

д-р Ваня Славчева Попова

Клинично приложение на прогностичните фактори и интегрирането им в скала за оценка на риска и времето до лечение, при нелекувани пациенти с В-хронична лимфоцитна левкемия

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Направление:7.“ Здравеопазване и спорт“

Професионално направление:7.1.“ Медицина“

Научна специалност: ”Хематология и преливане на кръв “

Научен ръководител:

Проф. д-р Лиана Герчева-Кючукова д.м

Официални рецензенти:

Проф. д-р Людмила Ангелова

Доц. д-р Веселина Горанова, дм

Варна, 2020

Дисертационният труд е представен на 123 страници и е онагледен с 49 фигури и 30 таблици. Библиографията обхваща 199 литературни източника, от които 5 на кирилица и 194 на латиница.

Всички клинични изследвания, свързани с дисертационния труд са проведени на територията на УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД – Плевен, Клиника по Хематология, Централна клинична лаборатория, Медицинска лаборатория по имунодиагностика, Клиника по образна диагностика и Лаборатория по молекулярна биология и цитогенетика към НСБАЛХЗ – София и са базирани на два научноизследователски проекта финансирани от Медицински Университет- грл Плевен

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Разширен Катедрен съвет при Втора катедра по Вътрешни болести, Медицински Университет- гр. Варна

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои
на 20.11.2020г от 14.00 часа в Платформата на Blackboard на МУ-Варна.

Състав на Научно жури:

Председател:

Проф. д-р Людмила Ангелова - рецензия

Членове:

Доц. д-р Илина Мичева, д.м становище
Проф. д-р Стефчо Горанов, д.м.н становище
Проф. д-р Маргарита Генова, д.м становище
Доц. д-р Веселина Горанова, д.м рецензия

Материалите по защитата са публикувани на страницата на МУ-Варна <http://www.mu-varna.bg>

СЪДЪРЖАНИЕ

<i>Списък на използваните съкращения.....</i>	<i>4</i>
<i>Въведение.....</i>	<i>6</i>
<i>Цели и задачи</i>	<i>8</i>
<i>Изследователски методи.....</i>	<i>10</i>
<i>- място и време на проучването</i>	
<i>- лабораторни и инструментални методи на изследване</i>	
<i>- статистически методи</i>	
<i>Резултати от проучването.....</i>	<i>14</i>
<i>- пациентски групи</i>	
<i>- демографски показатели и TTFT</i>	
<i>- стадий на заболяването и TTFT</i>	
<i>- серумни маркери и TTFT</i>	
<i>- генетични и молекулярни маркери и TTFT</i>	
<i>- рискови групи и TTFT</i>	
<i>Дискусия.....</i>	<i>42</i>
<i>Заключение.....</i>	<i>58</i>
<i>Приноси.....</i>	<i>60</i>
<i>Приложение 1.....</i>	<i>61</i>
<i>Научни публикации и съобщения свързани с дисертационния труд.....</i>	<i>63</i>

Използвани съкращения:

B-CLL- В хронична лимфоцитна левкемия

β -2 MG- бета 2 микроглобулин

ABLС- абсолютен В- клетъчен лимфоцитен брой

LDT - време на удвояване на лимфоцитите

TTFT- време до първо лечение

OS- обща преживяемост

IGVH – мутационен статус

FIt3- fms-подобна тирозин киназа 3

c-kit- протоонкоген c-kit

IL7R- рецептор за интерлевкин 7

PU.1- транскрипционен фактор PU.1

Ikaros-ДНК- свързващ протеин Ikaros

EBF1- ранен В-клетъчен фактор 1

PAX-5- В-клетъчен специфичен транскрипционен фактор

Fox01- транскрипционен фактор Fox01

Runx1- свързан с Runx1 транскрипционен фактор 1

c-Myb- прото-онкоген

RAG гени- рекомбинантни активиращи гени

BCR- В-клетъчен рецептор

NF-кВ – нуклеарен фактор кВ

SF3B1- сплайсинг фактор 3В на субединица 1

CXCR4- C-X-C хемокинов рецептор тип 4

smIg-мембранносвързан имуноглобулин

SRC- протеин киназа

LYN- протеин киназа

SYK-спленална тирозин киназа

PI3K- фосфатидилинозитол 3-киназа

ВТК- Брутон тирозин киназа

PKC- протеин киназа C

TNF- туморнекротизиращ фактор

VLA- 4 интегрин алфа 4бета1 –много късен антиген / интегрин

VCAM- 1 съдово-клетъчна адхезионна молекула 1

MBL- моноклонална В-клетъчна лимфоцитоза

DLBCL- дифузен В-едроклетъчен лимфом

СТ- компютърна томография

PET- позитронно- емисионна томография

FISH- флуоресцентна ин ситу хибридизация

VEGF- васкуларен ендотелен растежен фактор

Mcl-1- антитапозен протеин

AID- активация индуцираща цитидин деаминаза

DNA- ДНК

ATM- атаксия телеангиектазия ген

NOTCH1- ген кодиращ трансмембранен протеин

PFS -преживяемост без прогресия

RT-PCR- Real time полимеразна верижна реакция

LPL – липопротеин липаза

ADAM29–ADAMметалопептидаза домейн 29

NAD- никотинамид аденин динуклеотид

cADPR- циклична ADPрибоза

NAADP- никотинамид аденин динуклеотид фосфат

MMP-9- матриксна металопептидаза 9

TLRs- Toll-подобни рецептори

СИТ- имунохимиотерапия

WBC- левкоцитен брой

Епидемиологични данни и актуалност на проблема:

Хроничната лимфоцитна левкемия (CLL) е една от най-честите левкемии сред възрастните. Заболяването се среща предимно в страните от западния свят и сравнително рядко в азиатските държави. Средната възраст при поставяне на диагнозата е около 70г. Рискът от заболяване прогресивно нараства с възрастта. По литературни данни повече от 70% от пациентите са на възраст по-голяма от 65 години и значителна част от тях имат повече от две съпътстващи заболявания (*Pinilla-Ibarz et al, 2015; Strati, P et al, 2019*).

За България заболяемостта сред мъжете от всички възрастови групи е 5,0 на 100 000 души при световни стандартни нива 3,7 и респективно 2,9 спрямо 2,1 за жени към 2014г. (*Валерианова З, и кол. 2014*).

Клиничното протичане на заболяването е изключително пъстро и променливо. Макар и подаваща се на контрол за различен период от време, болестта от вяло протичаща може да премине в агресивна форма. През 2008г. бе преразгледано определението за В-CLL и към настоящият момент за поставяне на диагнозата В-CLL се изисква: присъствие на ≥ 5000 кл/ μ л морфологично зрели, моноклонални В-лимфоцити, експресиращи В-клетъчните антигенни маркери CD19, CD23, ниски нива на sIgM и ко-експресия на Т-клетъчния антиген CD5., в периферната кръв, в продължение на не по-малко от 3 месеца. Критичният праг от абсолютен лимфоцитен брой (ABLC) ≥ 5000 кл/ μ л бе заменен с абсолютен В-клетъчен лимфоцитен брой. Това послужи като основа за въвеждане на понятието моноклонална В-клетъчна лимфоцитоза (MBL) и рекласифициране на пациентите от ранните стадии Rai 0 /I в MBL или дребноклетъчен лимфоцитен лимфом (*Marti E Gerald 2008*).

Поради общопризнатият факт, че около 80-85% от новодиагностицираните пациенти остават под наблюдение, както и с цел да се предскаже еволюцията и установи контрол върху болестта, години наред се търсят измерими показатели, които да са надеждни, стабилни и в същото време свързани със сложните и не съвсем достатъчно познати патогенетични процеси, протичащи в неопластичните клетки.

Прогностичните фактори са променлива величина, която се оценява преди започване на лечението и въз основа на която може да се очаква добър или лош клиничен резултат, независимо от избора на терапия (*Simms L et al, 2013*). Някои от тях могат да бъдат разгледани като прогностични и предиктивни фактори (*Nalejska, E., et al 2014*).

В клиничната практика те са въведени за да идентифицират кои от пациентите ще се нуждаят от ранно лечение, за определяне на времето до инициране на лечението, за избора на риск-адаптирана терапия (токсичност на медикамента), както и за определяне на стратегия за проследяване на пациентите. За периода след 2000г, благодарение на развитието и усъвършенстването на имунологията, имуногенетиката и молекулярната биология, редица авторски колективи интензивно са разработили и предложили прогностични модели, индекси и скали за стратифициране на риска при пациентите с новодиагностицирана В-CLL. Геномните аберации, красноречиво наричани от някои автори “moving target”, динамично променящи се през целия курс на заболяването (*Amaya-Chanaga et al, 2016*), присъстват в повечето модели за оценка на риска, както и при избора на лечение. Мутационният статус на гените за променливия регион на имуноглобулиновата тежка верига (IGH), дефиниран посредством методите на секвениране, е устойчив показател който не търпи промяна в хода заболяването. Разгледани в комплекс с т. нар “класически прогностични фактори”, последните служат като основа за изграждане на прогноза и избор на таргетна терапия и са част от представения през 2016г международен прогностичен индекс- CLL- IPI. Въпреки, че първоначално е разработен за прогнозиране на общата преживяемост, няколко клинични изпитвания обхващащи многочислени групи пациенти, валидират използването му при оценка на времето до започване на начално лечение (*Parikh AS 2018*). Последният показател, както и факторите оказващи влияние върху него са изключително важни и изискват добро познаване, тъй като взети заедно те косвено отразяват агресивността на болестта и са свързани с преживяемостта и изхода на заболяването.

В клиничната практика, извън двете стадиращи системи, реално изпълнимите методи за диагностика, оценка на риска и мониториране на заболяването, се свеждат до флоуцитометричния анализ, флуоресцентна ин ситу хибридизация и PCR. Към настоящия момент за страната ни липсват единно мнение и докладвани проучвания, основани на доказателства, свързани с комплексна оценка на достъпните молекулярно-генетични и класическите прогностични фактори, въпреки че необходимостта от по-точна оценка на риска от прогресия става все по- значима предвид навлизащите в практиката нови медикаменти за лечение на В- CLL.

Работна хипотеза

Различното и променливо клинично протичане на хроничната лимфоцитна левкемия при пациентите, класифицирани в един и същи клиничен стадий, вероятно е свързано с различния молекулярно-генетичен профил на всеки един от тях. Фактът, че част от установените досега неблагоприятни прогностични маркери присъстват още към диагностициране на заболяването и като синоним на агресивност определят по-кратко време до започване на антилевкемичната терапия, предполага необходимостта от ранното им идентифициране при всеки един болен от В-CLL. Комплексното проследяване на сурогатни на мутационния статус маркери, хромозомни нарушения, молекулярни отклонения с доказала се в клиничната практика стойност на класически прогностични фактори, би допринесло за по-прецизно стратифициране на риска и прогнозиране на времето до необходимост от лечение при пациентите с новодиагностицирана В-CLL. Същевременно поради факта, че някои от прогностичните фактори изпълняват ролята и на предиктивни маркери, определянето им би подпомогнало избора на терапия, адаптирана към конкретния пациент, ефективна, лишена от ранни и късни нежелани последици, и в същото време осигуряваща по-добро качество на живот, ограничавайки необходимостта от продължителни хоспитализации.

Цел на дисертационния труд:

Да се проучи и анализира въздействието на достъпни клинично-лабораторни и молекулярно-генетични фактори, свързани със специфичните характеристики както на пациента, така и на неговото заболяване, и да се оцени тяхното влияние върху времето до необходимост от стартиране на лечение при нелекувани болни от В-CLL.

Задачи на дисертационния труд:

- ✓ 1. Да се проучи демографския показател възраст и значението му като фактор, свързан с времето до лечение при пациентите с нелекувана В-CLL.
- ✓ 2. Да се анализира значението на определения при диагностицирането стадий на заболяването, като прогностичен фактор, свързан с ТТФТ.
- ✓ 3. Да се потърси корелационна зависимост между серумния маркер β -2 MG и времето до лечение.

- ✓ 4. Да се проучи честотата на някои клинично значими хромозомни аберации сред нелекуваните пациенти с В-CLL и разпределението им в зависимост от стадия на заболяването.
- ✓ 5. Да се определи мутационният статус на базата на сурогатните маркери LPL, ADAM29 и да се потърси връзка между молекулярните и генетичните промени при пациентите с нелекувана В-CLL.
- ✓ 6. Да се направи комплексна оценка на прогностичните фактори и значението им при определяне на времето до необходимост от лечение.

Изследователски методи:

Място и време на проучването

Проучването беше проведено на територията на: УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД – Плевен, включващо звената: Хематологичен кабинет, Клиника по Хематология, Централна клинична лаборатория, Медицинска лаборатория по имунодиагностика, Клиника по образна диагностика и Лаборатория по молекулярна биология и цитогенетика към НСБАЛХЗ – София.

Периодът на проучването бе в рамките на три години 2016-2019г. Дизайнът включва два типа наблюдение: проспективно и ретроспективно. При реализиране на проучването са участвали обучени медицински специалисти от гореизброените звена. В проучването са включени общо 97 пациента с документирана В-CLL, на възраст над 18 години.

Използвани са данни от наличната медицинска документация и лабораторни изследвания. Изготвена е анкетна карта на пациента, представена като приложение 1. Проведени са рутинни лабораторни тестове включващи: пълна кръвна картина, диференциално броене, биохимичен панел. Допълнително, в случаите на съмнение за съпътстващи основното заболяване, автоимунна хемолитична анемия и/или тромбоцитопения, са изследвани: тест на Кумбс, ретикулоцитен брой, антиромбоцитни антитела. Пациентите с доказан автоимунен феномен не бяха включени в проучването.

Скринингът на пациентите е осъществен на базата на проведен флоуцитометричен анализ на периферна кръв. За целта, след подписване на одобрено от Локалната Етична Комисия на МУ-Плевен информирано съгласие, от всеки пациент чрез венепункция бяха взети три милилитра венозна кръв във вакутейнер, съдържащ ЕДТА. Кръвта бе съхраняванана стайна температура (22-24°C). Всички проби са обработвани в рамките на 6-24 часа след вземането. Левкоцитите бяха анализирани чрез двулазерен флоуцитометър FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) и Cell QuestPro Software (Becton Dickinson). Лимфоцитите са отделени чрез CD45/SSC гейтиране. Използван бе панел от следните моноклонални антитела (Immunostep, Salamanca, Spain); CD45, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD38, CD11a, CD49d, CD29.

Пациентите с т.нар „атипична CLL”, т.е. случаите, при които експресията на CD5, CD23 е слаба до липсваща, или тези със силна експресия на CD20, или комбинация от гореизброените, не са включени в проучването. Пациентите с моноклонална В-клетъчна лимфоцитоза (MBL) с абсолютен лимфоцитен брой $<5,0 \times 10^9/l$, както и тези, отговарящи на критериите за дребноклетъчен лимфоцитен лимфом, също не са включени в проучването.

Стадиращата система

За стадиране на заболяването е използвана стадиращата система на Binet, състояща се от три стадия, както следва:

A Стадий: ангажиране на по-малко от три зони увеличени лимфни възли, липса на анемия и тромбоцитопения от лабораторното изследване на периферна кръв.

B Стадий: три или повече увеличени групи лимфни възли, при липса на анемия и тромбоцитопения от лабораторното изследване на периферна кръв.

C Стадий: наличие на анемия (хемоглобин под 100g/l) и/или тромбоцитопения (тромбоцитен брой под $100 \times 10^9/l$)

Определени са пет анатомични лимфни зони на засягане (*Binet, J.L., et al 1981*):

1. Глава и шия, включително Валдайеров пръстен (приема се като една зона, дори ако има повече от една група увеличени лимфни възли).
2. Аксилярни (независимо от това дали са ангажирани едностранно или двустранно се отчитат, като една засегната зона).
3. Ингвинални (ангажирането на двете ингвинални групи лимфни възли се счита като една зона).
4. Палпиращ се далак.
5. Палпиращ се черен дроб

Допълнително бяха проведени образни изследвания, включващи: рентгенография на гръдна клетка, ехография на коремни органи, компютърна томография. За отклонения от нормата са приети следните размери: на слезката - надлъжен над 130мм, напречен над 50мм; на абдоминалните лимфри възли-над 15мм, установени чрез ултразвукова диагностика (*Даксалов И и кол, 2004*). От компютър-томографското изследване размерите на лимфните възли при възрастни по региони са както следва: лимфаденомегалия се приема когато късата ос на един или повече лимфни възли е по-голяма от 10мм. Регионалните вариации са както следва: ингвинални 10 – 20мм.; малък таз - 10мм. за овоидни (яйцевидни) лимфни възли и 8мм за окръглени (кръгли, заоблени).

Серумен маркер за пролиферативна активност и туморен обем:

За изследване на серумната концентрация на бета 2-микроглобулин е използван 3мл. пресен или замразен серум, добит чрез венепункция, транспортиран във вакутейнер със силиконови частици, които ускоряват процеса на кръвосъсирване.. За определяне на серумната концентрация е използван турбидиметричен метод. Концентрациите са изчислени автоматично спрямо калибрационната крива. Използван е автоматичен протеинов анализатор SPA Plus. Стойностите от 0.80 до 2.35mg/L са приети за референтни граници.

Хромозомни аберации и молекулярни маркери

Флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) бе проведена по стандартен протокол на фирма Vysis (Vysis®; Abbot Molecular Inc., Abbott Park, Illinois, USA) върху интерфазни ядра на изолираните от периферна кръв клетки. За изследването на *p53*, *ATM* и *DLEU1* гените бяха използвани локус-специфични делиционни ДНК сонди: Vysis TP53/CEP17 FISH Probe Kit, Vysis ATM/CEP11 FISH Probe Kit, Vysis D13S319/13q34 FISH Probe Kit. С червения флуорохром са маркирани таргетните гени, а със зеления флуорохром – контролните участъци на хромозомите 11 (центромерен хетерохроматин), 17 (центромерен хетерохроматин) и 13 (теломерен хетерохроматин). Моделите на сигнали върху интерфазните ядра бяха регистрирани и описвани съгласно ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature), 2013 г. Отчитането на сигналите бе проведено на флуоресцентен микроскоп на не по-малко от 200 интерфазни ядра от двама независимо анализиращи специалисти. Делецията на таргетен ген се прие за клинично значима при засегнати повече от 10% от изследваните ядра. За документиране бе използвана система за фотодокументация с дигитална камера и софтуер на фирма “Olympus”.

Експресията на *LPL* и *ADA29* гените беше изследвана чрез мултиплексна полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция [Reverse Transcription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR)]. За целта, от 1 µg тотална РНК, изолирана от ядроносни клетки от периферна кръв чрез Trizol Reagent, беше синтезирана комплементарна ДНК (сDNA) в среда, съдържаща случайни хексамери и MMLV обратна транскриптаза с подходящ буфер. Наличието на годна за анализ РНК и ефективността на обратната транскрипция беше оценено чрез амплификация на β-Actin сDNA. Експресията на *LPL* и *ADAM29* беше определена чрез ко-амплификация на *LPL* и *ADAM29* сDNA с праймерите: *GGAATGTATGAGAGTTGGGTGC* / *CAATGCTTCGACCAGGGGACC* [*LPL*] и *TCTTATGTGGCTGGTGGATCC* / *GACCTAGATGATGAGCCAC-TG* [*ADAM29*] при следните температурни режими: 1x 94°C/5 мин, 30x [95°C/30 сек; 62°C/30 сек; 72°C/30 сек.], 1x 72°C/5

мин. PCR продуктите бяха анализирани чрез електрофореза в 2% агарозен гел, оцветен с SYBR Safe DNA gel stain и визуализация след облъчване с УВ лъчи във фотодокументационна система Vilber Lourmat BLX-254. Очакваната големина на получените PCR продукти беше съответно 445 нд за *ADAM29* и 410 нд за *LPL*. При определянето на *LPL/ADAM29* статуса (като сурогатен маркер на мутационния статус на IGVH), бяха следвани препоръките на Orprezzo et al. (2005): [1] наличие на хипермутации в IGVH при установяване на 1 банд, съответстващ на експресия на *ADAM29* или на 2 продукта, съответстващи на *ADAM29* и *LPL*, [2] немутирал IGVH статус - при наличие на 1 банд, съответстващ на експресия *LPL*. При отсъствие на видими продукти на амплификацията за *ADAM29* и *LPL*, независимо наличието на β -Actin амплификация, съответната проба беше класифицирана като неопределен IGVH статус.

