CD19+, CD5+, CD23+, CD10-, FMC7-, ниска експресия на CD20 и CD22; CD79b-/+	Антигенен профил: CD19+, CD5-, CD23-/+ , CD10-, CD20+, CD22+, CD79b-/+ , CD27+
	Наличие на допълнителна изохромозома за дългото рамо на хромозома +i(3)(q10) (70%), хромозомна нестабилност (67%) [2]

Таблица 1. Съпоставка на диагностичните критерии на ХЛЛ / ППВКЛ

Имунофенотипизиране: Флоуцитометричното изследване е неразделна част от класификацията на хроничните В-клетъчни левкемии и често се явява основен метод за поставяне на диагнозата. ХЛЛ има характерен имунофенотип – експресия

на CD5, CD19, CD23 и слаба експресия на моноптипни повърхностни имуноглобулини. Разработени са и скорови системи в помощ на тази диагностика, включващи тези и други антигени, като FMC-7 и CD79b [4, 5]. ППВКЛ е В-клетъчна полик-

лонална пролиферация с фенотип CD5-, CD23-/+. В литературата, по наши данни, са описани само 3 случая с експресия на CD5 антигена [6] (Таблица 2).

ПРЕДСТАВЯНЕ НА СЛУЧАЙ

Пациент: 35 годишна жена, в добро общо състояние, постъпила в клиниката за диагностично уточняване с първоначално приета диагноза ХЛЛ, поради наличието на асимптоматична левкоцитоза с лимфоцитоза за период от 5 месеца. Пациентката пуши до 20 цигари на ден. По анамнестични данни не е имала остри и хронични заболявания и не е приемала системно медикаменти. Тя не съобщава за загуба на тегло, необяснимо покачване на температурата и нощно изпотяване.

Статус: ECOG PS-0. Периферни лимфни възли – не се палпират увеличени. Везикуларно дишане, без хрипове. Ритмична сърдечна дейност, пулс 90 удара/мин, артериално налягане 120/70 mm Hg. Корем мек, неболезнен, без органомегалия.

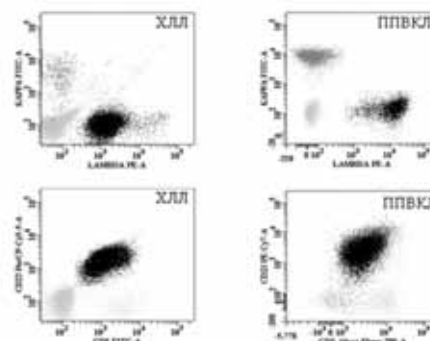
Лабораторни показатели: Левкоцити – $19,35 \times 10^9/l$ (референтни граници $3,5 - 10,5 \times 10^9/l$), с абсолютна лимфоцитоза $11,22 \times 10^9/l$, като част от лимфоцитите са с по-обилна базофилна цитоплазма, зрял хроматин и видими нуклеоли, двуядрени с налобяване или моноцитоилен вид на ядрата (Фигура 2). Хемоглобин – в долната част на референтния интервал (119 g/l; референтни граници: 120-160 g/l); нормален тромбоцитен брой ($283 \times 10^9/l$; референтни граници: 150-400 $\times 10^9/l$). Лактатдехидрогеназата е леко завишена (388 IU/l; референтни граници: 208-378 IU/L); СУЕ – 33 mm/h.

Миелограма: 23% лимфоцитна инфилтрация.

Имунофенотипизиране - метод: Изследвана е периферна кръв, взета с антикоагулант K₂EDTA, об-

работена чрез стандартна wash / lysis техника за маркиране директен имунофлуоресцентен тест, отчетен флоуцитометрично. Панелът, определящ диагностичния за ХЛЛ имунофенотип, включва: CD19, CD20, CD22, CD79b, CD5, CD10, CD23, FMC-7, CD103, CD11c, CD25, k и l леки вериги CD3, CD4, CD8, CD16, CD56 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Апаратура: FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) и програмнен продукт FACSDiva 6.0.

