



**Медицински университет - Варна  
„Проф. Д-р Параскев Стоянов”**

---

**Факултет „Медицина“  
Катедра „ Вътрешни болести II“**

**Д-Р ШЕНИЗ МУСТАФА ЮЗЕИР - САЛИЕВА**

**АНАЛИЗ НА РОЛЯТА НА ЦИРКУЛИРАЩИТЕ  
НЕУТРОФИЛНО-ТРОМБОЦИТНИ КОМПЛЕКСИ КАТО  
РЕГУЛАТОРИ НА ТУМОР-ИНДУЦИРАНАТА НЕТОЗА ПРИ  
ИНДОЛЕНТНИ И АГРЕСИВНИ НЕХОЧКИНОВИ ЛИМФОМИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна  
степен „Доктор”

**Научен ръководител:**

Проф. д-р Лиана Герчева - Кючукова, д.м.

**Научен консултант:**

Проф. д-р Игор Резник, д.м.н.

**Официални рецензенти:**

Проф. д-р Маргарита Генова, д.м.

Доц. д-р Веселина Горанова-Маринова, д.м.

**Варна, 2022 г.**

Дисертационният труд е представен в обем 166 страници и съдържа 8 таблици и 47 фигури. Литературната справка включва 299 заглавия.

Изследването е финансирано по научно-изследователски проект към БЛС проектна сесия 2019 година на тема: “Анализ на ролята на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси като регулатори на тумор-индуцираната нетоза при В-клетъчни лимфопрролиферативни неоплазми“, послужил за разработване и защита на настоящия дисертационен труд.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита пред Катедрен съвет на Катедра „Вътрешни болести II“ при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна и е насочен за публична защита пред научно жури в следния състав:

Външни членове:

Проф. д-р Маргарита Любенова Генова, д.м.

Доц. д-р Веселина Стефанова Горанова- Маринова, д.м.

Доц. д-р Мимоза Цветанова Станева, д.м.

Резервен външен член:

Проф. д-р Стефчо Емилов Горанов, д.м.

Вътрешни членове:

Проф. д-р Лиана Тодорова Герчева- Кючукова, д.м.

Доц. д-р Илина Димитрова Мичева, д.м.

Резервен вътрешен член:

Проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... 2021 г. от ..... часа в зала ..... на открито заседание на Научното жури. Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицински университет „Проф. д-р П.Стоянов“ – Варна и в електронен вид на сайта на МУ – Варна.

## **СЪДЪРЖАНИЕ**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД, ЗАДАЧИ, НАУЧНА ХИПОТЕЗА	8
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	9
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ	14
V. ДИСКУСИЯ	48
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
ИЗВОДИ	55
ПРИНОСИ	56
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА	57
БЛАГОДАРНОСТИ	58

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА КИРИЛИЦА

ЕТ	Есенциална тромбоцитемия
ИХХ	Имунохистохимия
КТ	Компютърна томография
ЛДХ	Лактатдехидрогеназа
МПН	Миелопролиферативни неоплазии
НХЛ	Нехочкинови лимфоми
ПЕТ/КТ	Позитронно-емисионна томография с компютърна томография
СЗО	Световна здравна организация

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА ЛАТИНИЦА

ADP	Adenosine Diphosphate
Akt	Protein kinase B
CD40L	CD40 Ligand
CD42b	Glycoprotein Iba
CD62P	P-Selectin
CHOEP	Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, etoposide and prednisone
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DVT	Deep Vein Thrombosis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-related kinase
FcγRIIa	Fc Receptor IIa for IgG
FL	Follicular lymphoma
fMLP	N-formyl-methionine-leucyl-phenylalanine;
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GP	Glycoprotein
GPIba	Glycoprotein Iba
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1α;
IgG	Immunoglobulin G
IL-10	Interleukin- 10
IPI	International Prognostic Index
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
LPL	Lymphoplasmacytic lymphoma
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	Macrophage-1 Antigen
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL	Mantle cell lymphoma
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex

MZL	Marginal zone B-cell lymphoma
MPO	Myeloperoxidase
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NE	Neutrophil elastase
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NK	Natural Killer
PAD4	Peptidylarginine deiminase 4
PBL	Plasmablastic lymphoma
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C
PLA	Platelet- leukocyte aggregate
PLTCL	Peripheral T-cell lymphoma
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMC	Platelet- monocyte complexes
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
PNC	Platelet-neutrophil complexes
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
R-B	Rituximab, bendamustine
R-CHOP	Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and methylprednisolon
R-CNOP	Rituximab, cyclophosphamide, mitoxantrone, vincristine and methylprednisolon
R-COP	Rituximab, cyclophosphamide, vincristine and methylprednisolon
Rheb	Ras homolog enriched in brain
R-IPi	Revised- International Prognostic Index
ROS	Reactive oxygen species
RSK	Ribosomal S6 kinase
sCD40L	Soluble CD40 Ligand
SLL	Small lymphocytic lymphoma
TF	Tissue factor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TH17	T Helper 17 Cell
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TXA2	Thromboxane A2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VTE	Venous Thromboembolism
VWF	Von Willebrand Factor

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Нехочкиновите лимфоми (НХЛ) са хетерогенна група клонални заболявания на лимфопоезата, с широк спектър от клинични, биологични и хистопатологични характеристики. Патолофизиологично те са свързани със значими промени в имунната реактивност и клетъчната хомеостаза.

В развитието на лимфомния процес участват плеяда от цитокини, които се намесват в клетъчните взаимодействия между левкоцитите, тромбоцитите и ендотелните клетки (Kirton SM et al., 2000). Свърхекспресията на някои от тях, довежда до засилено активиране на циркулиращите левкоцити и тромбоцити, както и до повишената им адхезивност към съдовия ендотел (Evangelista V et al., 1991).

През последните години се доказва, че неутрофилите и тромбоцитите са активни участници не само във възпалителните процеси, но и в редица патологични състояния, включително в развитието на неопластични заболявания и тромбоза. Взаимодействието между циркулиращите тромбоцити и неутрофили е процес, характеризиращ се с интензивен обмен на вътреклетъчни сигнали. Образоването на комплекси, наречени platelet-neutrophil complexes (PNC), има ключова роля в модулирането на широк спектър патологични състояния, както на вродената, така и на придобитата имунна системи. PNC участват в патогенезата на възпалителните процеси, злокачествените заболявания и тромботичните усложнения. Те инициират поредица от реакции, осъществявани на клетъчно и молекулярно ниво и участват активно в генерирането на т. нар. NETosis, клетъчна програма за формиране на неутрофилни екстрацелуларни мрежи (NETs). Последните са съставени от ДНК, хистони, неутрофилни гранулирани протеини, включващи съдържанието на първичните, вторични и третични гранули, цитоплазмени компоненти, и други ензимно активни протеази и пептиди, които имат прокоагулантни свойства (Mantovani A et al, 2011; Kumar V et al, 2010). NETs се намесват в редица патологични процеси, включващи тромбообразуване, туморно метастазиране, туморна прогресия и др.

Пусковият механизъм при процеса NETosis е декондензацията на хроматина, която преминава през три етапа с участие на ензимите PAD4, NE и MPO (Brinkmann V et al, 2013). Първият етап включва освобождаването на протеини от неутрофилните гранули в цитозола. Вторият се състои в епигенетичната модификация на хистоните (Ravindran et al, 2019). В последния етап на NETosis хроматинът се освобождава в околната среда с образуване на NETs.

Понастоящем са описани две фундаментално различни форми на NETosis: класическа или суицидна, която води до клетъчна смърт и жизнена или витална NETosis, при която клетката запазва не само жизнеспособност, но и много от ефекторните си функции. Активираните тромбоцити и неутрофили функционират като индуктори на NETosis.