Основни понятия, използвани за оценка:

Време до първо лечение (TTFT) се определя като интервала от диагностициране на заболяването до започване на лечение, или датата на последното проследяване, или смърт (цензурирани).

Индикациите за лечение са съобразени с препоръките на IWCLL-2008г, изброени като текст и табл № 1 (*Hallek M et al, 2008*). Конституционалните симптоми се считат за положителни при наличие на един или повече от един от изброените, свързани със заболяването:

- редукция на телесна маса с 10% или повече, в рамките на предходните 6 месеца
- фебрилитет над 38⁰ с давност две или повече седмици, без данни за инфекция
- обща отпадналост, ECOG2 (функционален статус), невъзможност за извършване на обичайните физически дейности
- нощно изпотяване с давност повече от 1 месец, без данни за инфекция

Таблица №1. Индикации за лечение, съобразно стадия на заболяването (Модифицирана по Hallek M. 2008)

стадии на заболяването	клинична практика
Binet A стадий	не се препоръчва лечение
Binet B стадий	възможно е лечение при данни за активно заболяване
Binet C стадий	подлежат на лечение

Прогресия на заболяването за пациентите от А стадий се приема при наличие на поне един от изброените:

- Постоянно нарастване на лимфоцитният брой, време на удвояване на лимфоцитите по-малко от 12 месеца
- Тенденция за понижаване на стойностите на хемоглобина и/ или тромбоцитите
- Нарастване на размера на лимфните възли, и/ или далак, и/ или черен дроб с 50%.
- Новопоявили се лимфаденомегалия и/ или спленомегалия, и/ или хепатомегалия.
- В симптоми: фебрилитет, нощни изпотявания, загуба на тегло, обща отпадналост.
(*London Cancer CLL Guidelines 2015- 16v 1.0*)

Статистически методи за обработка на данните:

Данните от проведеното проучване са въведени и обработени със статистически софтуерен продукт SPSS 19. За ниво на значимост на направените изводи, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе избрано $p < 0,05$. Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови величини. Някои от данните са обработени с компютърна програма EXCEL. Бяха приложени следните методи: описание на количествени променливи величини, Chi- square test (χ^2 тест на Pearson), Kruskal-Wallis тест, кростабулация за търсене на връзка между категорийни признаци. За сравняване на времето до започване на начално лечение при различните групи пациенти в зависимост от показателите: възраст (фиг. № 4, 5, 6), пол (фиг. № 9), стадии на заболяването (фиг. № 11) ангажиране на далак (фиг. № 12), абсолютен В- клетъчен лимфоцитен брой (№ 14), стойности на серумен бета-2 микроглобулин (фиг. № 15), процент лимфоцити на носещи del13q (фиг. №27), мутационен статус (фиг. № 29), рискови групи според модифициран CLL- IPI (фиг. № 30), бе използван Logrank test (Kaplan–Meier).

Резултати от проучването:

В проучването бяха включени общо 97 пациента с нелекувана В-CLL. В зависимост от обема на проведените лабораторни изследвания, пациентите бяха разделени в три подгрупи (фиг. №1):

- ✓ I група, състояща се от 97 пациента, при които към диагностициране на заболяването бяха проведени: стандартни лабораторни изследвания,

флуоцитометричен анализ на периферни мононуклеарни клетки, ниво на бета 2-микроглобулин и стадиращи процедури.

- ✓ II група, състояща се от произволно избрани от първата група пациенти, при които бе проведена флуоресцентна инситу хибридизация (61 пациента).
- ✓ III група, включваща 48 пациента (произволни подбрани от II група), при които допълнително бе проведен PCR –анализ.

Фигура №1. Разпределение на пациентите по групи в зависимост от проведените лабораторни изследвания

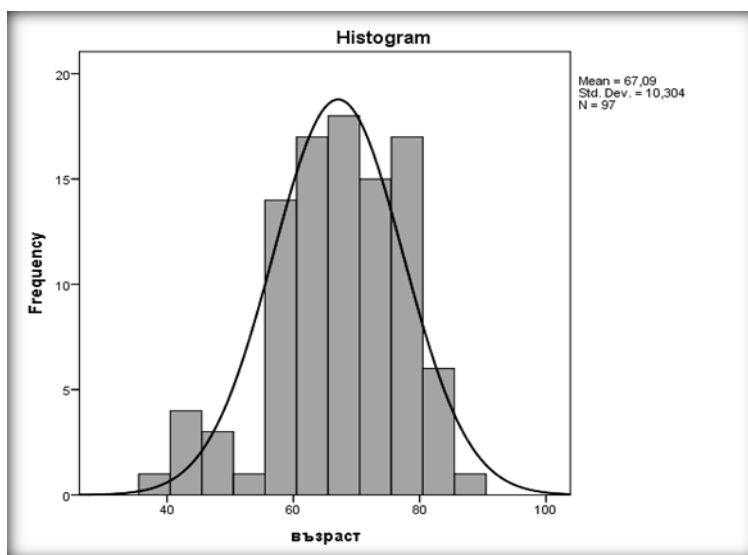


Генетичните нарушения и свързаните с тях прогностично значими хромозомни аберации като: 17p-, 11q-, 13q- бяха изследвани еднократно в рамките на тригодишния период при 61 пациента. От тази група на случаен принцип, при 48 болни беше проведен PCR анализ, метода беше използван като алтернативен вариант за оценяване на мутационния статус.

Демографски показатели и TTFT

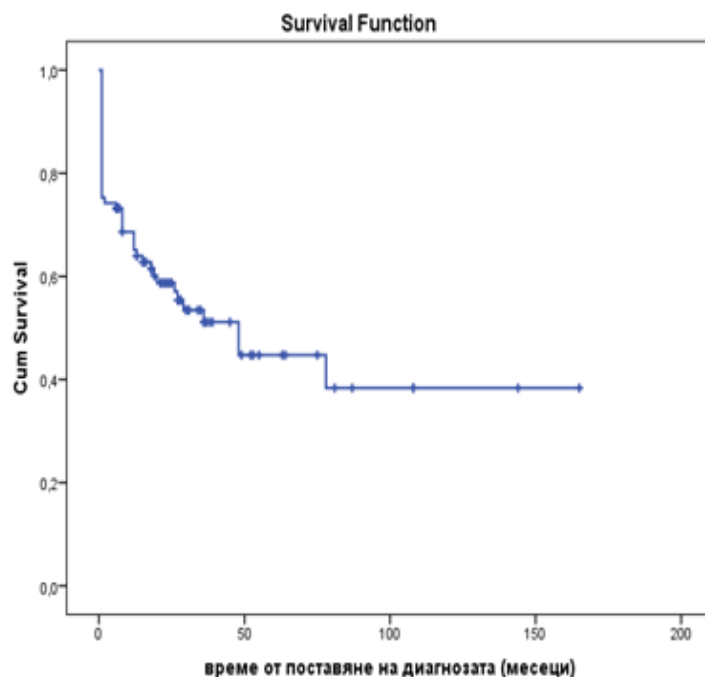
Разпределението на изследваната група от 97 пациента по демографския показател възраст беше параметрично и в графична форма е представено като камбановидна или т.нар. Гаусова крива (фиг.№2). Средната възраст на пациентите беше 67 ± 10 г., като варираше в диапазона от 38 до 89 години.

Фигура №2. Разпределение на пациентите по възраст.



Тъй като данните за фактора TTFT не са параметрични, в групата от 97 пациента определихме медианата на времето до лечение, която беше 48 месеца (фиг.№3).

Фигура №3. Медиана на времето от поставяне на диагнозата до започване на лечение, или последно проследяване



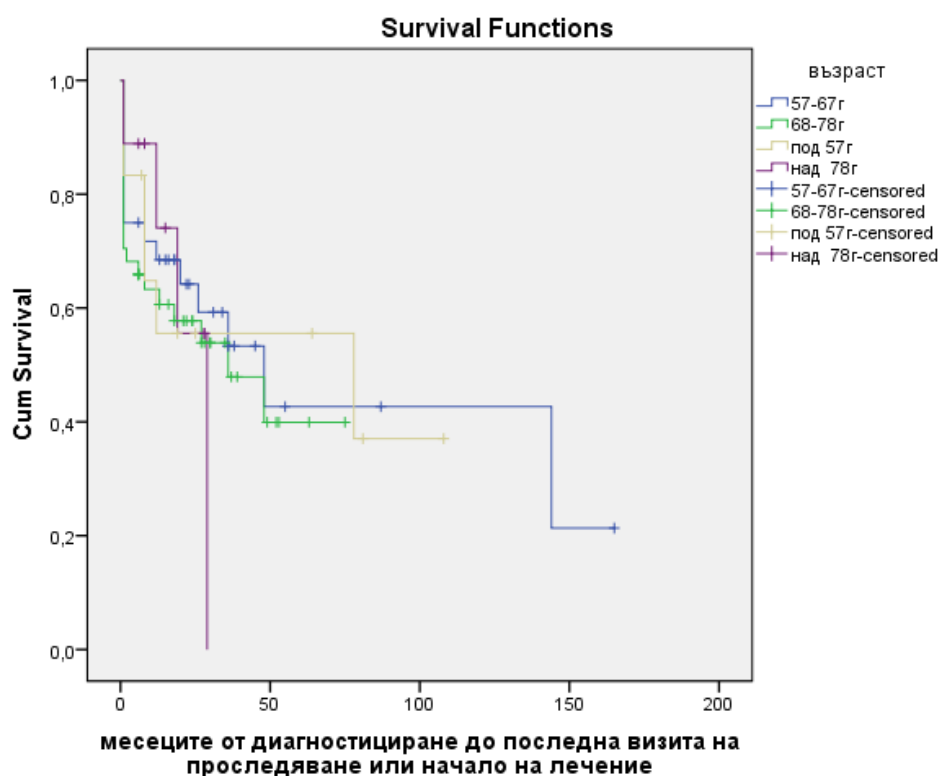
За да изследваме връзката между TTFT и фактора възраст, ние трансформирахме възрастта от интервална в номинална променлива. При определена средна възраст 67г., първоначално разделихме пациентите в четири групи, както следва: 1- възрастова група 57-

67г., 2- възрастова група 68-78г., 3- възрастова група под 57г., 4- възрастова група над 78г., след което потърсихме разлика във времето до лечение за отделните групи, сравнявайки кривите на Kaplan–Meier (табл.№ 2, фиг. №4).

Таблица № 2.Разпределение на пациентите по възрастови групи и TTFT

Група /Възраст	Време до лечение в зависимост от демографския фактор възраст			
	месеци	стандартно отклонение	95% интервал на доверителност	
			Долна граница	Горна граница
1/ 57-67г	76,216	16,084	44,691	107,741
2/ 68-78г	38,523	5,578	27,589	49,456
3/под 57г	57,204	14,426	28,928	85,479
4/над 78г	21,519	4,044	13,592	29,445
общо	69,519	9,830	50,253	88,785

Фигура №4.TTFT за пациентите в четирите възрастови групи (p=0, 915)



При така оформените 4-ри възрастови групи не бе установена значима разлика във времето до първо лечение (Kaplan–Meier, p = 0, 915) (фиг. №4).

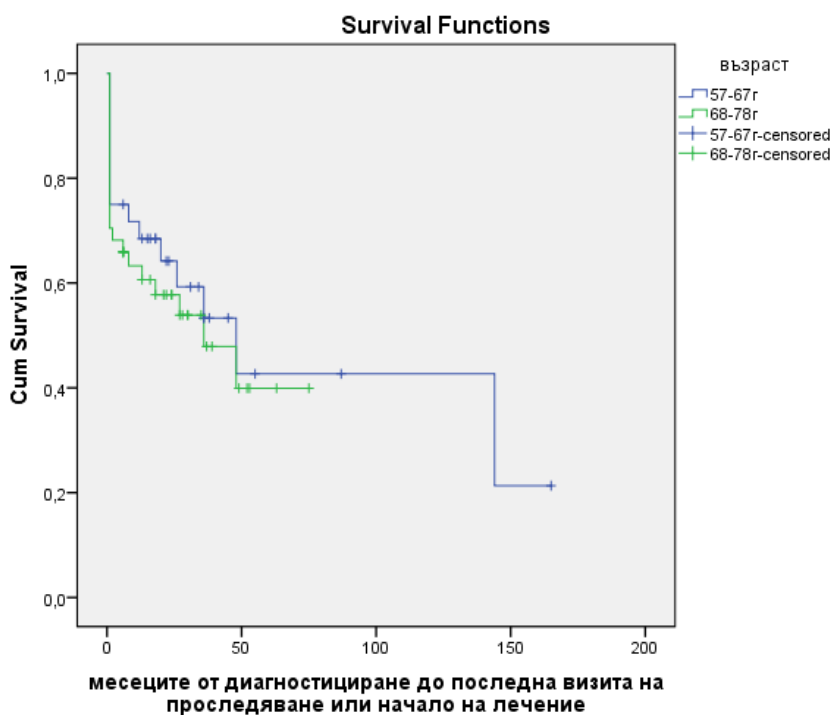
Поради малкия брой на лицата в двете крайни групи 3 и 4, анализирахме групите с най-голям брой болни, съответно 1 и 2 (табл.№3, фиг.№5). При почти балансирано разпределение

на пациентите във всяка една група (пациенти на лечение и нелекувани), потърсихме разлика във времето до лечение за лицата от тези две групи.

Таблица №3. TTFT за пациентите във възрастовите групи 1 и 2

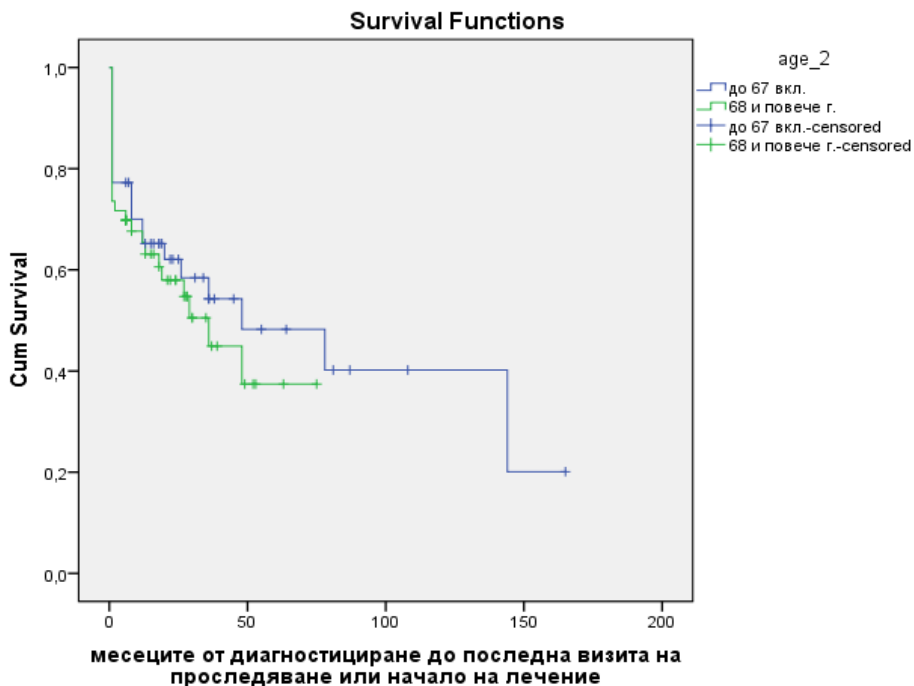
Група/ възраст	Възrastови групи и TTFT			
	месеци	стандартно отклонение	95% интервал на доверителност	
			долна граница	горна граница
1/ 57-67г	76,216	16,084	44,691	107,741
2/ 68-78г	38,523	5,578	27,589	49,456
общо	72,837	10,703	51,858	93,815

Фигура № 5. Време до лечение за възрастовите групи 57-67г. и 68-78г.



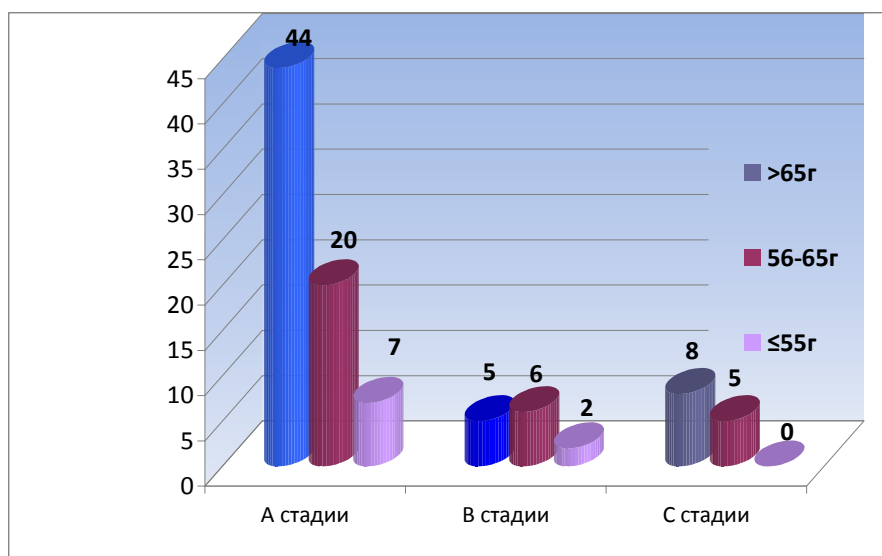
В проведеният анализ не беше установена значима разлика във TTFT между двете възrastови групи. Резултатите от проучването не потвърдиха влиянието на фактора възраст, като значим фактор за TTFT (Kaplan- Meier, $p = 0,596$) (фиг №.5). Дори и при причисляване на младите пациенти (група 3) към първата група и най-възрастните (група 4) към втората група (фиг. №6), възрастта се оказва незначим фактор по отношение на TTFT (Kaplan- Meier, $p = 0,47$).