Имунофенотипизиране – резултати: Флоуцитометричното изследване показва експресия на В-клетъчни маркери върху 74% от лимфоцитите (CD19, CD20, CD22, CD79b) с коекспресия на CD5 и CD23 и нормално k/l съотношение; референтни граници: 03-3,0 (Фигура 3), доказващо поликлоналния характер на В-лимфоцитите (Таблица 2). Фенотипът на Т-клетъчната популация е без отклонения (CD3+CD4+/CD3+CD8+ = 2,43).



Фигура 3. Фенотипна съпоставка на повърхностната експресия на леките вериги k и l антигените CD5 и CD23 при ХЛЛ и представяния пациент с ППВКЛ.

При повторно имунофенотипизиране след 2 години се отчита повишение на В-клетъчната популация с $4 \times 10^9/l$ при запазена поликлоналност.

Маркер	PPVCL	CLL	Пациент	Експресия %
CD19	+	+	+	74 %
CD20	+	+	+	65 %
CD22	+	+	+	65 %
CD23	-/+	+	+ / -	93 %
CD79b	+	+/-	+	55 %
CD5 в CD19	-	+	+	95 %
CD10 в CD19	-	-	-	0,4 %
CD11c в CD19	+	-/+	+	36 %
CD25 в CD19	+	+/-	-	1%
CD103 в CD19	-	-	-	0%
FMC-7 в CD19	+	-	-	10 %
k/l	Без клоналност	Клоналност	Без клоналност	k/l = 0,88

Таблица 2. Съпоставка на типичния за ХЛЛ и ППВКЛ експресионен профил с антигенния профил на представяния пациент.

ОБСЪЖДАНЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лимфоцитозата (лимфоцитен брой $> 4 \times 10^9/l$) може да бъде транзиторна или персистираща. Транзиторната лимфоцитоза е обикновено бенигна и поликлонална, за разлика от персистиращата лимфоцитоза, особено при възрастни пациенти, която е най-често малигна. ХЛЛ е най-често срещаната левкемия при възрастни. Заболяването има дефиниран количествен критерий и добре формулиран диагностичен фенотип, като при атипичната ХЛЛ той може да варира по отношение силата на експресия на повърхностните маркери. Дали ППВКЛ е бенигна, поликлонална форма на хронична лимфоцитоза, или носи малигнен потенциал е въпрос, който ще получи отговор в бъдеще, след проследяване динамиката, фенотипа и генотипните промени. Намерените мултиплени Bcl-2/Ig генни реаранжменти [7] и необичайни имуноглобулинови DHJH реаранжменти [8], дават основание да се предположи, че ППВКЛ може да бъде и пре-малигнено състояние [9]. Представеният случай покрива количествения критерий и фенотипа на ХЛЛ, но В-лимфоцитите са поликлонални според леките имуноглобулинови вериги и силна експресия на CD79b и CD22. Тази фенотипна констелация доказва необходимостта от флоуцитометрично определяне на клоналност (k/l съотношение), тъй като доказването на ППВКЛ е важно за по-нататъшното поведение – наблюдение на пациента в дългосрочен план без нужда от химиотерапия при липсата на клинична еволюция [10, 11].

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Müller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D et al. Chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008:180-2.
2. Troussard X, Cornet E, Lesesve JF et al. Polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes (PPBL). Oncol Targets Ther. 2008; 1: 59–66.
3. Ortolani C. Flow Cytometry of Hematological Malignancies. Wiley-Blackwell, Kindle Edition. 2011; 1-328.
4. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia. 1994; 8: 1640-5.
5. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). Am J Clin Pathol. 1997; 108: 378-82.
6. Reeder CB, Conley CR. CD5+ persistent polyclonal B-cell lymphocytosis in a male. Leuk Lymphoma. 1999; 33(5-6): 593-6.

7. Delage I, Roy J, Jacques L et al. All patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis present bcl-2/Ig gene rearrangements. Leuk Lymphoma. 1998; 31: 567-74.
8. Chan MA, Benedict SR, Carstairs KC et al. Expansion of B lymphocytes with an unusual immunoglobulin rearrangement associated with atypical lymphocytosis and cigarette smoking. Am J Respir Cell Mol Biol. 1990; 2: 549-52.
9. Cornet E, Lesesve JF, Mossafa H et al. Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Long-term follow-up of 111 patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. Leukemia. 2009; 23(2): 419-22.
10. Sun P, Juskevicius R. Histological and immunohistochemical features of the spleen in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis closely mimic splenic B-cell lymphoma. Diagn Pathol. 2012; 7: 107.
11. Chevalier C, Husson B, Detry G. Polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes in a man. Am. J. Hematol. 2013; 88: 86.