Ключова роля при образуването на комплекси между неутрофили и тромбоцити играе адхезионната молекула P-селектин, която се експресира върху повърхността на активирани ендотелни клетки и върху циркулиращите тромбоцити. Активацията на тромбоцитите протича в резултат на задвижване на два пускови механизма: (1) от

неутрофилните гранулоцити, като в свързано с последните състояние нивото на тромбоцитите се увеличава два пъти повече и (2) чрез протромботичен сигнал, който се получава от т.нар. G-протеин или тирозин-свързан рецептор.

След активиране на тромбоцитите основен етап в образуването на PNC е взаимодействието между P-селектина от тромбоцитната мембрана (CD62 P) и лиганда PSGL-1, намиращ се върху неутрофилите (Moore KL et al, 1995).

PNC провокират повишена неутрофилна фагоцитна активност, засилена трансмиграция на левкоцитите и екстравазация към възпалителните огнища (Assinger et al, 2011; Badrnya S, et al, 2014; Diacovo TG et al, 1996). Повишава се производството на реактивни кислородни видове, активира се коагулацията и се потенцира образуването на неутрофилни извънклетъчни капани (Gros et al, 2015; Clark et al, 2007).

Съществува предполагаема връзка между циркулиращите PNC и механизмите на тумор-индуцирана нетоза, участващи в развитието и прогресията на Нехочкиновите лимфоми. Циркулиращите неутрофили активно влияят върху туморогенезата, а заедно с тромбоцитите регулират различни, последователни събития, случващи се в хода на възникването и развитието на малигнения процес. В тази връзка PNC се считат за ключови регулатори на тумор-индуцираната NETosis.

Ролята на NETs в туморната биология се осъществява чрез модулиране процесите на клетъчна пролиферация, диференциация и метастазирание. Взаимодействията между тромбоцити и неутрофили са водещи фактори за засилена NETosis, а образуваните комплекси между тях потенцират различни, взаимосвързани реакции, необходими за регулирането на вътреклетъчния баланс.

Анализът на нивата на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси при лимфопролиферативните неоплазми би допринесъл за подобряване на диагностиката и оценката на прогностичния риск и би послужил за разработване на нови, обещаващи стратегии за ранното им откриване, прогнозиране и избор на адекватно лечение, включващо комбиниране на таргетна и/или химиотерапия.

## **II. ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД, ЗАДАЧИ, НАУЧНА ХИПОТЕЗА**

### **1. Цел**

Да се дефинира ролята на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси (PNC) като регулатори на тумор-индуцираната нетоза и като потенциални, предиктивни биомаркери за развитието, клиничната изява, прогресията и ефективността на провежданото лечение при пациенти с индолентни и агресивни НХЛ.

### **2. Задачи**

За постигане на поставената цел се формулират следните изследователски задачи:

1. Да се направи сравнителен анализ между нивата на PNC, изследвани *in vivo* и *in vitro* (след стимулация с ADP и PMA) при пациенти с индолентни и агресивни НХЛ.
2. Да се определят изходните нива на PNC при новодиагностицирани пациенти с индолентни и агресивни НХЛ, както и след проведена противотуморна терапия – мониториране на динамиката на PNC.
3. Да се потърси корелационна зависимост между нивата на PNC и различни клинично-лабораторни характеристики при пациентите с агресивни и индолентни НХЛ.
4. Да се изследва евентуална зависимост между стадия на заболяването, рисковия профил на пациента, терапевтичния режим и промените в нивата на PNC.
5. Да се изследва влиянието на нивото на PNC върху степента на терапевтичния отговор, туморната прогресия и едногодишната преживяемост.
6. Да се идентифицира евентуалната роля на PNC при определяне на риска от тромботични усложнения преди, по време и след провеждане на лечение.
7. Да се потърси свързаност между нивата на PNC, IL-10 и VEGF при индолентни и агресивни лимфопролиферативни неоплазми.

### **3. Научна хипотеза**

Нивата на циркулиращите в кръвта PNC, като регулатори на тумор-индуцираната нетоза, повлияват клиничната изява, развитието и туморната прогресия на НХЛ, и имат значение за изхода от прилаганото лечение.