Фигура №6. Зависимост между показателя възраст и време до лечение, при обединяване на групите (1+3) и (2+4) ($p = 0,47$)



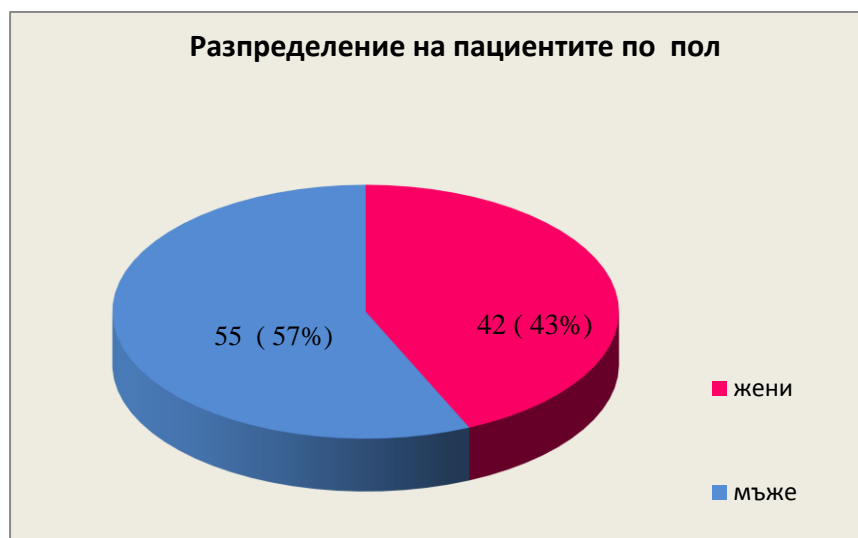
Изследвахме също разпределението на пациентите по възраст в зависимост от стадия на заболяването (фиг №7). От всички обхванати в проучването лица, най-голям беше броят на болните в стадий А (Binet) на възраст >65 години ($n = 44/97$), а най-малка бе групата пациенти на възраст под 55 г. в стадий В ($n = 2/97$). В проучената от нас кохорта нямаше лица под 55 години в напреднал (С) клиничен стадий

Фигура №7. Разпределение на пациентите по стадии и възрастова структура



Структурата и разпределението на пациентите по демографския показател „пол“ бяха както следва: 57%(55) мъже, 43%(42) жени, съответно в съотношение 1,3:1, с превалиране на мъжкия пол (фиг № 8).

Фигура №8. Характеристика на анализиранията група по демографския показател пол



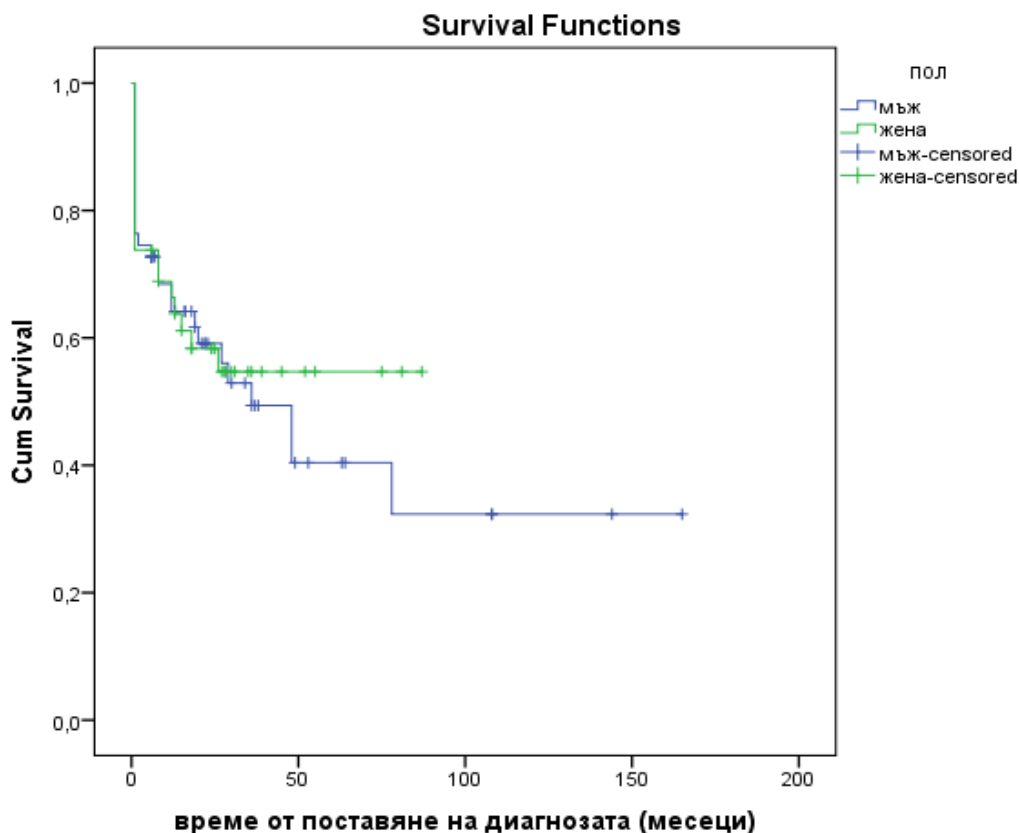
Разпределението на пациентите според показателите пол и стадии на заболяването е представено и на табл. №4.

Таблица №4. Разпределение на пациентите по демографския показател пол

Стадии по Binet	Брой пациенти	
	от мъжки пол (n=)	от женски пол (n=)
А- стадий	36(65%)	35 (83%)
В- стадий	10 (18%)	3 (7%)
С- стадий	9 (16%)	4 (10%)
общ брой	55 (100%)	42 (100%)

Данните от проведения анализ не показаха статистически значима разлика ($p > 0,05$) между двата пола и ТТФТ (фиг №9). Обобщените резултати от нашето проучване не установиха влияние на демографските характеристики възраст и пол върху времето от диагностициране на заболяването до началното му лечение.

Фигура №9. Зависимост между TTFT и демографския показател пол при нелекувани пациенти с CLL



Клинични и лабораторни показатели, определящи стадия на заболяването и влиянието им върху TTFT

Клинични показатели:

Предвид факта, че към времето на диагностициране заболяването не винаги се извява с отклонения в обективния статус, стадирането на пациентите бе проведено на базата на комплексна оценка на резултатите от физикалния статус, образните изследвания (ехография на коремни органи, компютърна томография, рентгенография на бял дроб) и рутинни лабораторни тестове. Резултатите, обобщаващи данните от проведените изследвания и разпределението на пациентите в зависимост от стадия на заболяването са представени на фиг. №10.

Фигура №10. Характеристика на пациентите по показателя стадий на заболяването

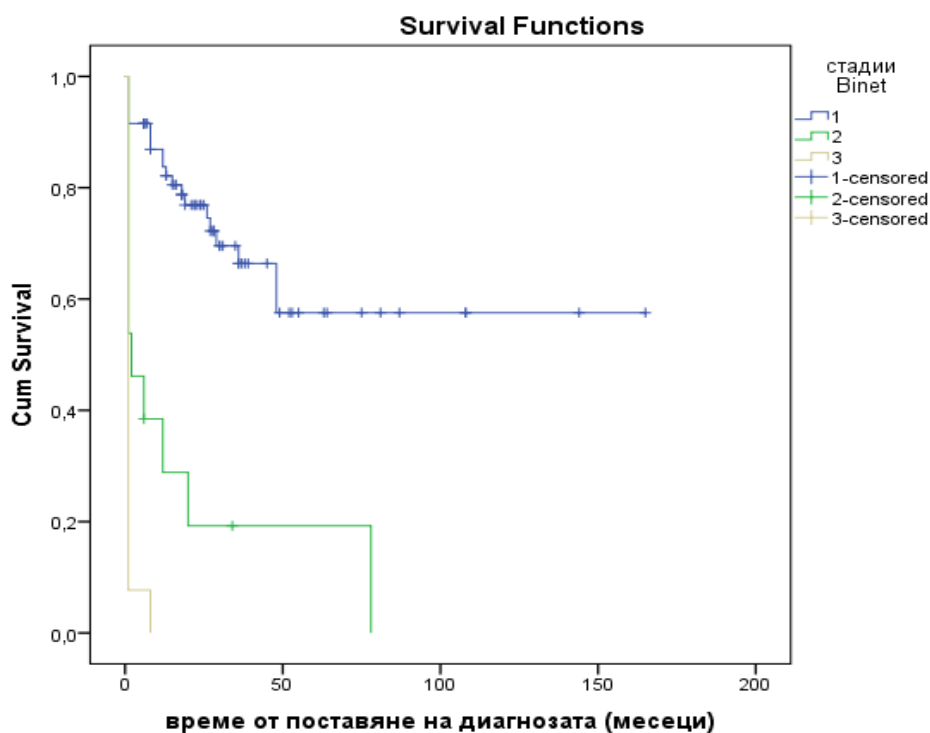


В настоящото изследване установихме, че приблизително 73,2% ($\frac{3}{4}$) от пациентите с В-CLL към диагностициране на заболяването са в ранен А стадий, а останалите 26,8% ($\frac{1}{4}$) са балансирано разпределени между стадии В и С (по 13,4%). Времето до лечение за трите групи пациенти е представено в таблица №5 (Kaplan- Meier анализ). Съществува статистически значима разлика във времето до лечение между групите болни (лог-ранг тест, $p < 0,001$, фиг. №11), като то бе най-кратко за пациентите в стадий С (напреднал) и най-продължително - при пациентите от стадий А.

Таблица. №5. Време до лечение за пациентите с нелекувана CLL

Стадии по Binet	Време до лечение (месеци)			
	средна стойност	стандартно отклонение	95% доверителен интервал	
			долна граница	горна граница
А стадий	104,294	11,142	82,455	126,133
В стадий	19,154	8,976	1,561	36,747
С стадий	1,538	,538	,483	2,594
Общо	75,820	10,011	56,199	95,442

Фигура № 11. Криви на време до лечение по Kaplan-Meier при болни в различни стадии на заболяването (1- А стадий, 2- В стадий, 3- С стадий по Binet)

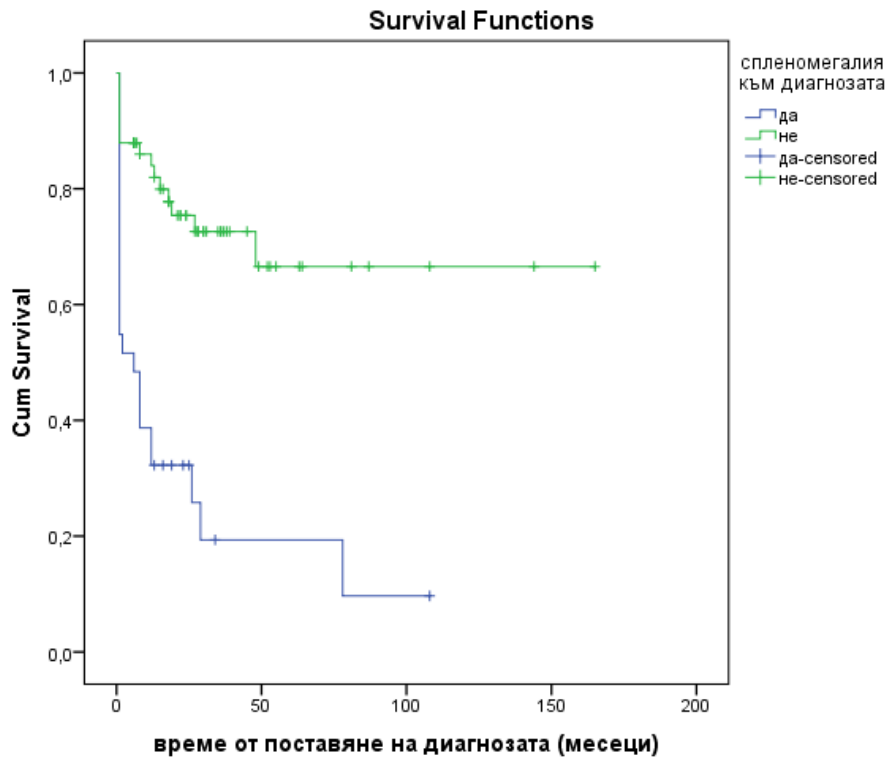


Получените от нас резултати потвърждават значението на клиничния стадий като значим фактор, свързан с TTFT. Потърсихме връзка между ангажирането на далака от заболяването (определено към диагнозата чрез физикален преглед и образна диагностика) и TTFT. За целта разделихме пациентите на две групи, които са представени на табл. №6. Сравнявайки двете групи по показателя TTFT (фиг. № 12), установихме статистически значима разлика в средното време до лечение, което беше съответно $23,8 \pm 7$ мес. за пациентите с доказана спленомегалия и $115,4 \pm 11$ мес. за групата, при която нямаше данни за засягане на далака ($p < 0,001$).

Таблица №6. Разпределение на пациентите по показателя спленомегалия

Спленомегалия	Брой пациенти	
	(N=)	%
да	31	32,0
не	58	59,8
липсват данни	8	8,2
общ брой	97	100

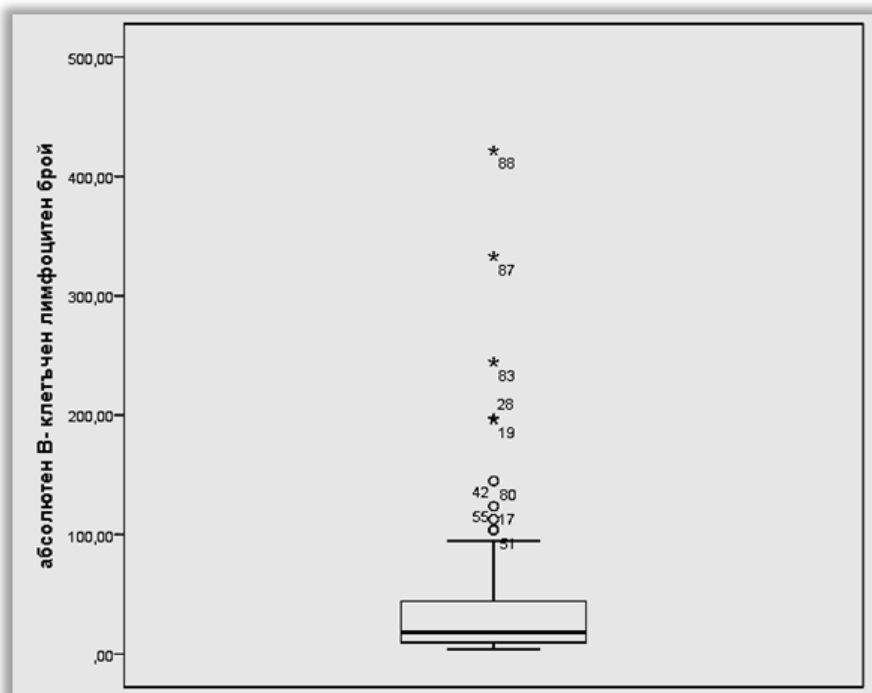
Фигура № 12. Време до лечение в зависимост от ангажирането на далака от заболяването



Лабораторни показатели, свързани с туморния товар

Като част от диагностичния процес при всички пациенти беше проведен панел от стандартни изследвания, включващ пълна кръвна картина, диференциално броење и определяне на абсолютния лимфоцитен брой. При пациентите с абсолютна лимфоцитоза бе проведен флоуцитометричен анализ на периферни мононуклеарни клетки. Абсолютния W-клетъчен лимфоцитен брой беше изчислен, умножавайки процента на CD19/CD5 положителните лимфоцити спрямо общия левкоцитен брой. В изследваната от нас група, този лабораторен показател варираше от $5,2 \times 10^9/l$ до $421,5 \times 10^9/l$. Разгледахме разпределението на пациентите в зависимост от ABLC (фиг. №13) и потърсихме връзка между ABLC и времето до започнато лечение.

Фигура №13. Box & Whisker plot диаграма на разпределение стойностите на абсолютния лимфоцитен брой



За целта разделихме пациентите на 4 групи, представени на табл. №7. Най-голям се оказва броят на болните, започнали лечение при стойности на ABLC над $50(n=21)$, следван от групата със стойности $20-49 \times 10^9/l$. Най-голям брой от пациентите без лечение бяха тези със стойности на ABLC $5-9 \times 10^9/l$ и $10-19 \times 10^9/l$, като съотношението на броя на пациентите в последните две групи беше 1:1. В търсене на асоциация между ABLC и започнато лечение, установихме положителна корелационна връзка със коефициент на Spearman $0,647$ между двата показателя в различните групи болни.

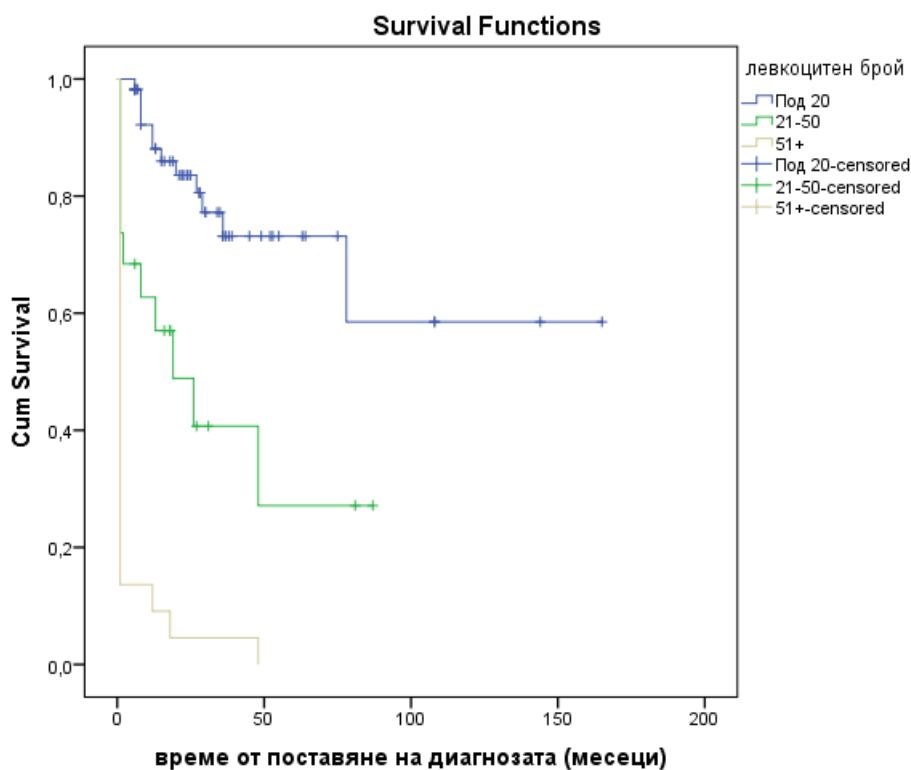
Таблица №7. Разпределение на пациентите по групи в зависимост от определения ABLC

Абсолютен В-клетъчен лимфоцитен брой $\times 10^9/l$	Брой пациенти		Общо
	без лечение	с лечение	
5-9	21	2	23
10-19	21	8	29
20-49	8	15	23
50 +	1	21	22
Общо	51	46	97

Поради малкия брой пациенти в групите с ABLC 5-9 и 10-19x10⁹/л, които са започнали лечение, обединихме последните две групи в една, като оформихме съответно три групи както следва: ABLC ≤20x10⁹/л; 21-50x10⁹/л и ≥ 51x10⁹.

Допълнително разгледахме влиянието на ALBC върху фактора време до започване на лечение и установихме статистически значима разлика за трите групи (p<0,001). Сравнително по-кратък беше този период за групата с ABLC≥51x10⁹/л (4,4 мес±2,2) спрямо групата с ABLC<20x10⁹/л, в която определеното средно време до лечение бе 113мес±14,6 (фиг. №14).