Адрес за кореспонденция

Росица Владимирова Андреева
Лаборатория по цитогенетика и имунология
Военномедицинска академия
София 1606
Бул. „Георги Софийски“ №3
Тел: 0888 351 777
e-mail: rossy_vladimirova@yahoo.com

СЛУЧАЙ НА ЕКСТРАМЕДУЛАРЕН ПЛАЗМОЦИТОМ НА ЦНС ПРИ ЖЕНА НА 29 Г., ПРОГРЕСИРАЛ ДО МНОЖЕСТВЕН МИЕЛОМ С ФАТАЛЕН ИЗХОД

М. Ефраим, А. Антонов, И. Мичева, Вл. Геров и Л. Герчева

A CASE OF EXTRAMEDULLARY PLASMOCYTOMA OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AFFECTING (CONCERNING) A WOMAN AT THE AGE OF 29 THAT PROGRESSED TO MULTIPLE MYELOMA WITH FATAL END.

M. Efraym, A. Antonov, I. Micheva, V. Gerov, L. Gercheva

Резюме. Представя се рядък случай на екстрамедуларен плазмоцитом при пациентка на 29г., дебютирал с оплаквания от главоболие предимно с челна локализация, диплопия и отслабване на зрението. Намерени са 2 туморни маси в главния мозък, а последваща двуетапна неврохирургична интервенция ги отстранява тотално. Хистологичният резултат е плазмоцитом. Постоперативно е осъществен пълен панел от изследвания, които изключват мултиплен миелом. Проведена е краниална лъчетерапия с ООД 50 Gy. Два месеца по-късно е установена прогресия на заболяването в множествен миелом, със затегнат ход, лош ефект от проведената химиотерапия и фатален изход.

Ключови думи: мултиплен миелом, плазмоцитом, парапротеин, остеолитични лезии

Summary. We present a rare case concerning a woman at the age of 29 with complaints of headache in the front side of her head and diplopia with reduction in her visualization is presented. Two tumor masses in her brain were found. It was decided that these tumor masses had to be operated totally after a consultation with the neurosurgery department. The histological result was plasmocytoma. After numerous tests, the patient was diagnosed as extramedullary plasmocytoma. The treatment included craniospinal radiotherapy with dose of 50Gy. Two months later progression of the disease to multiple myeloma was found and chemotherapy was commenced. During the treatment we lost our patient.

Key words: multiple myeloma, plasmocytoma, paraprotein, osteolytic lesions

ВЪВЕДЕНИЕ

Екстрамедуларният плазмоцитом (ЕМП) е изключително рядък тумор, описан за първи път през 1905г от Schridde et al.[5] Голяма част от диагностицираните ЕМП са солитарни. Последните съставляват около 3 % от плазмоклетъчните неоплазии. В над 90% те произхождат от шия, глава, горни дихателни пътища, носна кухина, синуси, орофаринкс, ларинкс и слюнчени жлези. Alexious et al.[2] са описали 869 случая на ЕМП в литературата за периода 1905- 1997г, като само 1.6% са с локализация в сфеноидалните синуси. Туморните маси при ЕМП най-често водят до компресия или инвазия на околните тъкани. Самостоятелното ангажиране от ЕМП на бял дроб (представя се чрез белодробни нодули или хилусни маси), ЦНС, орбити, черен дроб, слезка, кожа, тестиси, щитовидна жлеза, панкреас се счита за казуистика. [7]

Според класификацията на Wiltshaw(5) в развитието на ЕМП се разграничават следните стадии:

1. Ограничена екстрамедуларна локализация;
2. Ограничена екстрамедуларна локализация + ангажиране на регионални лимфни възли;
3. Множествено ангажиране от екстрамедуларни туморни формации;