### **III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

#### **1. Материална база за реализиране на дисертационния труд**

- Клиника по Клинична хематология – УМБАЛ „Света Марина“ – Варна
- Лаборатория по Клинична имунология към Катедра по медицинска генетика–УМБАЛ „Света Марина“ – Варна
- Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология – УМБАЛ „Света Марина“ – Варна

#### **2. Обект на проучването**

В проучването са включени общо 90 новодиагностицирани пациенти с агресивни и индолентни НХЛ, на възраст над 18 години, както и 20 здрави индивиди, служещи за контроли.

Пациентите са анализирани проспективно и проследявани за период от 1 година, като първият пациент е включен през месец Май 2020 година, а проследяването на последния е до края на месец Октомври 2021 година. Проучването беше проведено в Клиниката по Клинична хематология към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна след одобрение от Комисията по етика на научните изследвания при МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, в съответствие с изискванията на Хелзинкската декларация. Участниците предварително подписваха информирано съгласие (Приложение 1).

#### **3. Подбор на пациенти**

В дисертационния труд са включени новодиагностицирани пациенти с хистологично верифицирани НХЛ според патолого-анатомичните критерии за поставяне на диагнозата на ESMO Guidelines Committee (Май 2017).

За поставяне на диагнозата са използвани следните рутинни методи и маркери:

- Анамнеза с насоченост за В симптоматика
- Клиничен преглед (ECOG, насочено изследване на периферни лимфни възли, включително Waldeyer’s пръстен, черен дроб и слезка)
- Периферна кръвна картина и диференциална кръвна картина
- Показатели за чернодробната и бъбречна функции
- Показатели за активност на заболяването – лактатдехидрогеназа (ЛДХ) и  $\beta$ 2-микроглобулин
- Вирусологични изследвания – HBV, Anti-HCV (възможност за реактивация след имунотерапия)
- Ексцизионна биопсия на лимфен възел или орган/тъкан с имунохистохимия
- Костно-мозъчно изследване (трепанобиопсия)
- Образни методи: ПЕТ, КТ на шия, гръдна клетка, корем и малък таз с контраст
- Флоуцитометрично изследване на венозна кръв
- Определяне на принадлежност към рискова група по IP1 скорингова система
- Оценка на стадий на НХЛ – прилага се Ann Arbor стадийната система (Lugano модификация).

#### 4. Рутинни клинични процедури и изследвани показатели

Параметрите за диагностика и проследяване са предварително дефинирани и проспективно оценявани в рамките на научното изследване. Провеждани са следните процедури:

- Клиничен преглед, включващ анамнеза и статус, измерване величината на лимфаденомегалията, на спленомегалията (при присъствие), на хепатомегалията (при присъствие)
- Рутинни лабораторни изследвания :
  - периферна кръвна картина с диференциално броене
  - стандартен набор от биохимични показатели, определящи активността на лимфомния процес, чернодробна и бъбречна функция
  - стандартен коагулационен анализ
- Костно-мозъчно изследване (трепанобиопсия)