Фигура № 14. Зависимост между TTFT и лабораторния показател ABLC

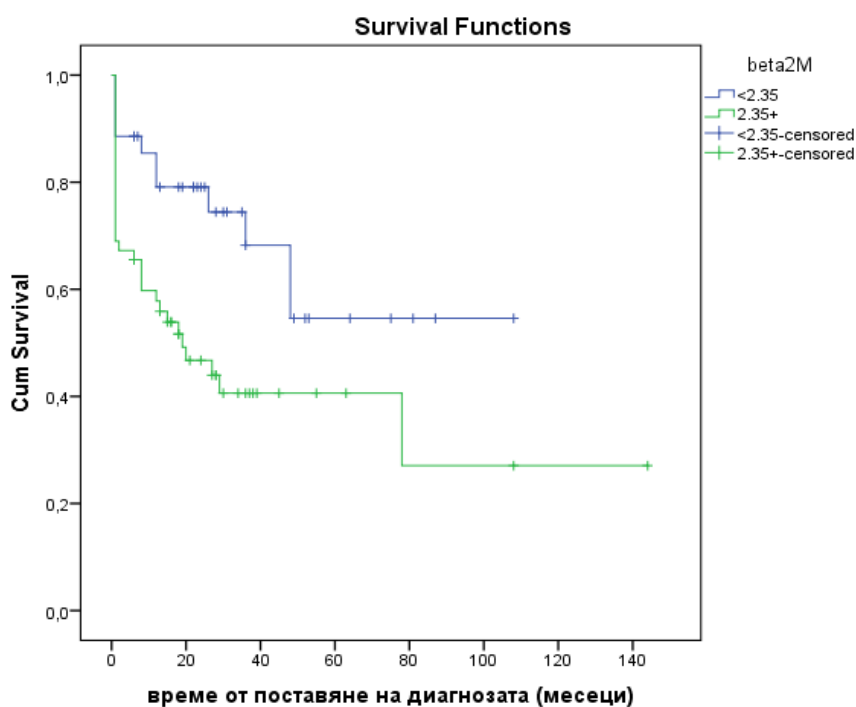


Потърсихме връзка между серумния маркер β2-М, като показател, отразяващ косвено пролиферативната активност и туморния обем, и доколко факторът може да бъде определен като значим по отношение на TTFT. Показателят бе изследван при 93 пациента, като от тях при 35 (37,6%) маркерът бе със стойности под горна референтна граница, а при останалите 58 (62,4%) имаше стойности над 2,35mg/l (норма 0.80 до 2.35mg/L). Разгледахме β2-MG като самостоятелен прогностичен фактор, свързан с времето до първо лечение и установихме статистически значима разлика в групите с нормална стойност или стойности, надвишаващи 2,35mg/l. Резултатите са представени на табл.№8 и фиг.№15.

Таблица №8. Средно време до лечение на пациентите с CLL спрямо стойностите на серумния β 2-MG.

β 2-MG	Време до лечение			
	месеци	Стандартно отклонение	Интервал на доверителност 95%	
			Долна граница	Горна граница
<2.35 mg/l	70,067	9,022	52,384	87,751
>2.35+ mg/l	54,300	10,934	32,869	75,732
Общо	67,052	8,740	49,921	84,183

Фигура №15. Средно време до лечение за групите в зависимост от стойностите на β 2-MG ($p=0,010$)



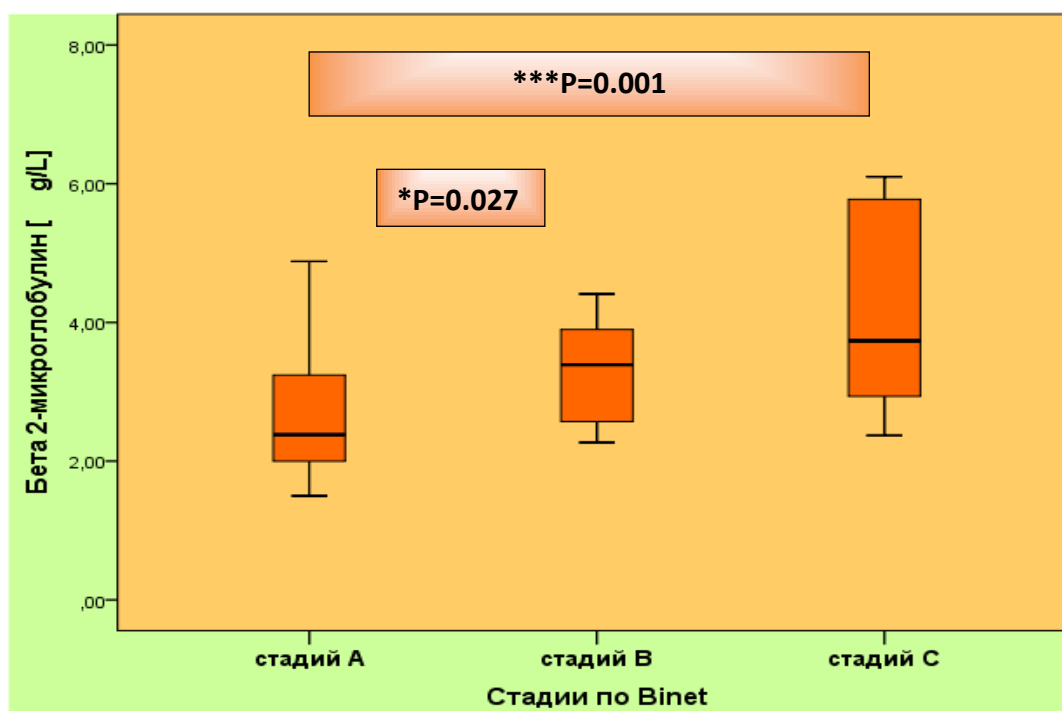
Установеното от нас TTFT на пациентите със стойности на показателя над референтната граница бе $54,3 \pm 10$ месеца. При четирима от болните стойностите на β 2-MG бяха значително завишени над горната граница на нормата. Клинико-лабораторните характеристики на тези пациенти са представени на табл. № 9.

Таблица № 9. Характеристика на пациентите с патологично завишени стойности на β 2-MG

Пациент №	Стадий на заболяването	Абсолютен – В- клетъчен лимфоцитен брой	Стойности на β2-MG	лечение
17	C	112G/l	11,8	+
28	A	197G/l	6,56	+
30	B	8,4 G/l	6,59	-
33	A	5,25 G/l	7,11	-

Изследвахме също така връзката между стадия на заболяването и стойностите на β 2-MG като два различни показателя, отразяващи косвено туморния товар. За целта разделихме пациентите на три групи в зависимост от стадия (1-ва група- пациенти от А клиничен стадий; 2-ра група – пациенти от В клиничен стадий; 3-та група – болни, стадираны в напреднал С клиничен стадий). Резултатите от проведенят анализ показаха разлика във времето до лечение при отделните групи (фиг.№16).

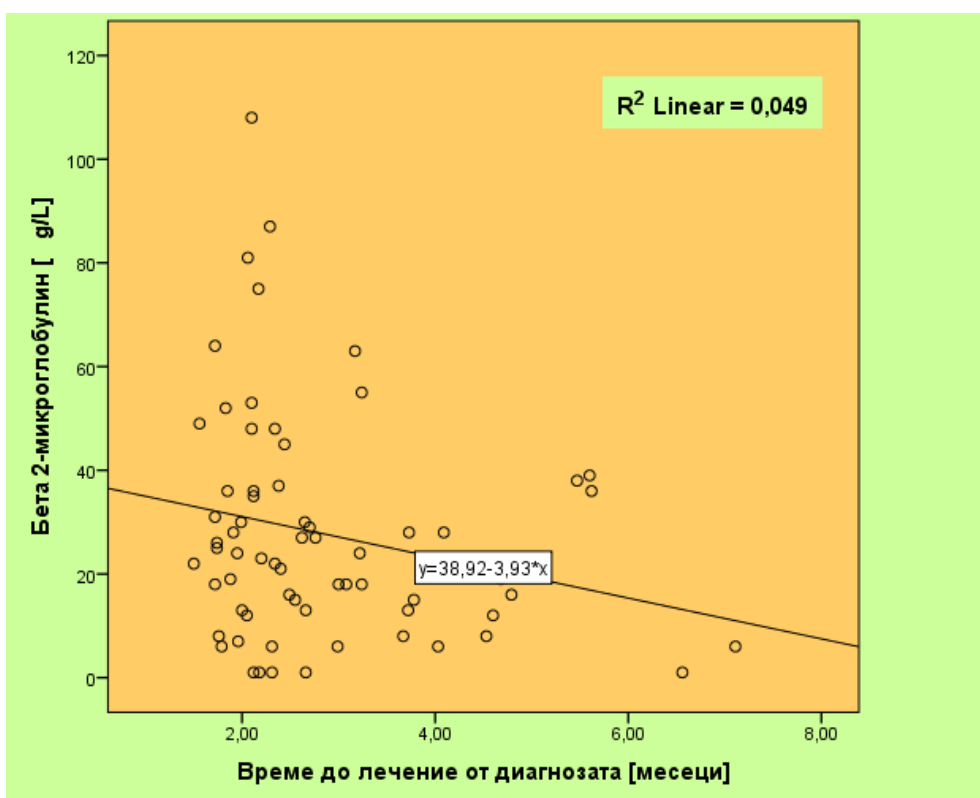
Фигура №16. Зависимост между TTFT и серумната концентрация на β 2-MG



Допълнително, разгледахме промените в стойностите на серумния β 2-MG при пациентите в ранен А клиничен стадий като потърсихме връзка между стойностите на

показателя и значението му като прогностичен фактор, свързан с прогресия на заболяването. Наблюдавана беше тенденция за слаба негативна зависимост между определената концентрация на бета 2-микроглобулина и времето от диагнозата до лечение за пациентите в А стадий ($R_s=-0.213$, $p=0.086$). С други думи, колкото по-висока бе концентрацията на маркера, толкова по-кратко бе очакваното време от поставянето на диагнозата до започване на лечението (фиг. №17).

Фигура № 17. Зависимост между $\beta 2$ -MG и времето до започване на лечение на пациентите в ранен А стадий



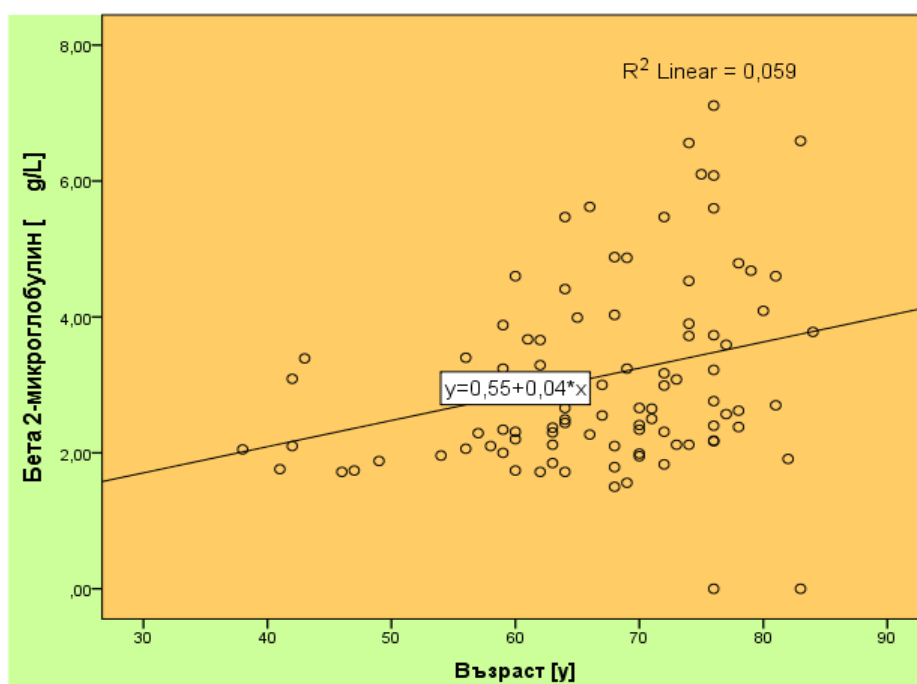
Допълнително проучихме съпътстващите заболявания на пациентите, предвид необходимостта от преизчисляване на показателя в зависимост от бъбречната функция. Най-голям брой от пациентите бяха със сърдечно-съдови заболявания, включващи хронична застойна сърдечна недостатъчност, придобити клапни пороци, артериална хипертония, исхемична болест (фиг. №18). Двадесет и три (23,7%) от общо 97 пациента бяха с две и повече заболявания. Само 11 от пациентите бяха без анамнеза и обективна находка за съпътстваща патология. Документирана азотна задръжка I-II степен бе установена при двама от пациентите.

Фигура №18. Съпътстващи заболявания при пациентите с CLL. В групата „Други заболявания“ са включени пациенти с псориазис, болест на Паркинсон, тромбофлебит, ревматоиден артрит, ГИТ (заболявания на гастроинтестиналния тракт)



Потърсихме връзка между възрастта и стойностите на серумния бета 2 микроглобулин и установихме умерена, сигнификантна корелационна зависимост между концентрацията му и възрастта на пациентите ($R_s=0.304$, $p=0.003$](фиг. № 19).

Фигура №19. Зависимост между фактора възраст и стойностите на серумния бета -2 микроглобулин



Молекулярно-генетични маркери

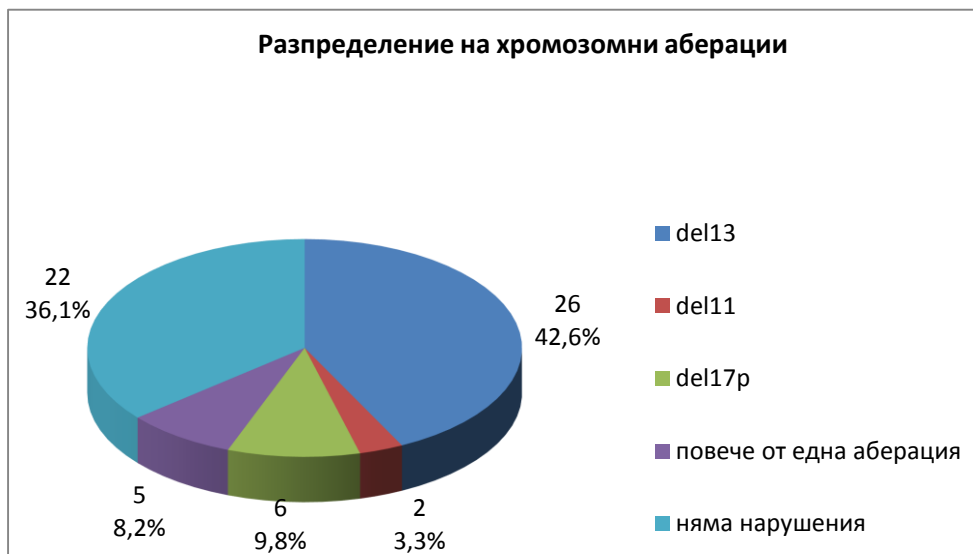
Разгледахме какъв е относителният дял на пациентите с някои от най-честите, клинично значими хромозомни аберации, определени чрез локус специфични сонди за: del13, del11, del17p/p53. За целта при 62 от 97 пациента беше проведен FISH анализ върху интерфазни ядра на изолирани от периферната кръв мононуклеарни клетки. Разпределението на пациентите от тази група спрямо стадия на заболяването е представено на фиг. № 20.

Фигура №20. Разпределение на пациентите по стадии: 1 –стадий А по Binet, 2–стадий В, 3 -стадий С

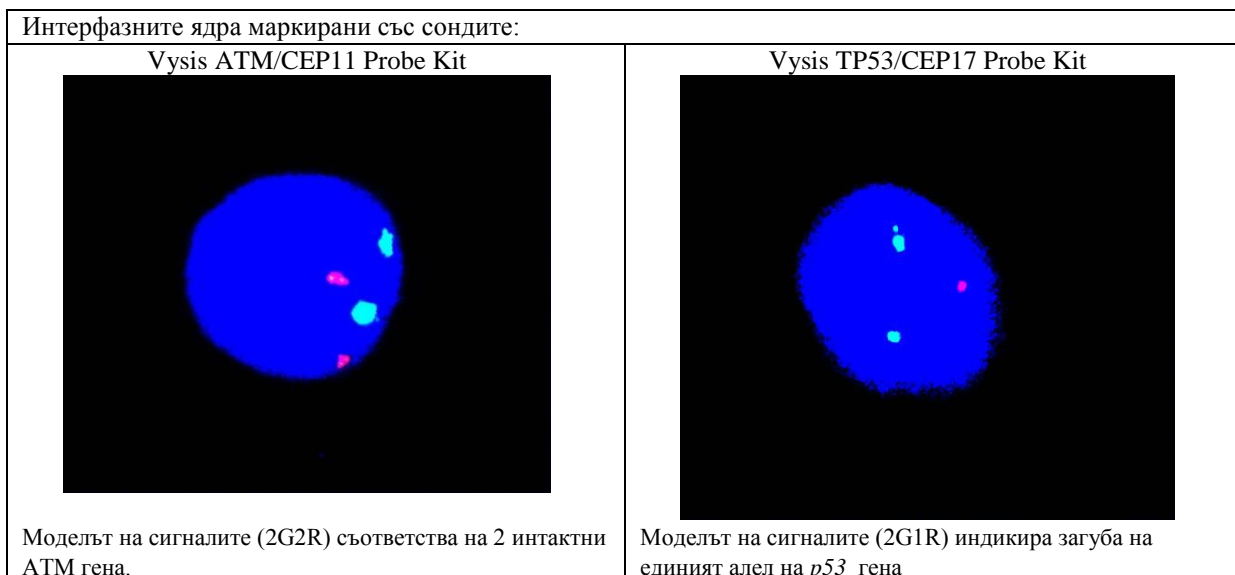


Въз основа на резултатите от FISH теста, пациентите бяха разделени в 5 подгрупи както следва: група А- с изолирана del13q, В- с изолирана del11q, С – с del17p/p53, D– с наличие на повече от една хромозомна аберация и Е- не се установява нито едно от търсените хромозомни нарушения. Един от резултатите бе приет като неподходящ за интерпретация. Разпределението на лицата в зависимост от наблюдаваните кариотипни аберации, определени посредством FISH анализ е представено на фиг.№21. Сред обхваната от нас група от 62 пациента, най-често срещаната хромозомна аномалия беше del13q(n=26) – при 42,6%. При 22 (36,1%) от болните не бяха установени хромозомни нарушения. Значително по-малък бе броят на пациентите с del17p/p53- 6(9,8%). На фиг. №22, е показан резултата от FISH анализа на споменатата хромозомна аберация.

Фигура №21. Разпределение на хромозомните аберации в групата от 61 нелекувани пациенти със CLL на базата на проведен FISH анализ



Фигура №22. В 94% от интерфазните ядра липсва един от алелите на p53 гена: в 76% от ядрата хромозомната аберация е под формата на del(17)(p13), а в 18% е представена като монозомия



Изолирана del11q беше установена при двама от пациентите (3,3%). На фиг.№23 е представен СТ образ на пациент с гореспоменатата хромозомна аберация.

Фигура №23 Резултат от проведено КТ изследване, доказващ системен лимфопролиферативен процес. Далак с общо увеличени размери в аксиален план до 176/102мм



При четирима от пациентите del(11)(q22) беше съчетана с del(13)(q14) или del(17)(p13). Резултатите от FISH анализа, лабораторните изследвания и основни клинични характеристики на пациентите са представени на табл.№10 и фиг. № 24.

Фигура №24. В 13% от интерфазни ядра се наблюдава загуба на единя алел на p53 гена, а в 20%- загуба на ATM гена.