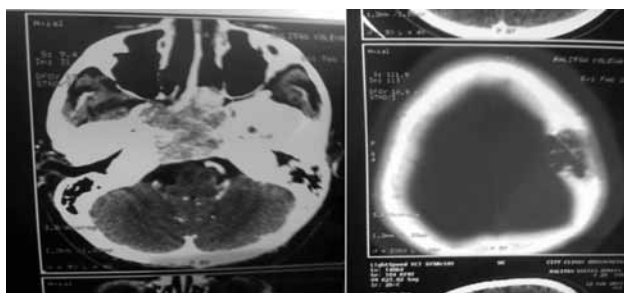
Липсват патогномонични цитогенетични аномалии, характерни за ЕМП.[5,13] В малко от описаните в литературата клинични случаи са доказани бройни отклонения в кариотипа: -13,-14,-1,+9 и +19 хромозоми. От изключително значение при ЕМП е изследването за наличие на парапротеин в серума и урината. М-компонент се установява само при около 14-25% от случаите. При изследването на 46 пациента с ЕМП Galieul et al.[12] установяват М-компонент само при 10%. **Задължителният панел, необходим да отдиференцира ЕМП от ММ** включва ПКК, изследване на бъбречната функция, серумно ниво на калций, урина (за Бенс-Джонс), рентгенографии на костната система, КАТ, ЯМР, ФГС, ФКС, ПЕТ/СТ, биопсия на меки тъкани (задължителна за хистологична верификация на туморния процес), миелограма и трепанобиопсия.

[1,6,8,10]Терапевтичният подход в тези случаи е хирургичен - тотално отстраняване на туморните образувания с последваща лъчетерапия с ООД 48-50 Грея.[4]

Първичният ЕМП на черепната база е рядко срещаща се плазмоклетъчна неоплазия. Средната възраст на пациентите е 55 г.(28-60г), но в болшинството от случаите се засягат предимно млади хора.[11]Проявя се със симптоми на увреда на черепно-мозъчни нерви, главоболие, диплопия, прогресивно отслабване на зрението. [9]Локализацията на ЕМП в черепната база е категоричен предиктор за прогресия на заболяването в мултиплен миелом,като 30-50% от случаите прогресират в рамките на 1,5-2,5г. [3,15]

Представяне на клиничен случай:

Жена на 29 години, по професия медицински лаборант се представя с оплаквания от пристъпи на силно главоболие с челна локализация, диплопия и намаление на зрението, появили се през м. Ноември 2012 г.От проведената КАТ на глава през м.01.2013 г. се регистрират две туморни маси: едната от които ангажира сфеноидалния синус, кливуса и основата на ПЧЯ и е с размери 4/4см, а втората представлява остеолитична лезия в лява парietална област, с мекотъканна компонента и деструктира костта без инвазия на дура матер (фиг.1)



Фиг.1 Данни за туморно ангажиране на сфеноидалния синус и остеолитична лезия в лява парietална област

През м.02.2013г. при болната е осъществена двуетапна оперативна интервенция –сублабиална транссфеноидална краниотомия, последвана през м.03.2013г от декомпресивна ляво-париетална краниотомия. Туморите са екстирпирани тотално и е осъществена титаниева алопластика на парietалната кост (фиг.2).



Фиг.2 Състояние на главния мозък след оперативната интервенция

Хистологичното изследване на двата тумора показва наличие на плазматични клетки експресиращи:CD45+ в 50%; CD138+ в 100%; CD56+и е със заключение: данни за ниско диференциран плазмоцитом.

Пациентката е насочена към клиниката по хематология при УМБАЛ „Св. Марина“ Варна за диагностично доуточняване и лечение. На табл. 1 са представени резултатите от проведените клинично-лабораторни изследвания.

Табл.1 Резултати от изследвания на кръв, костен мозък и костна система

Изследван показател	Описание
Периферна кръвна картина	Hb 109g/L, Ery 3,97x10 ¹² /L, Hct 0,33, Leuco 10,3x10 ⁹ /L, Ttr 446x10 ⁹ /L
Биохимия	urea 3,1mmol/l, creat 64umol/l, общ белтък71g/L, alb43g/L, LDH286U/l, b2MG1,54mg/l, Ca 2,4mmol/L
М-градиент (20.03.2013)	Липса на М-градиент
Миелограма (20.03.2013)	Нормоцелуларен костен мозък със запазено зреене на трите реда на хемопоезата. Плазматични клетки 3%
Трепанобиопсия (02.04.2013)	Нормоцелуларен костно-мозъчен паренхим като на места е налице хиперцелуларитет до 70-80%, с умерена хиперплазия на трите кръвни реда, с олевяване в миелоидната редица;доминиране на еритроидните прекурсори;мегакариоцити- зрял морфологичен тип;липсва фиброза.
X-ray (череп, таз и ребра)	Без данни заостеолитични лезии