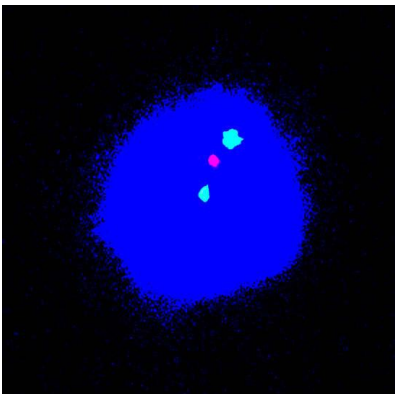
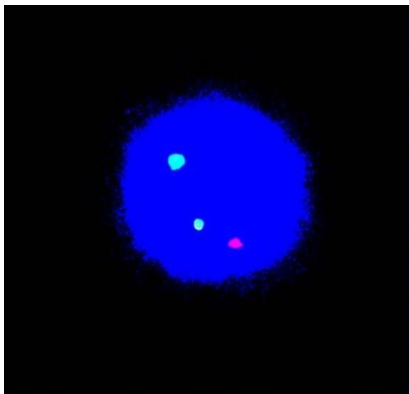
Интерфазните ядра маркирани със сондите:	
Vysis ATM/CEP11 Probe Kit	Vysis TP53/CEP17 Probe Kit
	
Моделът на сигналите (2G1R) индикира загуба на единият алел на ATM гена.	Моделът на сигналите (2G1R) индикира загуба на единият алел на p53 гена

Таблица №10. Клинико-лабораторна характеристика на пациентите с наличие на повече от една хромозомна аберация

пациент №	клинично представяне	абсолютен – В-лимфоцитен брой	цитогенетични нарушения
№ 13	периферна лимфаденомегалия		del(11)(q22)
		53,99 X10 ⁹ / л	del(13)(q14)
№ 19	спленомегалия		del(13)(q14)
		196,1 X10 ⁹ / л	del(11)(q22)
№ 36	абдоминална ЛАМ		del(17)(p13)
		21,42 X10 ⁹ / л	del(11)(q22)
№ 44	периферна лимфаденомегалия		del(13)(q14)
		94,66 X10 ⁹ / л	del(11)(q22)
№ 51	спленомегалия		del(17)(p13)
		104,37 X10 ⁹ / л	del(13)(q14)

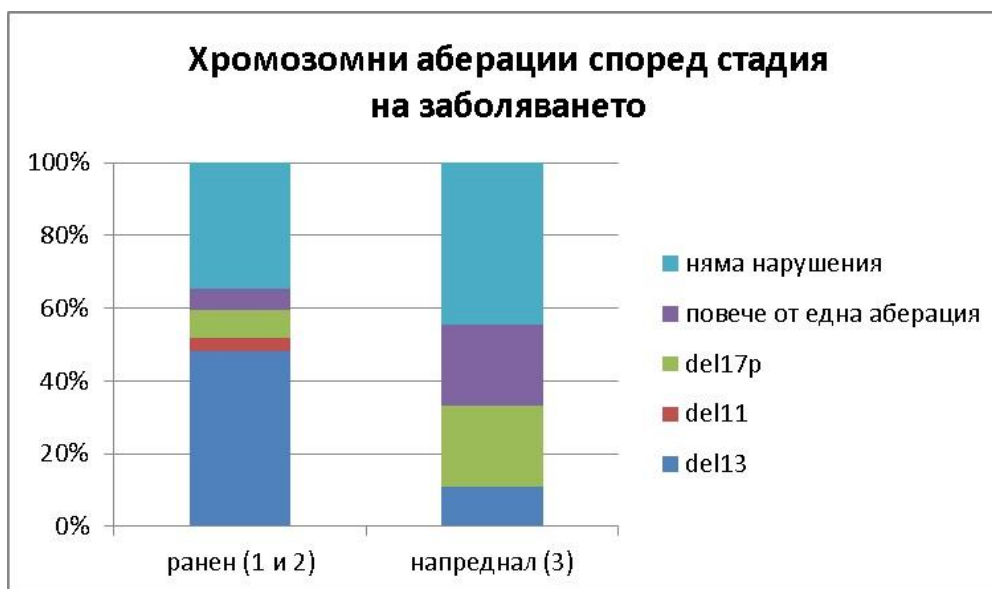
Del(17p) беше установена в 4,8%(2/42) от пациентите в стадии А, при 20,0%(2/10) в стадии В и при 22,2%(2/10) в стадии С (табл. № 11 и фиг. №25).

Таблица №11. Разпределение на пациентите по стадии и установените хромозомни аберации

Изследвани хромозомни аберации	Стадии по Binet						стадии по Binet			
	А		В		С		ранен (1 и2)		напреднал (3)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
del13	20	47,6%	5	50,0%	1	11,1%	25	48,1%	1	11,1%
del11	1	2,4%	1	10,0%	0	0,0%	2	3,8%	0	0,0%
del17p	2	4,8%	2	20,0%	2	22,2%	4	7,7%	2	22,2%
повече от една аберация	2	4,8%	1	10,0%	2	22,2%	3	5,8%	2	22,2%
без нарушения	17	40,5%	1	10,0%	4	44,4%	18	34,6%	4	44,4%

Под формата на загубата на единия алел на p53 гена, хромозомната аномалия варираше в широки граници от 10% до 95%.

Фигура №25 .Разпределение на хромозомните аберации в зависимост от стадия на заболяването. Ранен А и междинен В стадий по Vinet (1 и 2), напреднал стадий С (3)



Анализирахме честотата на del13q в група от 62 пациента с нелекувана CLL, от които при 26 споменатата хромозомна аберация беше самостоятелно представена, а при четирима - в комбинация с del11 или del17. На фиг. № 26 е представен резултат на пациент с 13q-.

Фигура № 26 . Използвана е сонда Poseidon™ DLEU1 (13q14)/13qter Control probe за идентификация на DLEU1 гена в дългото рамо на 13-та хромозома. В 85% от изследваните интерфазни ядра се наблюдава загуба на DLEU1 гена (2G1R)

Интерфазните ядра маркирани със сондите:	
Poseidon™ DLEU (13q14)&13qter Control probe	Poseidon™ p53 (17p13)&SE 17 Control probe
Моделът на сигналите (2G1R) демонстрира липса на DLEU1 гена.	Моделът на сигналите (2G2R)) съответства на два интактни p53 гена.

Допълнително потърсихме връзка между процента на клетките с del13q и времето до започване на лечение. За целта преобразувахме данните за този процент от интервални в номинални и разделихме болните с del13q на две подгрупи ($\geq 70\%$ клетки с аберация - код 1 и с $<70\%$ - код 0). Въз основа на проведеният Kaplan-Meier анализ, не се установи

статистически значима разлика във времето до лечение между пациентите от двете групи ($p>0,05$) (фиг. №27). На таблица №12 е представено разпределението на пациентите с изолирана del(13q) в зависимост от процента клетки със споменатата хромозомна аберация.

Фигура № 27. Зависимост между процента клетки с 13q- и TTF1

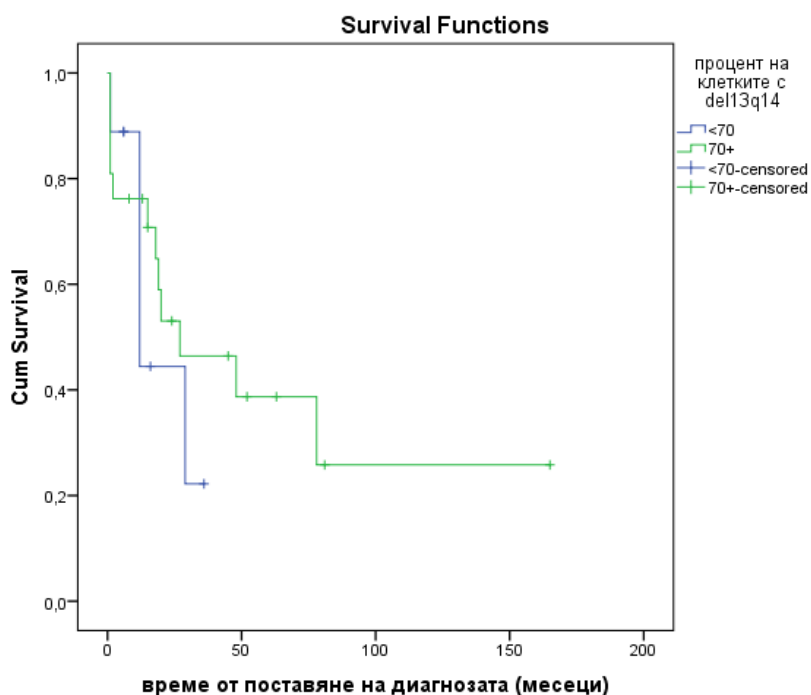


Таблица №12. Разпределение на пациентите в зависимост от процента клетки с del(13q) и започнато лечение

CLL клетки с изолирана del13q	N пациенти на лечение	N пациенти без лечение	общ брой
≥ 70%	10	8	18
<70%	4	4	8
общ брой	14	12	26

Мутационен статус

В подгрупов анализ на случайно подбрани 48 пациента, с документални данни от проведени стадиращи процедури и FISH анализ, допълнително бе проведена мултиплексна PCR за определяне на мутационния статус. Въз основа на използвания алтернативен вариант за определяне на IGVH статуса и в зависимост от получените резултати, пациентите

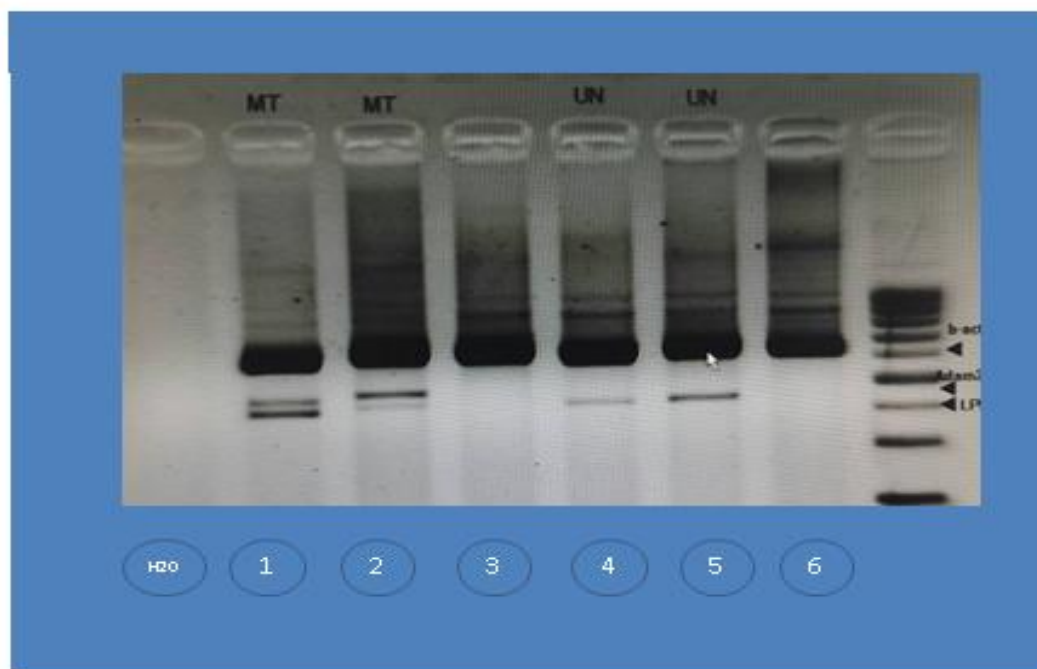
бяха разделени на две групи, както следва: група А, включваща 32 пациента (66,6%) с мутирал IGVH статус и група В, състояща се от 16 пациента (33,3%) с UM статус. На фиг. № 28 е представена извадка на резултатите от проведения PCR анализ.

Фигура № 28. Мултиплексна PCR е използвана за едновременна детекция на продуктите на ADAM29 и LPL гените. За вътрешна контрола е използван β -Actin(house keeping gene:)

(а) При мутирал IGVH статус (MT) са наблюдавани 2 продукта, съответстващи на ADAM29 и LPL, или 1 банд, отговарящ на експресията на ADAM29(колона 1,2)

(б) Немутирал IGVH статус (UM):наличие на единствен банд, съответстващ на LPL (колона 4,5)

(в) При отсъствие на продукти на амплификацията на ADAM29 и LPL, независимо от наличието на продукт на амплификацията на β -Actin, съответната проба е класифицирана като неопределен IGVH статус (колона 3, 6)



Потърсихме връзка между мутационния статус и изследваните от нас хромозомни нарушения, базирайки се на резултатите от проведения FISH анализ (табл. № 13). Най-голям бе броят на пациентите с del13q – двадесет и двама от общо 48 пациента. В групата с мутирал статус, хромозомната аберация бе установена в 50% (16/32) от пациентите. Данните от анализа показаха наличие на значима връзка между мутационния статус и изследваните кариотипни аберации ($p=0,035$).

Таблица №13.Разпределение на хромозомните аберации сред групите с различен мутационен статус(A=MT- мутирал IGVH статус и B=UM– немутирал IGVH статус)

Изследвани хромозомни аберации								
		del13q	del11q	del17p	с повече от една аберация	не са установени	Нерепрезентативни	общ брой
IGVH	група A-MT	16	0	2	2	12	0	32
статус	група B-UM	6	2	2	3	2	1	16
N	общ брой	22	2	4	5	14	1	48

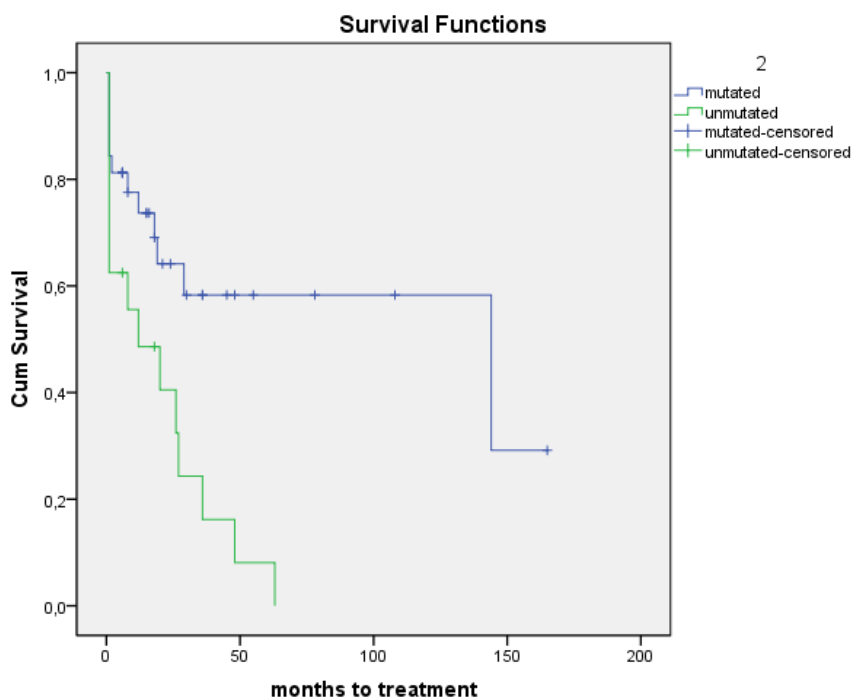
Del17p, чието присъствие се асоциира с неблагоприятна прогноза, бе наблюдавана в 12,5%(2/16) в групата с UM статус и в 6,25% (2/32) при пациентите с MT статус. Допълнително разгледахме пациентите с изолирана del13q и определен мутационен статус. От общо 22 пациента шест бяха с немутирал VH статус и са започнали лечение средно в рамките на 20 месеца от поставяне на диагнозата. Анализирахме също така влиянието на мутационният статус върху фактора TTFT. Разпределението на пациентите по тези показатели е представено на табл. №14.

Таблица №14. Разпределение на пациентите според мутационният статус и TTFT

Мутационен статус	Общ брой (N=)	На лечение	Без лечение
мутирала	32	12 (37,5%)	20 (62,5%)
немутирала	16	14(87,5%)	2 (12,5%)
общо	48	26(54,2%)	22 (45,8%)

Разликите във времето до лечение за двете групи бяха определени чрез сравняване на кривите на Kaplan–Meier (фиг. №29). Определеното от нас средно време до лечение за 50% от пациентите с UM статус беше 19±5 месеца (интервал на доверителност 9-30 месеца), за разлика от средното време до лечение за пациентите с мутирал статус, което беше 94,5±15.8 месеца.

Фигура № 29. TTFT за групите с мутирал и немутирал статус ($p=0,003$)



Анализирахме разпределението на пациентите по рискова категория и времето до лечение на базата на скала за оценка на риска предложена в CLL-IPI, като използвахме алтернативният вариант за определяне на мутационният статус. Разпределението на пациентите в зависимост от заложените в CLL-IPI прогностични фактори е представено на табл. № 15.

Таблица №15. Разпределение на броя пациенти според прогностичните фактори в CLL- IPI

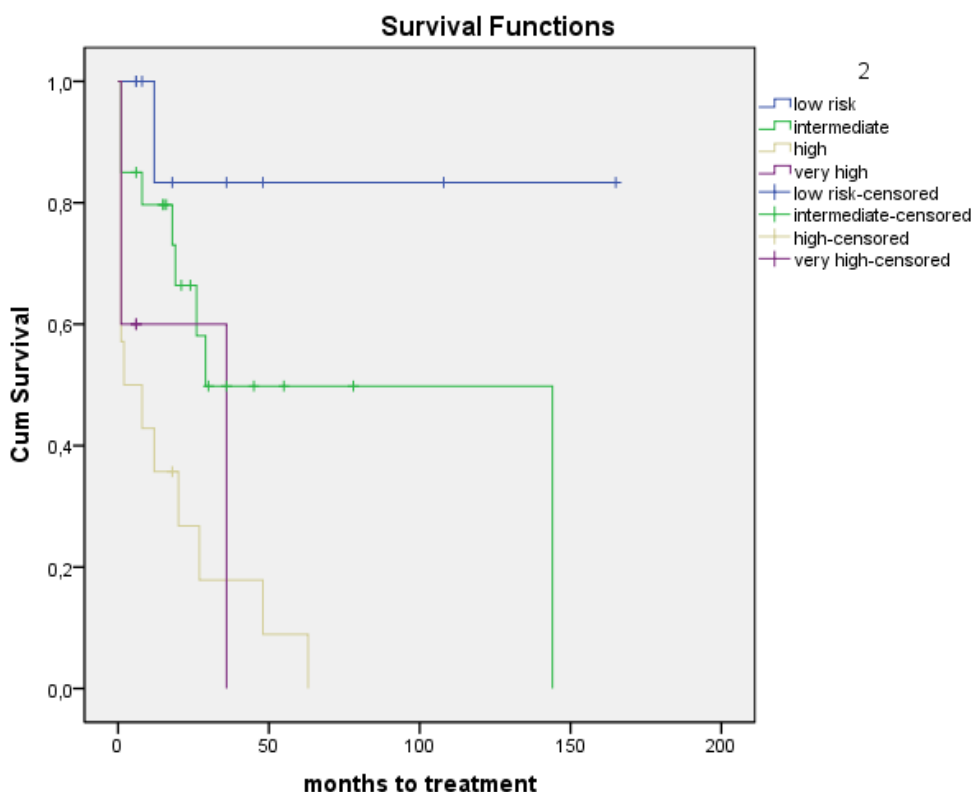
Показател	Брой пациенти
<u>Възраст</u>	
>65г	28
<65г	20
<u>Стадий Binet</u>	
A	32
B, C	16
<u>del17p</u>	
+	6
-	42
<u>Мутационен статус</u>	
UM	16
MT	32
<u>β2 микроглобулин</u>	
<2.35 mg/l	12
>2.35mg/l	36

При определяне на рисковите групи беше извършено прекодиране на прогностичните фактори, така както е представено в оригиналния модел за стратифициране на риска. След като събрахме получените точки и в зависимост от установените резултати, разделихме пациентите в четири рискови групи, представени на табл. № 16 и фиг. № 30. Установена чрез FISH анализ del17p бе използвана като единствен маркер за определяне на TP53 статуса.