Осъществена е локална лъчетерапия (месеци 04 - 06.2013 г) на черепната база, сфеноидалните синуси и етмоидалните клетки - общо 5 сеанса при ДОД 2 Gy и обща доза 50 Gy. През м. 07.2013 г е направена пост-лъчетерапевтична преоценка на заболяването с магнитен резонанс (МР): МР данни за променен сигнален интензитет в зоната на деформирания сфеноидален синус (фиг.3), които са интерпретирани като постоперативни промени в зоната. С препоръка за контролен МР след 6 месеца



Фиг.3 Състояние след лъчетерапия – липсват МР данни за туморен инфилтрат

Табл.2 Резултати от изследвания на кръв, костен мозък и костна система в динамика

Изследван показател	Описание
Периферна кръвна картина	Нв 110g/L, Ery3,8x10 ¹² /L, Hct 0,31, Leuco13,6x 10 ⁹ /L, Tr229x10 ⁹ /L
Биохимия	urea5,9mmol/l, creat143umol/l, общ белтък 94,9g/L, alb32g/L, Алфа амилаза 886umol/l, Ca3,73mmol/L, CRP195,48
Уринен анализ	белтък на Бенс- Джонс/-отр
Миелограма	Нормоцелуларен костен мозък с олевяване на белия ред.Плазматични клетки - под 2%
Флоуцитометрично изследване на костен мозък	Не се установява патологична популация при изследването съсCD10,CD14, CD19,CD20,CD38,CD45,CD56,CD117,CD138,smKappa,smLambda
Изследване на парапротеин	парапротеин IgAkappa:37,8%=29,79g/L
Трепанобиопсия	Кръвни съсиреци, сред които гнезда от атипични клетки с морфология на плазматични клетки.ИХХ:CD138/+,CD3 и CD20 -/отр.Закл.:Огнищна инфилтрация на костния мозък от плазмоклетъчна неоплазия (фиг.4)
Цитологично изследване на ликвор	Не се откриват туморни клетки
MRI на лумбален отдел	МР данни за дифузно ангажиране на прешлените от патологичен процес. Клиновидно снишено тяло на Тн-10.Конвексно деформирано дорзално очертаниена Л-5 с лека компресия на дуралния сак вдясно парамедианпои лека стеноза на десния неврофорамен.



Фиг.4 Морфологични промени при контролното изследване (28.08.2013 г): гнезда от атипични клетки с морфология на плазматични, CD138/+/

На 22.08.2013г пациентката беше хоспитализирана по спешност с оплаквания от силна болка в корема и лумбалната област, придружени от гадене, повръщане и безапетитие.Обективно състоянието се прецени като **тежко увредено. Не се регистрираха** отклонения от дихателната и сърдечно-съдова системи.Витални показатели: РР 110/70, СЧ 86/мин. Коремът беше мек и болезнен в областта на епигастриума. На табл. 2 са посочени новите изследвания на кръв, биохимия, имунологични и образни.

Данните от хистологичното костно-мозъчно изследване дадоха основание да се приеме, че се касае за прогресия на ЕМП в множествен миелом. В полза на това говореха клиничните данни, образните изследвания и високото ниво на моноклоналния протеин.

Започна се лечение по протокол CyBorD: Cyclophosphamide 500mg - D1, D8, D15, D22; Bortezomib 1,3mg/m²-D1, D4, D8, D11; Dexamethasone 40mg-D1-D4, D9-D12; съчетано с интратекално приложение на комбинации между

Cyclophosphamide, Metotrexate, Cytozar, Methylprednisolone.

На фона на провежданото системно лечение, неврологичният статус при пациентката се влоши. Постепенно се оформи долна парапареза със задълбочаващ се ход. Патологичната остеопороза обхваща всички торакални прешлени (фиг.5).