Таблица № 16. Разпределение на пациентите по рискови групи

Рискова група	Общ брой N=	Брой пациенти на лечение N=	Цензурирани	
			Без лечение	Проценти
Нисък риск	9	1	8	88,9%
Междиен риск	20	9	11	55,0%
Висок риск	14	13	1	7,1%
Много висок риск	5	3	2	40,0%
Общо	48	26	22	45,8%

Фигура № 30. TTFT за различните рискови групи, оценени както следва: ниско рискова група 0-1 точки, междинен риск 2-3, високо рискови 4-6, с много висок риск 7-10 точки



Стратифицирането на пациентите по рискови групи на базата на прогностичните фактори възраст, стойности на $\beta 2$ микроглобулин, стадии на заболяването, мутационен статус и цитогенетични аберации е представено на табл. № 17.

Таблица №17. Рискови групи пациенти и TTFT

Рискова група	Стратификация на риска							
	месеци	Стандартно Отклонение	95% интервал на доверителност		месеци	Стандартно Отклонение	95% интервал на доверителност	
			Долна граница	Горна граница			Долна граница	Горна граница
Нисък риск	139,500	23,278	93,875	185,125
Междинен риск	79,316	17,891	44,251	114,382	29,000	27,012	,000	81,943
Висок	16,107	5,854	4,632	27,582	2,000	6,548	,000	14,834
Много висок	22,000	9,391	3,593	40,407	36,000	,000	.	.
Общо	59,514	12,120	35,759	83,269	27,000	9,241	8,888	45,112

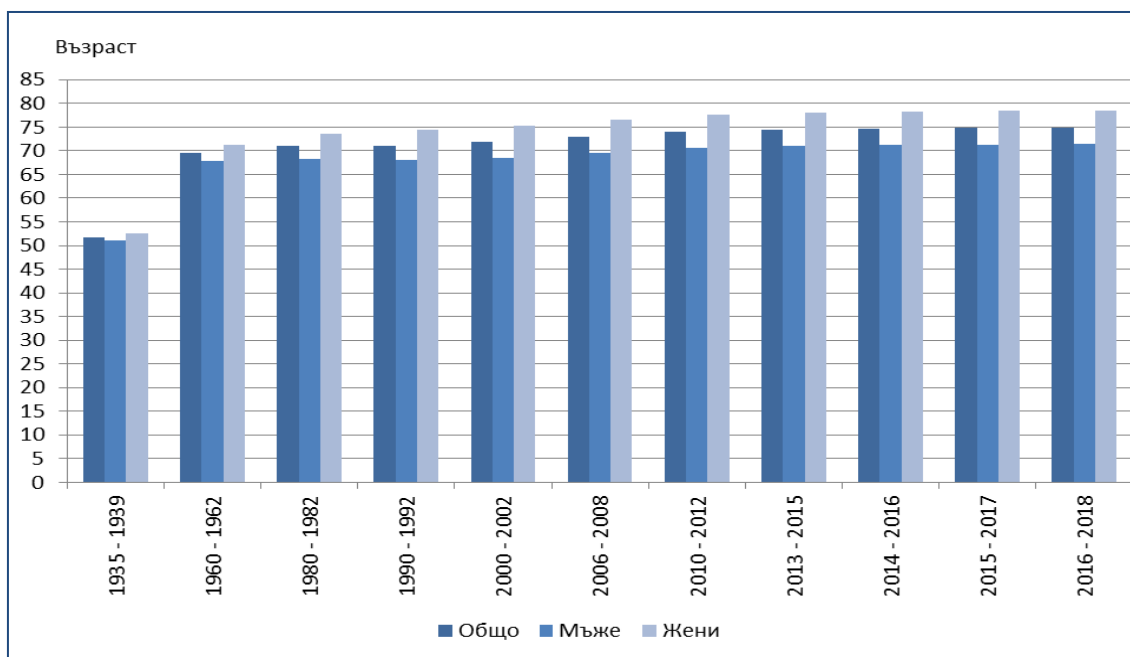
От общо 48 пациента 9 (19%) бяха оценени като нискорискови, от които само един беше започнал лечение. Определеното от нас време до лечение за пациентите от тази група беше $139,5 \pm 23,2$ месеца. В групите с най-голям брой пациенти, лечение не е било необходимо в 55% от случаите с междинен риск от прогресия и при 7,1% от пациентите, оценени като високо рискови. В групата от 20 пациента с междинен риск, наблюдавахме почти балансирано разпределение на пациентите на лечение (9/20) и без терапия (11/20). Средно време до лечение за тази група беше $79,3 \pm 17,8$ мес. В групите с висок и много висок риск почти всички пациенти са започнали лечение. Средното време до лечение за лицата с висок риск беше $16,1 \pm 5,8$ мес., съответно $22 \pm 9,3$ мес. в групата с много висок риск. Близките резултати във времето до лечение за последните две групи биха могли да се дължат на малкия брой случаи с много висок риск (5/48). От общо 32 пациента, стадиранни в ранен А стадии, 8 (25%) бяха определени с UM статус, а при четирима (12%) бе установена мутация 17p- .

Дискусия

Позовавайки се на фактите, че CLL е заболяване на възрастните пациенти, а възрастта е един от основните фактори, който се взема предвид при избора на терапия, този показател е включен в повечето прогностични модели за стратифициране на риска. В проучване на Parikh и кол., в което са били скринирани млади пациенти (възраст ≤ 55 г.) авторите анализират влиянието на възрастта върху времето до лечение. Резултатите от проучването са показали значително по-кратко време до лечение за пациентите от по-младата възрастова група (Parikh *et al*, 2014). Друг изследователски колектив, чиито основен таргет са били пациентите на възраст ≥ 75 г. допускат, че полезността на голяма част от клиничните и биологични прогностични маркери за определяне на преживяемостта и времето до първо лечение варира в зависимост от демографския фактор възраст, като се има предвид по-високата смъртност от съпътстващи заболявания сред по-възрастни пациенти (Shanafelt T *et al* 2010). Определената от нас средна възраст на пациентите към диагностициране на заболяването беше 67г. и се доближава до тази, цитирана в повечето научни доклади. През 2017 г. Paolo Strati и кол. на базата на проспективно проучване, обхващащо внушителна кохорта от 1143 пациента, докладва средна възраст за групата 63 години (Strati P *et al* 2017). През 2018г. Michael Hallek и кол. определят средна възраст на пациентите към диагнозата 67–72 години. Резултати от проведеното от нас проучване не потвърдиха влиянието на демографските фактори възраст и пол върху ТТФГ. Приемайки за граница дори предложената в CLL-IPi възраст от 65г., в проведеният от нас анализ в групата от 97 пациента не се установи статистически значима разлика във времето до терапия сред лицата на възраст ≥ 65 г. и тези под 65г. Предполагаме, че въпросите, свързани с фактора възраст до известна степен граничат с въпроси, касаещи пролиферативните процеси и процесите на стареене. В тази насока интересни са проучванията на два авторски колектива. В доклад на Pietro Bulian и кол. авторите предполагат, че демографските фактори са важни за определяне на общата преживяемост при пациенти под 70г., но на практика нямат прогностична стойност за времето до лечение (Bulian P *et al*, 2012). В проучване на Davide Rossi и кол., чиято цел е била да проследи клоналната еволюция на заболяването, използвайки комплексен подход, включващ FISH и молекулярен анализ, е установена връзка между стареенето и нестабилността на левкемичния клон. Авторите предполагат, че в основата на тези процеси може да стои спад в механизмите за поддържане на генома при по-възрастни пациенти или по-голяма склонност на пациентите в напреднала възраст да селектират положително и да разширят клонингите, носещи високорискови генетични нарушения (Rossi D *et al*, 2013).

С цел да уточним характеристиката на пациентите по показателите възраст и стадии на заболяването към диагнозата, подобно на прогностичния индекс, предложен от William G. Wierda и кол. (2007 г.), ние разделихме пациентите на три възрастови групи, както следва: под 50г., 50-65 г. и над 65г. Това, което направи впечатление при разпределението на пациентите беше преобладаващият брой на лицата на възраст над 65г., които бяха в ранен, А клиничен стадий. На практика, ако чисто механично разгледаме очакваната средна преживяемост за тази група, която е равна или по-голяма от 10 години, то продължителността на живота за тези хора ще бъде близка до средната продължителност на живота за лицата без заболяване (фиг. № 31). От друга страна, с времето една не малка част от пациентите, диагностицирани в ранен стадий, ще прогресират, което в известна степен би редуцирало очакваната средна преживяемост за тази група болни. Анализирайки самостоятелно фактора възраст, в нашето проучване не бе потвърдена прогностичната стойност на показателя спрямо времето до необходимост от лечение.

Фигура №31. Средна продължителност на живот в България: 71.4 - 78.4г. по данни на Националния Статистически Институт към 2018г.



Всичко това ни накара към този прогностичен фактор да добавим показатели, отразяващи характеристики, свързани със самото заболяване, а именно пролиферативна активност на неопластичните клетки (чрез изследване нивото на $\beta 2$ -MG) и степен на разпространение (стадий) на болестта.

Лесно изпълними, стадиращите системи са основната част на почти всички модели за стратифициране на риска за пациентите с CLL. Създадени преди повече от 30 години, те са

широко използвани, но също и многократно модифицирани. Така, първоначално състоящата се от пет стадия, стадиращата система на Rai е ревизирана през 1987г. (Rai-Sawitsky) и разделя пациентите в три основни рискови категории, обединявайки някои от стадите както следва: нисък риск (Rai 0), междинен риск (Rai I и II) и висок риск (Rai III и IV)(*Rai K R et al, 1975*). И при двете стадиращи системи (Rai и Binet) определянето на броя ангажирани лимфни зони се основава на метода на палпация, но не всички патологично променени лимфни възли са разположени в зони, достъпни за повърхностна палпация. От друга страна дискретната спленомегалия може да бъде пропусната при физикалния преглед. За разлика от лимфомите, при хроничната лимфоцитна левкемия, лимфните възли не винаги са със значителни размери. В 80% от случаите се установява двустранна шийна и аксиларна лимфоаденомегалия. Спленомегалията е лека и умерена, и се наблюдава в приблизително 50% от случаите (*Rodrigues A C et al, 2016*). Макар и ограничени, в литературата съществуват доказателства, според които рискът от прогресия е по-голям за пациентите с увеличени лимфни възли, с размери над 1,5см. в диаметър (*Strati, P et al, 2019*). При липса на патологичен процес, ангажиращ лимфните възли, последните не се визуализират ехографски поради малките размери под 1см. На практика ултразвуковата диагностика може да обективизира лимфните възли с големина над 15мм (*Даскалов И и кол. 2004*), т. е. отклонения от тези размери би следвало да се приемат за патология. За стадиране на пациентите от значение е броя на засегнатите лимфни региони, което може да бъде установено с ехографско и рентгенологично изследване на съответните анатомични области (под/над диафрагмата). Прецизното определяне на размера на ангажираните лимфни структури посредством СТ е необходимо преди започване на лечението, когато трябва да се определи туморния обем, както и да се изберат съответните таргетни зони за проследяване и оценка на терапевтичния отговор. Въз основа на това, към диагностициране на заболяването, с цел уточняване на стадия и последващо проследяване за прогресия при асимптоматичните пациенти, освен рутинните лабораторни тестове и физикален преглед ние проведохме ехография на коремни органи и рентгенологично изследване на гръдна клетка. СТ изследване беше използвано като част от диагностичния процес за определяне размерите на туморната маса преди започване на лечение. При по-голяма част от пациентите със спленомегалия беше установена и абдоминална лимфоаденомегалия, а времето до лечение бе сравнително по-кратко за тези болни спрямо пациентите без спленомегалия. На този етап няма единодушно становище доколко провеждането на СТ към диагнозата при асимптоматични пациенти ще има повече ползи или негативи, въпреки че съществуват съобщения за установена окултна лимфаденопатия при лица в ранен стадий (*Muntanola A et al, 2007*). На практика адекватното стадиране към диагнозата е важно и има значение при

проследяване на асимптоматичните пациенти, тъй като преходът от един клиничен стадий към друг се приема за прогресия. Някои затруднения, свързани с използването на стадиращите системи при обработване и докладване на пациентските данни, са свързани с приравняване на двете системи и стратифициране на риска. В предложението от 2016г. международен прогностичен индекс пациентите в ранен стадий: А по Binet и 0 по Rai не се оценяват като рискови, за разлика от всички останали групи В/С Binet или Rai I- IV, които се считат за такива. В някои научни доклади авторите оформят пациентските групи обединявайки стадиите Rai 0, Rai I и II (с нисък и междинен риск), приравнявайки ги към ранен стадий А по Binet. Ако пациентите трябва да бъдат групирани на базата стадий и риск, то в ранен стадий на заболяването с нисък и междинен риск би трябвало да бъдат включени тези, отговарящи на стадии А, В по Binet/ 0-II по Rai, а в напреднал стадий съответно С по Binet/ III-IV по Rai (*Cramer P et al, 2011*). Оценявайки значението на стадия върху TTFT, резултатите от проведеното от нас проучване, потвърдиха влиянието на този прогностичен фактор върху TTFT. За групата пациенти, подлежащи на наблюдение и изчакване, а също така и за тези, при които бе необходимо лечение, допълнителното изследвахме и потърсихме връзка между фактори, отразяващи по-прецизно туморния товар и TTFT.

Поради факта, че преди повече от 10 години бяха ревизирани критериите за диагнозата В-CLL, като в основата на тези промени бяха заложили три показателя: АВЛС, ангажиране на лимфни структури и наличие на конституционални симптоми, ние потърсихме връзка между АВЛС като по-надежден показател, отразяващ туморния товар и TTFT. В проследената от нас кохорта от нелекувани пациенти, екстремно завишени стойности на АВЛС над $200 \times 10^9/l$ бяха установени сред лица на възраст над 65г. и напреднал стадий на заболяването. Значително по-продължителен беше периодът до започване на лечението за пациентите с АВЛС под $20 \times 10^9/l$. На базата на направения преглед, на литературата върху проблема, ние не открихме фиксирани стойности на лимфоцитния брой като граница, свързани с времето до лечение. В миналото стойности на $WBC > 35 \times 10^9/l$ се приемаха за неблагоприятен прогностичен фактор (*Simms L et al, 2013*). В ретроспективно проучване на Stefano Molica и кол., обхващащо 818 пациента с CLL и стадий 0 по Rai, авторите предлагат като прагови стойности за АВЛС $\geq 10 \times 10^9/l$ или абсолютен лимфоцитен брой $\geq 11,5 \times 10^9/l$, на базата на които разграничават пациентите със стабилно заболяване от тези, които ще прогресират (*Molica S et al, 2011*). В проведеното от нас проучване АВЛС над $50 G/l$ бе свързан с по-кратко време до лечение, както и с междинен и напреднал стадий на заболяването. Малки по размери, малигнените лимфоцити притежават способността да инфилтрират тъкани и органи. Понякога дори при нисък левкоцитен брой са описани случаи на засягане на респираторния тракт по типа на плеврален излив (*Berkman N et al, 1993*). През

1965г. за първи път, а по-късно и през 2014г. са докладвани случаи на асцит с доказана CLL етиология при малки по размери пара-аортални и далачни лимфни възли (*Muntanola A et al, 2007*). Подобни „екстрamedуларни/екстранодални“ изяви със или без наличие на системна CLL най-често засягат кожата (33%), централната нервна система (27%), бъбреците и макар и по-рядко перикарда (*Hallek M, Eichhorst B et al, 2019, Ratterman M et al 2013; Ho N et al, 2018*). Тези феномени, макар и не толкова чести в клиничната практика, вероятно са свързани с експресията на различни молекули върху повърхността на клетките. Съществуването на сложна мрежа от антиапоптозни, адхезионни, проинфламаторни и протоонкогенни молекули подпомага способността на клетките да инфилтрират тъканите и да оцеляват в тях (*Vladimirova R et al 2015*). „Homing“ рецепторите, разположени върху повърхността на лимфоцитите могат да обяснят клиничната разлика между CLL и SLL (*Tsimberidou A M et al, 2006*). За да не се компрометират резултатите, както и поради малката честота на SLL, в нашето проучване не бяха включени пациенти с дребно-клетъчен лимфоцитен лимфом.

Друг прогностичен фактор, свързан с лимфоцитния брой е времето за удвояване на лимфоцитите (LDT). Определено като периода през който абсолютния лимфоцитен брой ще нарастне двукратно и отразяващ активност на заболяването, този показател се счита за надежден прогностичен фактор за пациентите в ранен стадий (*Cramer P et al, 2011*). За съжаление на практика този маркер не може да бъде определен при поставяне на диагнозата (*Hallek M, 2008*). Оценката и използването на фактора, като динамичен показател, свързан с пролиферативната активност има известни ограничения и в случаите когато към диагнозата ALC е под 30Г/л. В тези случаи не е препоръчително удвоеният лимфоцитен брой да служи като единствен и основателен фактор за започване на лечение. В същото време с промяна в дефиницията на В-CLL възниква въпросът кой от двата показателя е по-добре да бъде мониториран, позовавайки се на факта че към диагнозата се определя ABLC за който се смята, че отразява косвено туморния товар или ALC, който може да се променя при клинични състояния не свързани с прогресия на заболяването.

Синтезиран от всички нуклеарни клетки, представляващ част от леката верига на човешкия левкоцитен антиген (HLA -A, -B, -C), β 2-MG присъства като прогностичен маркер в повечето модели за стратифициране на риска при лимфоидните неоплазии. Счита се, че показателят корелира със стадия на заболяването и туморния товар (*Wierda W et al, 2018*). В зависимост от установените стойности на серумния показател (над и под горна референтна граница), ние разделихме проучваната кохорта на две групи. Наблюдавана бе разлика във времето до започване на лечение за двете групи пациенти. Значително по-кратък беше този период в групата с отклонения над референтната стойност. Проведохме сравнителен анализ,

разделяйки пациентите по групи в зависимост от трите фактора: стадий на заболяването, стойности на серумния маркер и времето до лечение и установихме наличието на сигнификантна разлика в TTFT за отделните подгрупи. В проучване на Del Giudice и колектив, обхващащо пациенти под 65г. в ранен А клиничен стадий, чиято цел е била да определи значението на някои предиктивни маркери и времето без терапия, авторите поставят под въпрос полезността на β 2-MG като фактор, който може да предскаже прогресия на заболяването (*Del Giudice et al, 2010*). Анализирайки показателя при лицата в ранен А стадий в проведеното от нас проучване ние установихме негативна корелационна зависимост между двата показателя. При провеждане на анализа предвид факта, че по-голяма част от пациентите към времето на поставяне на диагнозата имат повече от едно съпътстващо заболяване, ние допълнително проучихме коморбидността в обхванатата група, с идеята да уточним доколко резултатът от изследването на серумния β 2-MG може да бъде компроментиран от съпътстващата патология. На практика, от всички пациенти само двама бяха с доказана хронична бъбречна недостатъчност, за която се предполага, че може да доведе до отклонения от референтните граници. Най-чести бяха социално значимите сърдечносъдовите заболявания, от които водеща бе артериалната хипертония, последвана от придобити клапни пороци и хронична застойна сърдечна недостатъчност. Само 11 от пациентите бяха без придружаващи заболявания. В доклад на Paolo Strati и кол, в който е изследвана връзката между съпътстващите заболявания, налични при диагнозата и причините за смърт при пациентите с В-CLL, най-голям е бил дялът на пациентите с ревматологични заболявания, дислипидемия и артериална хипертония (*Strati P. et al. 2017*). Направихме преглед на литературата за най-често споменаваните заболявания, при които биха могли да се наблюдават отклонения в стойностите на серумния β 2-MG, изключвайки лимфоидните неоплазии. Оказа се, че серумните нива на маркера се влияят от различни екстраренални детерминанти, като систолно артериално налягане, пол, общ холестерол, тютюнопушене (*Qun, Set al, 2019*). На табл. №18 са представени авторите със съответната година на публикуване на докладите.

Таблица №18 .Заболявания, асоциирани със завишени стойности на серумния бета 2 микроглобулин

<u>Заболявания съпътствани със завишени нива на серумен бета2 микроглобулин</u>	<u>Автор/ Година на публикуване</u>
Солидни тумори	
- Овариален карцином	Hogdall et al.2010
- Пикочен мехур	Sun J et al. 2015
- Простата	Zhang Y et al. 2013
- Бъбрек	Lucarelli G et al.2014
- Гърда	Klein T et al. 1996
- Щитовидна жлеза	Buket I et al. 2016
Хронична застойна сърдечна недостатъчност II/III функционален клас по NYHA	Kawai K et al.2009
Захарен диабет тип 2	Kim M et al. 2014
Бъбречни заболявания	Kevin T Barton et al.2018
Автоимунни заболявания	Amarante GBD et al.2014

Както се вижда от направеният преглед, отклоненията в стойностите на показателя биха могли да са свързани и със съпътстващи заболявания, които често фигурират в медицинската история на пациентите над 60г. Познавайки се на доклад на Matoković D и кол., представящ данни от проучване на влиянието на фактора възраст върху стойностите на β 2-микроглобулина сред лица от различни възрастови групи, без анамнеза за съпътстващи онкологични заболявания, ние анализирахме двата показателя и установихме съществуването на макар и слаба зависимост между β 2-MG и възрастта на пациентите.

Предвид малкия диаметър на лимфоцитите завишеният им брой не би трябвало да е причина за обструкция в различни отдели на циркулацията, но в литературата съществуват съобщения за развитието на венозни тромбози при пациенти с B-CLL, свързани с механизъм, различен от предполагаемия. В проучване на Inger Lise Gade и кол. върху факторите, свързани с развитие на венозен тромбемболизъм, авторите докладват по-голяма честота на усложнението при пациенти със стойности на β 2-MG над референтните граници. Според тях активираните CLL- клетки отделят по-големи количества β 2-MG и прокоагулантни микровезикули, което от своя страна увеличава риска от венозен тромбемболизъм (Gadel et al, 2018) и съответно променя прогнозата.

Цитогенетичните нарушения са в основата на патогенетичните процеси на CLL. Оформяйки различен биологичен профил на заболяването, те са едни от най-значимите прогностични фактори. Около 40-50% от пациентите с CLL имат хромозомни нарушения, които могат да бъдат доказани посредством класическата лентова цитогенетика (*Hoffman Ret al 2013; Muthusamy N et al, 2010*). Още през 90-те години са публикувани доклади, в които е анализирана връзката между комплексния кариотип (наличие на повече от 3 структурни и/или бройни хромозомни аберации) с факторите време до лечение и обща преживяемост. Описан в 14-34% от нелекуваните пациенти и до 25-35% от пациентите с рефрактерна CLL, комплексният кариотип, въпреки че е хетерогенна категория, в повечето случаи е свързан с неблагоприятна прогноза. *Baliakas* и съавт. докладват асоциация между комплексния кариотип, немутирани VH гени, повишена експресия на CD38 и висока честота на 17p- и del(11q) сред група от 156 пациента с CLL (*Baliakas P et al, 2014*). Конвенционалната цитогенетика като метод позволява проследяване на клоналната динамика и еволюция на заболяването, но необходимостта от допълнително стимулиране на клетъчните култури е причина за известни ограничения при използването на този метод в клиничната практика като рутинен. И ако чрез класическата лентова цитогенетика могат да се установят около 40% от клоналните нарушения, то този процент нараства и достига до 80% при използването на флуоресцентна ин ситу хибридизация върху интерфазни ядра (*Hoffman Ret al 2013*). Методът е приложим върху неделящи се клетки и позволява визуализиране на определени геномни последователности.

По правило del(17p) се установява само в част от левкемичните клетки, като се предполага, че е субклонална аномалия, която в хода на заболяването или след СРТ, съответно клонална селекция, може да се превърне в доминираща (*Савов А,и кол2017*). Приблизително в около 80% от пациентите с del(17p) се установява мутация, засягаща TP53 (*Rossi D,2009*). От друга страна само 60-70% от пациентите с мутация TP53 имат del(17p), установена чрез FISH (*Malcikova Jet al, 2018*). Честотата на хромозомната аберация варира в зависимост от това, на какъв етап в хода на заболяването се провежда анализа, както и от избрания терапевтичен режим. За съжаление повечето автори анализират тази хромозомна аномалия в проучвания, обхващащи пациенти в различен етап на заболяването и за ограничен период от време.

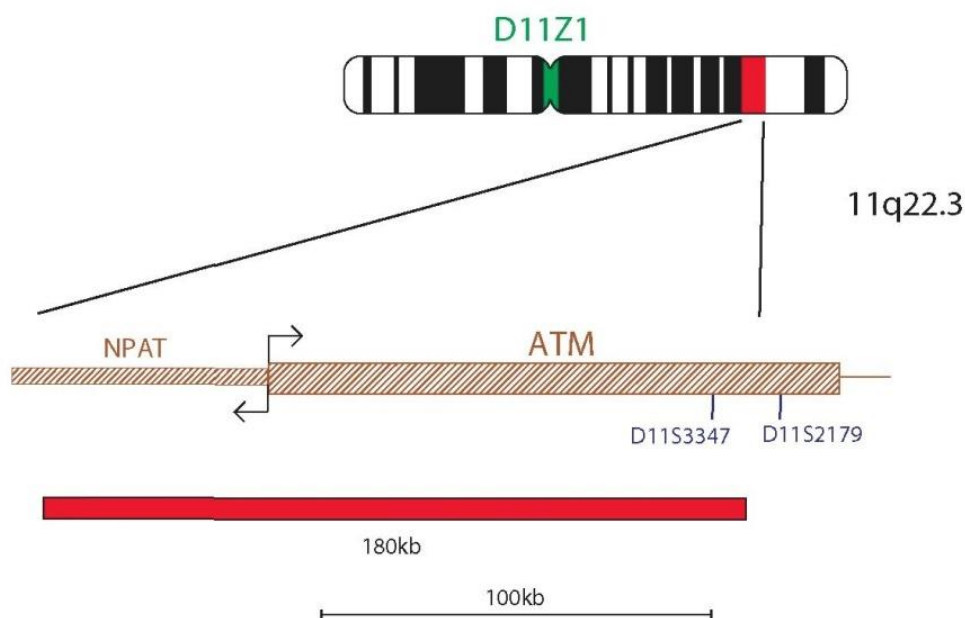
Del 17p се наблюдава в 3-8% от пациентите с нелекувана CLL (*Puiggros A et al,2014*). Този процент прогресивно нараства до 30%, при пациенти с рецидив и достига до 50% за пациентите, резистентни на лечение (*Eichhorst B et al, 2016*). В обхванатата от нас кохорта чрез използване на FISH анализ, ние доказахме при 9,8% от пациентите del(17p). Установената по този начин del17p бе използвана като единствен маркер за определяне на

TP53 статуса. В проведеното от нас изследване наблюдаваната загуба на единия алел на p53 гена варираше в стойности от 10 до 95% от интерфазните ядра, като при трима от пациентите бе под формата на монозомия 17. При направения преглед на литературата се оказва, че съществуват противоречиви мнения за прогностичната значимост на моно- и биалелните нарушения. Подобни колебания съществуват и по отношение на големината на малигнения клон, определена посредством FISH анализ като процент от клетки, притежаващи съответната цитогенетична аномалия (*Савов А,и кол. 2017*). Van Dyke и съавт. приемат като клинично значим праг (свързан с TTFT и OS) наличието на над 20% 17p- CLL клетки (*Van Dyke et al, 2016*). При един от пациентите, включен в нашето проучване, въпреки че към диагнозата бе наблюдавана загуба на p53 само в 10% от интерфазните ядра (в 7% от тях под формата на del(17)(p13) а в 3% като монозомия 17), клиничната изява на заболяването бе свързана с екстремно завишени стойности на WBC и “bulky disease”. Двама от пациентите, които бяха диагностицирани в напреднал стадий и с наличие на симптоми, асоциирани със заболяването са започнали лечение още с поставяне на диагнозата. Един от пациентите, диагностициран в ранен А клиничен стадий, с отложено лечение поради липса на индикации, 48 месеца след поставяне на диагнозата прогресира, като в хода на заболяването бе установена втора неоплазия. От общо 6 пациента, само при 2-ма (един в стадий А и един в В стадий по Binet) с del(17p) в рамките на шестмесечен период на проследяване не беше започнато лечение. Въпреки че установяването на del(17p13)/TP53 мутации сами по себе си не се приемат като достатъчно основание за започване на лечение (*Савов А. и кол. 2017*), наличието на мутации, засягащи TP53 се счита за неблагоприятен прогностичен фактор във всеки един етап от развитието на CLL, от диагностицирането, по време на лечението и при рецидив (*Rossi D et al, 2012, Garff-Tavernier Le M et al 2013*).

Del11q22-23 винаги включва ATM гена и се установява в около 10% от новодиагностицираните пациенти, като този процент прогресивно нараства до 20 за пациентите при които е необходимо да се започне лечение (*Rossi D, Gaidano G 2016*). В обхваната от нас група del11q бе установена в 6 пациента (9,6%), като при трима от тях беше в съчетание с del13q, и само при един бе в комбинация със 17p-. В група от 2184 пациента с данни от проведен FISH анализ, Patricia Greipp и кол. наблюдават т.нар. “double hit”(11q-/17p-) дефект в 1% от случаите (*Greipp P T et al 2013*). Под формата на изолирана хромозомна аномалия 11q- бе установена в 3,3%(2/62) от пациентите в ранен стадий (А и В/Binet). Клиничното представяне на пациентите с del11q(самостоятелно или в комбинация с друга хромозомна аномалия) беше свързано с наличие на лимфаденомегалия, спленомегалия и стойности на абсолютния В-клетъчен лимфоцитен брой >20G/l. Само в един от случаите в рамките на 18 месечно проследяване не се наложи лечение, за разлика от останалите болни,

при които в различен интервал от време бе започната терапия. Хромозомната аберация присъства в моделите за стратификация на риска на Wiereda et al 2011, Rossi et al 2013, Pflug et al. 2014, но отсъства като прогностичен фактор в CLL-IPI. По литературни данни наблюдаваната хромозомната аномалия в по-голяма част от пациентите се асоциира с неблагоприятна прогноза (Guarini A et al, 2012). В зависимост от големината на дилетирания регион са описани два варианта на 11q-: „класически аберации“, включващи ATM локуса и атипични - разположени в близост до центромера, които са без определено клинично значение (фиг. № 32) (Sami Malek 2013).

Фигура №32. Засегнати региони в случаите на 11q- при пациенти с CLL (Product Catalogue 2017-2018 - Oxford Gene Technology)

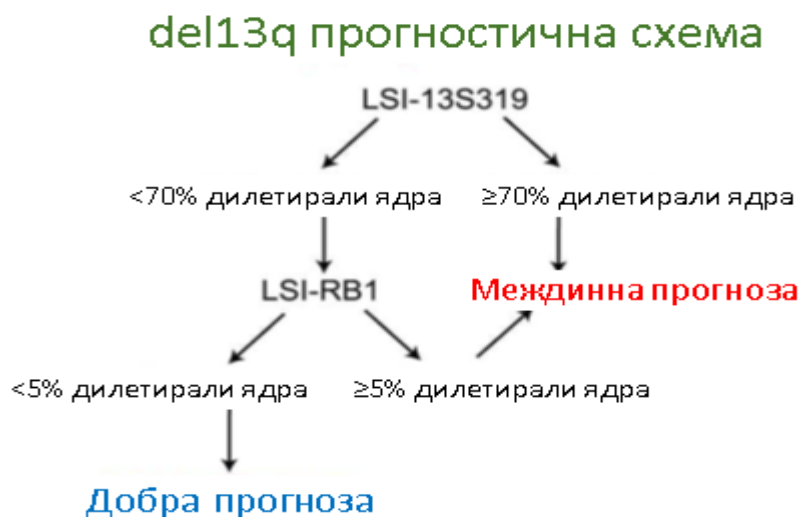


В повечето от научните доклади двете високорискови хромозомни аберации (17p- и 11q-) са описани при пациенти в напреднал клиничен стадий (Zenz T et al, 2012). В 12% (8/62) от пациентите, които ние проследихме, бяха установени 17p- и 11q-, като 10% (6/62) от носителите на тези хромозомни нарушения бяха в ранен А и В клиничен стадий по Binet.

Чрез използване на конвенционалната цитогенетика за изследване на увреждания, засягащи 13-та хромозома, описаната честота на споменатата хромозомна аномалия е 6 пъти по-малка в сравнение с резултатите, получени при прилагането на FISH метода. Това от своя страна е свързано с възможността чрез локус специфични сонди да се откриват по-малки или по-големи делеции, засягащи региона q14.3 (Hoffman Ret al 2013). Установяването на изолирана del13q се асоциира с благоприятно клинично протичане на заболяването

(SmonskeyT et al, 2012; Bagacean, C et al 2017). През последните години, във връзка с разширяване възможностите на молекулярната биология, бяха публикувани съобщения, които поставят под въпрос тази теза. Интересът към хромозомната аномалия е свързан с гените DLEU1, DLEU2, гена, включващ първия екзон на MIR15A/ MIR16-1 клъстер и гена за RB1, разположени върху дългото рамо на 13-та хромозома. Вниманието на изследователите е насочено върху влиянието на големината на засегнатия хромозомен регион, процента 13q- CLL клетки и съответно различното клинично протичане, обусловено от гореспоменатите фактори. Van Dyke и съав. докладват по-кратко време до първо лечение при пациентите с >85%CLL 13q- клетки (Van Dyke et al, 2016). Esther Orlandi и колеги съобщават за изненадващо кратка преживяемост без лечение (TFS 22 месеца) за пациенти със 70% CLL 13q-клетки (Orlandi E et al, 2013). Недева и съав. не са открили значителни разлики в TTFT при праг на CLL 13q- клетки 80%, но установяват разлика в PFS (Nedeva A et al, 2018). Според различните автори границите с прогностична значимост за 13q- могат да варират от 65 до 90% (Puiggros A et al, 2014). Michele Dal Vo и кол. дори предлагат, за по-прецизна прогностична оценка определена последователност в етапите на провеждане на FISH анализа която е представен на фиг.№33.

Фигура № 33. Прогностична схема при пациентите с доказана del13q (модифицирана по Michele Dal Vo <https://doi.org/10.1002/gcc.20885>)



В изследваната от нас група ние не установихме значима разлика в средното време до лечение за болните с >70% или <70% клетки със спомената хромозомна аберация. За разлика от това, при лицата, при които мутационният статус беше определен като УМ и бе доказана 13q -, средното време до лечение беше 20 месеца. Сходни данни са представени в проучване

на Jose D. Sandoval и кол., в което са били включени 273 пациента и чиято цел е била да се определи значението на мутационният статус при пациентите с т.нар благоприятни генетични аберации. Установеното време до лечение за лицата с изолирана 13q- и UM-IGHV статус е било 2,9г.(*Sandoval D.J et al 2018*). Това повдига въпроса доколко и в каква посока трябва да продължат изследванията при провеждане на скрининг и оценка на риска за нелекуваните пациенти с CLL. Разгледана като изолирана аномалия, цитогенетичната увреда може да има клинична изява, различна от тази, при която е в съчетание с друга хромозомна аберация или молекулярен маркер. През 2011г. Gladstone и колектив представят доклад, основаващ се на данните от проучване, обхващащо 94 пациента с del13q, от които 41 с UM-IGHV статус. Резултатите от проведеното изследване са показали, че именно мутационният статус е този, който предначертава клиничното протичане при пациентите с del13q(*Gladstone D E et al 2011*). В обхванатата от нас кохорта при 6% от пациентите 13q- бе наблюдавана в присъствието на 11q- или 17p- с фенотипна изява, свързана с ABCL > 50 G/l.

Цитогенетичните нарушения не могат напълно да обяснят генетичната основа и клиничното разнообразие на заболяването. По-детайлна е информацията, получена при определяне на молекулярните корелати на CLL(*Foà Ret al, 2013*). Поради факта, че методите на секвениране на DNA не се използват рутинно в клиничната практика, през годините различни изследователски колективи са проучили възможностите на PCR, като метод, позволяващ определянето на различни сурогатни маркери. Като най-близка по прогностична стойност на IGVH статуса, цитирана в литературата, е експресията на гените LPL, ZAP-70, ADAM29, SEPT10. През 2005г. Pablo Oppezzo и колектив предлагат като по-прецизен прогностичен фактор да се използва съотношението LPL/ADAM29. Авторите се позовават на факта, че при физиологични условия липопротеинлипазата не се експресира от В-лимфоцитите. Ензимът се установява в адипоцити, миоцити и се произвежда в значително по-ниски количества от макрофаги и хормон-продуциращите клетки на надбъбреците и яйчниците (*Heintel, D. et al 2005*). Ниската или липсваща активност на LPL в периферните, кръвни мононуклеарни клетки позволява тази необичайна експресия в лимфоцитите да бъде определена посредством PCR анализ (*Hartman M L et al, 2012*). Макарче не е достатъчно ясно каква е причината за аберентната експресия на LPL от лимфоцитите, понастоящем се предполага, че последната може да подпомогне и усилва предаването на сигнали, свързани с пролиферацията и оцеляването на CLL клетките (*Pietro D et al, 2017*). Основната функция на протеина е свързана с участието му в липидния метаболизъм (*Moreno, P.et al 2012*), но в същото време, поради способността му да образува своеобразен мост между обкръжаващите го молекули, има основание да се предположи също негово участие в процесите на взаимодействие с дендритните и стромални клетки. Пролиферацията и клетъчното оцеляване

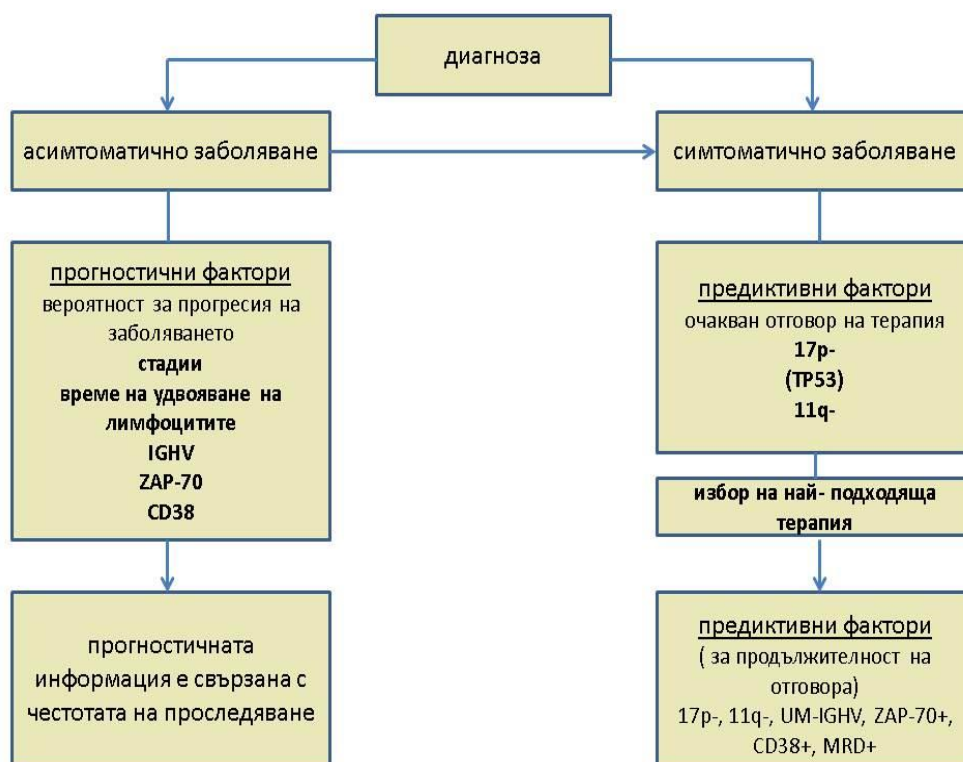
на CLL до голяма степен зависят от взаимодействието с клетките на обкръжаваща ги среда, което се потвърждава и от клиничния ефект на тирозинкиназните инхибитори, водещи до редистрибуция на лимфоцитите от лимфните органи в кръвния поток (*Yosifov D et al., 2020*). Проучвания върху клетъчния метаболизъм и източниците на доставка на АТР при CLL, установяват повишени нива на реактивните форми на кислорода (ROS) и завишен антиоксидативен капацитет в сравнение с нормалните В-лимфоцити (*Galicia-Vázquez G et al, 2018*). На практика няма категорични данни доколко CLL клетките, подобно на други неопластични клетки, използват ефекта на Warburg, който е свързан с увеличена скорост на усвояване на глюкозата и преимуществено производство на лактат при наличен кислород, като адаптивен механизъм за поддържане на биосинтетичните нужди на левкемичните клетки и неконтролирана пролиферация (*Liberti M V et al, 2015*). В проучване на Regina Jitschin и съавтори върху митохондриалния метаболизъм, авторите наблюдават повишено окислително фосфорилиране в CLL клетките като един от основните източници за генериране на енергия (*Jitschin R et al 2014*). Предполага се, че различният клетъчен метаболизъм е причината за PET/CT негативните резултати при спокоен ход на заболяването и позитивирането му в случаите на трансформация към DLBCL. Макар метаболитните пътища, които неопластичните клетки използват за да се адаптират и оцелеят, да не са добре познати и проучени, различни авторски колективи през годините са фокусирали вниманието си върху прогностичната стойност на LPL, както и в търсене на сурогатни на мутационния статус маркери. През 2008г. Dirk Kienle и кол. представят резултати от клинично проучване, обхващащо група от 151 пациента, при които са проведени FISH анализ, VH секвениране и PCR анализ. На базата на резултатите от проведения Cox регресионен анализ, авторите определят сурогатния маркер LPL като най-силният предиктивен фактор, свързан с общата преживяемост на пациентите, докато експресията на ADAM29 е независим прогностичен фактор, свързан с TTFT (*Kienle, D et al, 2008*).