Фиг. 5 MRI на торакален отглед /01.10.2013/Закл. Множествени огнищни костни лезии, резултат от мултиплен миелом в телата, гъбите и израстъците на всички торакални прешлени

ОБСЪЖДАНЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ЕМП на черепната база е изключително рядко срещаща се локализация на този вид туморни образувания. В англоезичната литература са описани само 35 подобни случая в Света.[13] Счита се, че тази локализация е предиктор за прогресия на ЕМП към мултиплен миелом, като обичайно това се случва в рамките на първите 2 г., но са описани случаи на прогресия след 7-23 години.[7] ЕМП на черепната база се среща значимо по-често при жени (89%). При всички наблюдавани жени е регистрирана прогресия на болестта в рамките на първите 8 месеца от поставянето на диагнозата. Бърза еволюция наблюдавахме и при нашата пациентка, при която фаталния изход настъпи 10 месеца след поставяне на диагнозата ЕМП. При данни за ЕМП се препоръчва ранна тотална екстирпация на туморната маса с последваща краниална лъчетерапия с ООД 48-50 Грей. Въпреки съвременното лечение прогнозата при млади пациенти с тази първоначална локализация, за съжаление, все още остава много лоша.

БИБЛИОГРАФИЯ:

1. Akhlak Hussain,1 Mohinder Singh,1 Kuldeep Singh,1 and Harjot Bagga21Department of Surgery, Rajindra Hospital, Patiala 147001, India2Department of Radiotherapy, Rajindra Hospital, Patiala 147001, IndiaReceived 21 November 2012; Accepted 16 January 2013Academic Editor: Abhay R. Satoskar - Case Report-Multiple Extramedullary Plasmacytoma with Lytic Bony Lesions: A Rare Case Report Case Reports in Medicine Volume 2013 (2013), Article ID 291359, 3 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/291359>
2. Alexiou C, Kau RJ, Dietzfelbinger H, Kremer M, Spiess JC, Schratzenstaller B, et al. - Extramedullary plasmacytoma: tumor occurrence and therapeutic concepts. Cancer 1999; 85(11):2305-14.
3. Cerase A, Tarantino A, Gozzetti A, Muccio CF, Gennari P, Monti L, Di Blasi A, Venturi C- Intracranial involvement in plasmacytomas and multiple myeloma: a pictorial essay.. PMID:18516599[PubMed - indexed for MEDLINE]
4. Federico L. Ampil1, T. Greg Borski2, Cherie Ann O. Nathan2, Gregory Mulcahy2, Michael Walker1, Hong W. Chin1 and Fred J. Stucker21-Division of Radiation Oncology, Department of Radiology, Louisiana State University Health Sciences Center, 1501 Kings Highway, Shreveport, LA 71130, USA2Otolaryngology Head Neck Surgery, Louisiana State University Health Sciences Center, 1501 Kings Highway, Shreveport, LA 71130, USA2002, Vol. 43, No. 10, Pages 2037-2040 (doi:10.1080/1042819021000015998)
5. Gill MK, Makkar M, Bains SP. Solitary Plasmacytoma of Skull: A Rare Cytological Diagnosis. 2001 Nov;49(5):1039-44;
6. Higurashi M, Yagishita S, Fujitsu K, Kitsuta Y, Takemoto Y, Osano S-Plasma cell myeloma of the skull base: report of two cases.. PMID:15696975[PubMed - indexed for MEDLINE]1997;7(4):503-6.1044-5.
7. International Myeloma Working Group (June 2003). „Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group“. Br. J. Haematol. 121 (5): 749-57..
8. Okamoto K, Ito J, Furusawa T, Sakai K, Tokiguchi S, Sato M, Tanaka R, Nemoto K, Oyanagi K.-Solitary plasmacytomas of the occipital bone: a report of two cases. PMID:9204328[PubMed - indexed for MEDLINE] 2013 Aug;7(8):1702-1703. Epub 2013 Aug 1.
9. Ozdemir S, Tarkan O, Tuncer U, Sürmelioğlu O, Doğrusöz M, Ergin M.-SourceDepartment of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Cukurova University School of Medicine, Adana, Turkey. drsozdemir@gmail.com.A case of extramedullary plasmacytoma in the sphenoid sinus with unilateral loss of vision. 2013 Mar;41(2):140-3. doi: 10.1016/j.jcms.2012.06.006. Epub 2012 Jul 12
10. PIERO GALIENI,* MICHELE CAVO,° ALESSANDRO PULSONI,# GIUSEPPE AVVISATI,# CATIA BIGAZZI,*STEFANO NERI,@ UMBERTO CALICETI,^ MONICA BENNI,° SONIA RONCONI,° FRANCESCO LAURIA**Chair and Division of Hematology, Sclavo Hospital, Siena; °Institute of Hematology "Seràgnoli", University of Bologna;#Chair of Hematology, University "La Sapienza", Rome; @Institute of Radiotherapy, University of Bologna;^Institute of Otolaryngology, University of Bologna, Clinical outcome of extramedullary plasmacytomaHaematologica 2000; 85:47-51
11. Richard O. Wein, Saurin R. Popat, Timothy D. Doerr, and Paul O. Dutcher-Skull Base.: PMC1656911Plasma Cell Tumors of the Skull Base-Four Case Reports and Literature Review- 2002 May; 12(2): 77-86. PMCID