Позовавайки се на предложения от Pablo Oppezzo алтернативен метод за определяне на мутационния статус, на базата на резултатите от проведената мултиплексна PCR, ние установихме два пъти по-малък брой пациентите с UM статус спрямо тези, при които статуса бе определен като MT. Изчисленото от нас средно време до започване на лечение в групата с UM статус беше значително по-кратко в сравнение с групата MT статус. След като определихме мутационния статус и възоснова на резултатите от проведения FISH анализ, потърсихме наличие на асоциация между цитогенетичните нарушения и мутационния статус. Наблюдавана бе връзка между хромозомните аберации в изследваната от нас група и мутационния статус, въпреки че броят на пациентите бе до известна степен лимитиращ фактор, за да могат да се направят категорични заключения. Сходни резултати са

представени в доклади, обхващащи значително по-големи пациентски групи. Thorsten Zenz и кол. установяват по-голяма честота на хромозомните аберации, свързани с неблагоприятна прогноза (11q, 17q-) сред лицата с UM-IGHV (Zenz T, Dohner H 2011).

През 2012г. Emili Monserrat, анализирайки значението на прогностичните и предиктивни маркери, представя алгоритъм при новодиагностицирани пациенти с CLL, приложим в рамките на клиничните изпитвания (фиг. № 34).

Фигура № 34. Предиктивни и прогностични маркери при нелекувани пациенти с В-CLL (модифицирана по Emili Monserrat CLL Therapy: ‘The Increasing Importance of Predictive Markers’ Oncology Journal Nov. 16.2012)



През същата година Chris Pepper и кол. докладват резултати от проучване, обхващащо 1154 нелекувани пациента в стадий А, като предлагат за тази група изследванията да се ограничат до определяне на мутационният статус, CD38 и мониториране на LDT в рамките на първите 12 месеца. В случаите на прогресия на заболяването и при избора на лечение, препоръката е допълнително да се изследва 17p- (PepperCet al 2010). Според Dirk Kienle молекулярните маркери позволяват скрининг на пациентите, но не могат напълно да заместят генетичните фактори, поради което понастоящем идеята е те да останат в основата на подходите за стратификация на риска (Kienle, D et al, 2008).

На базата на системен преглед на литературата Sameer Parikh публикува през 2018 г. доклад, в който предлага всички пациенти при поставяне на диагнозата да бъдат стратифицирани на базата на CLL-IPI в съответните рискови категории. Това се налага поради факта, че в около 40-50% от нелекуваните болни могат да бъдат установени неблагоприятни прогностични фактори като: del17p, del11q, UM-IGHV статус (*Parikh S 2018*). Въпреки, че CLL-IPI е създаден за прогнозиране на общата преживяемост, няколко изследователски колектива потвърждават прилагането му като прогностичен индекс, свързан с времето до първо лечение. Пациентите с изявиени симптоми, свързани със заболяването са започнали терапия независимо от това в коя рискова категория са били оценени. В кохортата от 48 пациента ние се опитахме да валидираме CLL-IPI, базирайки се на резултатите от проведените изследвания и позовавайки се на тезата, че прогностичният модел може да бъде използван за определяне на времето до терапия. Установихме разлика във времето до започване на лечение за отделните подгрупи, въпреки че за пациентите с висок и много висок риск тази разлика не беше значителна. Получените от нас резултати биха могли да се дължат на ограничения брой пациенти в групата с много висок риск. От друга страна, в обхванатата група разпределението на пациентите по стадии на заболяването не беше балансирано за отделните подгрупи. Освен това при част от болните лабораторните показатели бяха определени при поставянето на диагнозата и определянето на стадия (бета-2-микроглобулин, ABLC). Молекулярните маркери и хромозомните нарушения бяха изследвани на различен етап между диагностицирането и започване на лечението. Също така в групата от 48 пациента, бяха включени болни в напреднал стадий С, които по правило са показани за лечение. От общо 32-ма пациента, стадиранни в ранен А клиничен стадий, при 37,5% бяха наблюдавани неблагоприятните прогностични фактори: del17p и UM статус, което доказва значимостта на комплексната оценка на пациентите в ранен А клиничен стадий.

В мултицентрово, проспективно проучване на Немската CLL изследователска група, в което са били включени пациенти в ранен А клиничен стадий, изследователите потвърждават неблагоприятното прогностично значение на факторите: възраст над 60г., LDT по-кратко от 12 месеца, завишени стойности на β 2-MG, del11q, del17p, UM-статус. Добавяйки два независими прогностични фактора (del11q и LDT) авторите надграждат CLL-IPI и предлагат CLL1-PM като възможност за оценка на TTFT и OS при пациенти с нелекувана CLL в ранен стадий (*Hoechstetter MA et al, 2020*). На практика използването на мутационния статус като фактор, който не се променя в хода на заболяването и има стойност като прогностичен и предиктивен маркер (*Moia R et al, 2020*), в съчетание с останалите гореспоменати прогностични фактори, мутационният статус предоставя добра възможност за

по-прецизна оценка на риска от прогресия сред нелекуваните пациенти. Всеки един от изследваните прогностични фактори носи ценна информация и допълва тази, която останалите съдържат.

Постоянно нарастващите възможности за съвременна таргетна терапия при CLL ще налагат все по-прецизна стратификация на пациентските групи с оглед подбор на най-подходящо време за започване на най-подходящото лечение, спомагащи за възможно най-продължителна преживяемост на пациентите с В- CLL.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известна с изключително променливото си клинично протичане, В-CLL в продължение на години е била предизвикателство при разработване на различни модели за оценка на риска. Факторите, които са свързани с времето до лечение, косвено отразяват агресивността на заболяването. Възрастта е фактор, чието прогностично значение спрямо времето до лечение ние не потвърдихме, по-скоро според нас тя би имала значение при определяне на преживяемостта на пациентите с В-CLL. Провеждането на стадиращи процедури още при поставяне на диагнозата е важно поради необходимостта от проследяване на асимптоматичните пациенти, които са основната част от новодиагностицираните лица. Не винаги нарастването на абсолютния лимфоцитен брой се асоциира с прогресия, както и обратното. Наличието на ангажиране на лимфни зони извън достъпните за палпация области би променило стадирането, базирано само на данните от физикалния статус. Серумният $\beta 2$ -MG е показател, чиито нива се влияят от множество фактори, свързани не само с процесите на активиране на лимфоцитите, но и с редица съпътстващи състояния. Динамично променящите се стойности на показателя могат да бъдат завишени при тласък на хронична застойна сърдечна недостатъчност, съпътстваща инфекция, както и при увредена, макар и не манифестна бъбречна функция, често срещани заболявания при лицата над 60г. Към настоящия момент изграждането на прогноза за клиничния ход на заболяването и съответно определяне на клиничния подход при пациентите с нелекувана CLL се основава на познанията ни върху т. нар “класически“ прогностични фактори. Добавянето на част от множеството молекулярни и генетични маркери, отразяващи косвено сложните и динамични процеси, свързани с автономни механизми на пролиферация и апоптоза, типични за неопластичните клетки, предоставя възможност за по-добра оценка на риска от прогресия, а също така и избор на адекватна терапия за пациентите, нуждаещи се от лечение. Не е за подценяване фактът, че някои от неблагоприятните прогностични фактори могат да бъдат установени при немалка част от

пациентите с нелекувана В-CLL, което на практика ние констатирахме в обхванатата от нас група. На този етап използването на RNA–базирани сурогатни маркери, като алтернативен вариант за определяне на мутационния статус, може да послужи за по-прецизна оценка на риска от ранна прогресия на заболяването. Разгледани като комплекс, всички споменати прогностични фактори, определени при диагностициране на заболяването могат да бъдат приложени в клиничната практика за оценка на времето до лечение и риска от прогресия. Макар и в малка група от пациенти, използвайки сурогатен на мутационния статус маркер, ние се опитахме да валидираме CLL-IP1. Въз основа на данните от анализа според нас, молекулярните и генетични нарушения неоспоримо предоставят ценна за клиничната практика информация. Изпълнявайки двойствена роля на прогностични и предиктивни маркери, мутационният статус и хромозомните аберации подлежат на оценка още при диагностициране на заболяването, с оглед определяне на риска от ранна прогресия и по-прецизен избор на терапия.

ИЗВОДИ:

Позовавайки се на резултатите, от проведения анализ на достъпните за изследване прогностични фактори, свързани с TTFT при нелекувани пациенти с В-CLL, бихме могли да направим следните изводи:

- ✓ Средната възраст на новодиагностицираните пациенти с В-CLL в проведеното от нас проучване е 67г. Разгледана самостоятелно възрастта не е фактор, оказващ влияние върху времето до започване на лечение.
- ✓ Пациентите в ранен стадий на заболяването са най-голяма част от болните от В-CLL, посетили специализираните звена Хематологичен кабинет и Хематологична клиника.
- ✓ Клиничният стадий на заболяването е значим фактор, свързан с TTFT.
- ✓ Високите нивата на серумния β -2 MG корелират с по-кратко време до лечение. При пациентите в ранен А стадий се наблюдава негативна зависимост между стойностите на показателя и TTFT.
- ✓ Абсолютният В-клетъчен лимфоцитен брой със стойности към диагностициране на заболяването над 50 G/l е свързан с възможност за ранна прогресия.
- ✓ Наличието на del11q и del17p, или съчетанието на повече от една хромозомна аберации, включително и в комбинация с del13q, се асоциират с по-кратко TTFT.

- ✓ PCR анализът позволява идентифициране на високо рискови пациенти с UM статус, при които средното време до започване на лечение е значително по-кратко в сравнение с TTFT при лицата с MT статус.
- ✓ del13q се наблюдава по-често при пациентите с мутирал статус и е свързана с благоприятна прогноза, за разлика от структурните аберации 11q- и 17p-, които се установяват при лицата с немутирал статус и корелират с кратко TTFT. Прогностичната стойност на 13q- е различна в случаите, когато последната е съчетана с немутирал статус.
- ✓ В над 1/3 от пациентите в ранен стадий бяха наблюдавани неблагоприятните прогностични фактори: del17p и UM статус, което доказва необходимостта от изследването им още при диагностициране на заболяването.
- ✓ Комплексната оценка, изградена на базата на достъпните за изследване молекулярно-генетични маркери при пациентите с нелекувана B-CLL осигурява по-добра възможност за стратифициране на риска от прогресия, определяне на времето до лечение, периода за проследяване на болните и съответно избора на най-адекватна терапия.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

- ✓ За първи път е изследвана връзката между неблагоприятните молекулярно-генетичните фактори, при пациентите с нелекувана В- CLL и влиянието им върху времето до започване на лечение, което от своя страна позволява избора на най-адекватна съвременна терапия .
- ✓ Направена е стратификация на пациентите с нелекувана В- CLL на базата на интегриране на сурогатен маркер към класическите прогностични фактори и хромозомни аберации .

Приноси с потвърдителен характер

- ✓ Потвърдено е значението на стадия на заболяването и определящото му влияние върху времето до лечение.
- ✓ Потвърдено е наличието на корелационна зависимост между стойностите на серумния бета-2 микроглобулин и времето до лечение.
- ✓ Потвърдена е необходимостта от оценка на молекулярните и генетични фактори, асоциирани с риска от прогресия на заболяването и съответно с риск-адаптирана терапия.

Приноси с приложен характер

- ✓ Изготвена е анкетна карта съдържаща информация за пациента и заболяването.
- ✓ Разработен е подход за скрининг на високорискови пациенти с нелекувана В- CLL.

АНКЕТНА КАРТА №

за пациент с нелекувана В- хронична лимфоцитна левкемия

1. Име Фамилия
2. възраст
3. Адрес телефон за контакт.....
4. Дата и година на диагнозата:.....
(в случай, че лицето е с доказана или новооткрита В-хронична лимфолевкоза)
5. Рискови фактори- (заградете вярното)
 - алкохол- да / не
 - тютюнопушене- да / не
 - работа с пестициди да / не
 - фамилна обремененост за карцином - да / не
6. Съпътстващи заболявания:
7. ECOG – физически капацитет
(заградете вярното) - 0, 1, 2, 3, 4
8. Конституционални симптоми :
 - фебрилитет над 37.5 -да / не
 - нощни изпотявания -да / не
 - редукция на телесна маса -да / не

Стадии на заболяването към диагнозата, определен чрез физикален преглед, рентгенография на бял дроб, ехография на коремни органи, при необходимост СТ-(заградете вярното)

Стадии Binet	Брой лимфни зони	Хемоглобин g/l	Тромбоцитен брой X 10 ⁹ /l
A	< 3	> 100	>100
B	> 3	> 100	> 100
C		< 100	< 100

9. Автоимунни феномени:
 - а/ автоимунна хемолитична анемия- да/ не

б/ автоимунна тромбоцитопения- да/ не

10 .Към диагнозата:

Левкоцитен брой общG/l лимфоцити% АЛБ.....;

AVCL

- 6- месеца след диагнозата:

Левкоцитен брой общG/l лимфоцити% АЛБ.....;

- 12- месеца след диагнозата:

Левкоцитен брой общG/l лимфоцити% АЛБ.....;

11.Флуцитометрични маркери: при диагностициране (посочете вярното)

а/ CD 38- положителен

б/CD49d - положителен

- отрицателен

- отрицателен

12. Серумен β2 – микроглобулин- стойности:

13. Молекулярно-генетични изследвания:

хромозомни аберации: (опишете).....

del 17p.....

del11q.....

del13q.....

LPL/ ADAM29- (заградете вярното):

UM- немутирал

MT - мутирал

Дата на попълване

Лекар, попълнил формуляра

на картата :

/ подпис и име/ :

I. ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ:

- Slavcheva V., Balatzenko G., Angelova S., Naseva E., Lukanov Tz, Tzvetkov N. CLINICAL STUDY OF GENE EXPRESSION PROFILE AND SOME OF THE MOST COMMON CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN UNTREATED B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA PATIENTS J of IMAB. 2020 Jan-Mar;26(1):2905-2909; DOI: <https://doi.org/10.5272/jimab.2020261.2905>
- Slavcheva V., Ignatova K., Nguen D., Tonchev P, Todorieva D., Bogdanov L., Hristov I, Tzvetkov N. The different faces of chronic lymphocytic leukemia - two clinical cases. подадена за печат за списание: JOURNAL OF BIOMEDICAL AND CLINICAL RESEARCH-приложена служебна бележка
- Vanya S. Popova, Svetla O. Blajeva, Margarita L. Alexandrova, Tsvetan H. Lukanov, Silvia Y. Naneva, Nikolay T. Tzvetkov PROGNOSTIC BIOMARKERS IN EARLY-STAGE B-CLL PATIENTS J Biomed Clin Res
- Vanya Popova, Svetla Blazheva, Tsvetan Lukanov, Silvia Naneva, Nikolay Tzvetkov. STUDY OF THE IMMUNOLOGICAL MARKERS CD49d AND CD38 IN EARLY-STAGE B-CLL PATIENTS <https://doi.org/10.5272/jimab.2018241.1883>

Цитирана в:

Vosoughi T, Bagheri M, Hosseinzadeh M, Ehsanpour A, Davari N, Saki N. CD markers variations in chronic lymphocytic leukemia: New insights into prognosis. *J Cell Physiol.* 2019; 234: 19420– 19439. <https://doi.org/10.1002/jcp.28724>. *Импакт фактор* = 4,52

II. СЪОБЩЕНИЯ НА НАУЧНИ ФОРУМИ:

- Славчева, В. Антонов, А. Велкова, А, Луканов, Ц. Цветков, Н. Хронична лимфолевкоза, клинично протичане, прогностични фактори. Доклад на VII конгрес по хематология. 8-10.10.2003
- Slavcheva V., Blajeva S., Naneva S., Tsvetkov N., Todorova D., Hristov I., Lukan Ts Demographic and clinical factors in newly diagnosed patients with B- CLL. XIV International medical scientific conference for students & young doctors. 10-15 2016, Medical University – Pleven, Bulgaria- постер

С уважение и сърдечна благодарност на:

- научния ми ръководител проф. д-р Лиана Герчева за оказаната безценна подкрепа, вяра и помощ при разработване и написване на дисертационния труд
- на проф. Георги Балаценко и ръководеният от него колектив към СБАЛХЗ- София, за ценните идеи, методична помощ и съдействие при реализиране на предходни и настоящ проект
- на доц. Николай Цветков и доц. Цветан Луканов, и всички колеги от Клиника по Хематология и Лаборатория по имунодиагностика – УМБАЛ Плевен, за тяхното сътрудничество, приятелство и професионална помощ
- на всички пациенти, които дадоха своето съгласие за участие в научноизследователските проекти, послужили като основа за настоящият дисертационен труд
- на брат ми и приятелите които срещнах, за тяхното търпение, морална подкрепа и безрезервна любов