12. Richard O. Wein, Saurin R. Popat, Timothy D. Doerr, and Paul O. Dutcher- Plasma Cell Tumors of the Skull Base- Four Case Reports and Literature Review- -12(2): 77–86. PMID: PMC1656911
13. Suzanne R Fanning, DO Fellow, Department of Hematology and Medical Oncology, Cleveland Clinic Foundation, 2004-2007 Director, Hematology, Greenville Memorial Health System, Greenville, SC Medical Oncologist/Hematologist/Transplant Physician, Cancer Centers of the Carolinas
14. Sung Hoon Park, M.D.,¹Young Zoon Kim, M.D.,¹Eun Hee Lee, M.D.,² and Kyu Hong Kim, M.D.¹ Korean Neurosurg Soc. Endoscopic Endonasal Transsphenoidal Resection of Solitary Extramedullary Plasmacytoma in the Sphenoid Sinus with Destruction of Skull Base2009 August; 46(2): 156–160. Published online 2009 August 31. doi: 10.3340/jkns.2009.46.2.156PMCID: PMC2744026
15. Schwartz TH, Rhiew R, Isaacson SR, Orazi A, Bruce JN- Association between intracranial plasmacytoma and multiple myeloma: clinicopathological outcome study.. PMID:11846895[PubMed - indexed for MEDLINE] 2008 Aug;50(8):665-74. doi: 10.1007/s00234-008-0390-x. Epub 2008 May 31.

Адрес за кореспонденция

д-р Мерлин Мехмед – Ефраим,
Клиника по клинична хематология,
УМБАЛ „Св. Марина“ ЕАД, Варна
бул. “Хр.Смирненски” 1
е-mail: merlinerolmehmed@abv.bg

РЕДАКЦИОННА РУБРИКА

НОВИ АКАДЕМИЧНИ ДЛЪЖНОСТИ ЗА НАШИ ИЗТЪКНАТИ КЛИНИЦИСТИ ХЕМАТОЛОЗИ И НАУЧНИ РАБОТНИЦИ

Подобно радостно събитие клиничната хематология в нашата страна не познава. За кратък период от време получиха нови академични длъжности плеяда изтъкнати наши хематолози, имунолози и генетици, работници в сферата на клиничната хематология. Пътят прокара проф. д-р Ставри Тошков (генетик и Изпълнителен директор на НСБАЛХЗ) и за няколко месеца бе последван от проф. д-р Георги Михайлов (началник клиника по хематология към НСБАЛХЗ и национален консултант), проф. д-р Маргарита Генова (началник на лаборатория по хематопатология и имунология към НСБАЛХЗ и председател на Българското медицинско сдружение по хематология), проф. д-р Георги Балаценко (началник на лаборатория по цитогенетика и молекулярна биология), проф. д-р Жанет Грудева – Попова (началник клиника по Хематология и Онкология към УМБАЛ „Св Георги“ - Пловдив). Д-р Георги Арnaudов - завеждащ Трансплантационното отделение към НСБАЛХЗ е новият „доцент“, а „професурата“ е в ход и за доц. Донка Василева (завеждащ Радиогичния сектор към НСБАЛХЗ). Д-р Бранимир Спасов пък успешно защити дисертационен труд и е с новоприсъдена научно-образователна степен „Доктор“.

Честито! Пожелаваме на нашите нови професори и доценти успехи в научно-изследователската дейност и издигане на родната хематология на още по-авторитетно ниво!

НОВИ СПЕЦИАЛИСТИ ПО КЛИНИЧНА ХЕМАТОЛОГИЯ

На майската сесия т.г. пред двете Държавни комисии с председатели проф. Стефан Горанов и доцент Юлиан Райнов, се явиха д-р Мартин Дончев, д-р Виолета Попова от СБАЛХЗ - София и д-р Калина Игнатова от УМБАЛ „Александровска“ - София.

Тримата кандидати се представиха успешно на практическия и теоретичен изпит и напълно заслужено им бе призната медицинската специалност „Клинична хематология“. Така пооредялата гилдия на хематолозите в страната се попълни с още 3 нови специалисти.

Управителният съвет на Българското медицинско сдружение по хематология (БМСХ) и редколегията им честити специалността, като им пожелава професионални и научни успехи в клиничната хематология.

Подобно радващо събитие е и одобрението за участие на наши млади хематолози в т.нар „мастер клас по хематология“, организирано от Европейската хематологична асоциация (ЕНА). Пожелаваме на нашите млади колеги д-р Катя Сапунарова от УМБАЛ „Св. Георги“ - Пловдив и д-р Камелия Милчева от ВМА - София успешно представяне на учебните и научни форуми.

ПРЕПОРЪКИ КЪМ АВТОРИТЕ

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

1. Ръкописите се представят в два идентични екземпляра, написани на стандартни машинописни страници (30 реда, 60-66 знака на ред) или се изпращат в електронен формат.
2. Имената на авторите (разположени под заглавието) са в порядъка: собствено (съкратено с една буква и точка) и фамилия, следвани от местоработата.
3. Материалите не трябва да превишават следните размери:
 - **За Оригинални статии**, включително илюстрации и библиография (до 10 източника) без резюметата – 5-6 страници.
 - **За Обзори** – 10-15 страници.
 - **За раздел “Казуистика”** (лечебни, диагностични методи и др.) – 3 стр.
 - **За Реферати на статии** – 3 стр.
4. Всяка статия трябва да съдържа следните раздели: 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”, наименование на списанието в съкратен вид според Index Medicus, година на публикуване, том, месец, брой, страници.

Цитиране на книги и монографии:
Автори, заглавие, място на издаване, издателство, година на издаване, страници
6. Резюмето (до 15 реда) се представя на български и на английски език в три екземпляра, съдържащи имената на авторите и заглавието, както и ключови думи на български и английски език.

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

ВАЖНО ! НОВО !

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

Всички текстови и графични материали се изпращат задължително на електронен адрес: **stefangoranov@yahoo.com**



БЪЛГАРСКО МЕДИЦИНСКО СДРУЖЕНИЕ ПО ХЕМАТОЛОГИЯ

Клиника по клинична хематология
при Медицински университет и Университетска болница „Св Георги“- Пловдив

организируют

XI НАЦИОНАЛНА КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КЛИНИЧНА ХЕМАТОЛОГИЯ

*„Съвременни терапевтични предизвикателства при
възрастни пациенти с индолентни лимфоми и миеломна
болест. Контраверсии“*

**9-11 Октомври 2014
хотел „Империял“- Пловдив**

Основните теми на XIтата Национална конференция
по клинична хематология са:

- ✓ *Съвременна лечебна стратегия при индолентните лимфоми в ерата на таргетната терапия.*
- ✓ *Поддържащо лечение при индолентни лимфоми и мултиплен миелом.*
- ✓ *Лечение на усложнения при мултиплен миелом: миеломна нефропатия, амилоидоза, костни поражения, екстрамедуларен дебют и рецидиви, ортопедични и неврохирургични корекции.*
- ✓ *Трансплантация на стволови клетки.*

Фирма организатор:
Империум ЕООД, 4003 Пловдив, ПК 85, 0889 546 506, sotirov.joro@gmail.com

Повече информация можете да откриете на:
www.bulgarian-hematology.com