#### 5. Специфични методи на изследване. Получаване и съхраняване на проби.

##### 5.1 Определяне нивата на неутрофилно-тромбоцитните комплекси (PNC)

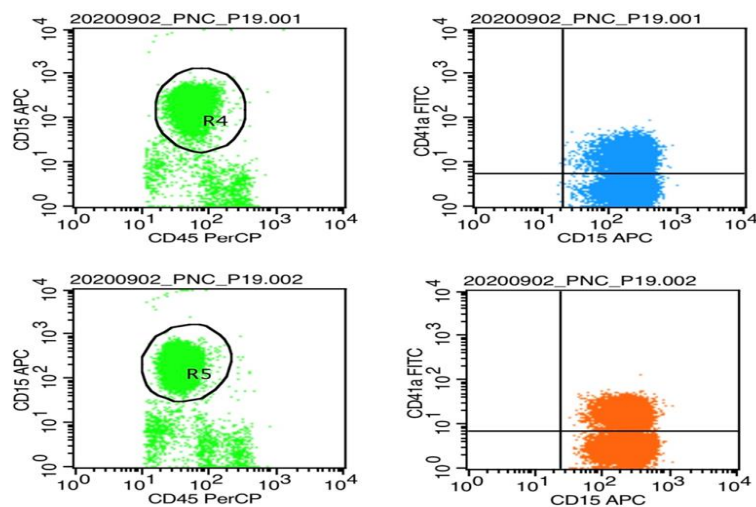
Венозна кръв за определяне нивата на циркулиращите PNC е вземана при здрави контроли (n=20) и всички пациенти (n=90) изходно, а при тези, лекувани с химиотерапия или имуно-химиотерапия (n=83) и след 6-тия месец от лечението (втора, контролна кръвна проба). Количеството на всяка кръвна проба беше 8 ml, разпределена в два вакутейнера, съдържащи два различни антикоагуланта ACD и EDTA. Всички проби са обработвани в Имунологичната лаборатория на УМБАЛ „Света Марина“ - Варна.

Материалът за *in vitro* образуване на PNC се състоеше от цялостна кръв, взета в затворена система с антикоагулант цитрат (Becton Dickinson, USA, BD Vacutainer® 8,5 mL каталожен номер 364606, с адитив ACD Solution A: тринатриев цитрат 22,0 g/L; лимонена киселина 8,0 g/L; D-глюкоза 24,5 g/L; 1,5 mL). Венепункцията беше извършена задължително атравматично, за да се предотврати активация на тромбоцитите при пробовземането.

Анализът на образуваните PNC беше извършен според метода на Mauler и съавтори, с последващи модификации (Mauler et al, 2016).

1. 100 µl венозна кръв се разрежда 6 пъти с 500 µl фосфатно-буфериран изотоничен разтвор (phosphate buffered saline, PBS, 150 mM NaCl, pH 7,4) с температура 37 °C.
2. 45 µl от разредената кръв се смесва внимателно в три отделни епруветки, съответно с 5 µl PBS, 200 µM аденозиндифосфат (ADP, кат. №0203001, MöLab, Германия), активиращ тромбоцитите, или 1 µM форбол миристат ацетат (PMA, кат. № P1585, Sigma-Aldrich, Германия), активиращ неутрофилите, след което се инкубира в продължение на 15 минути при стайна температура.
3. След това към всяка отделна епруветка се прибавя 6 µl смес от моноклонални антитела, съдържаща 2 µl CD45-PerCP (клон: 2D1, кат. №347464, BD Biosciences, САЩ), 2 µl CD15-APC (клон: HI98, кат. №551376, BD Biosciences, САЩ) и 2 µl CD41a-FITC (клон: HI98, кат. №555466, BD Biosciences, САЩ) за 15 минути при стайна температура.
4. Оцветените проби се смесват с 400 µl 37 °C лизиращ разтвор 1× FACS Lysing Solution (кат. №349202, BD Biosciences, САЩ), лизиращ еритроцитите и фиксиращ клетките, и се инкубират в продължение на 30 минути при стайна температура.

5. Анализ чрез поточна цитометрия на апарат BD FACSCalibur (Becton Dickinson, САЩ) със софтуер CellQuest Pro версия 6.1. Събират се 20 000 събития/клетки в режим лизиране без измиване (lyse-no-wash, LWN) с прагов параметър за дискриминиране CD45. Неутрофилните гранулоцити се гейтират по CD15 APC/SSC. Циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси се отчитат по двойно-позитивния сигнал на тромбоцитния маркер CD41a и неутрофилния маркер CD15 ( Фиг.1). Като краен резултат е използван дялът на тромбоцитно-левкоцитните агрегати в нестимулираната кръв, а стимулираната с РМА или ADP венозна кръв служи за позитивна контрола (Mauler M et al. 2016).



**Фигура 1. Флоуцитометричен анализ на неутрофилно-тромбоцитни комплекси (PNC%)**

## 5.2 Определяне на серумни нива на IL-10

Венозна кръв за определяне серумните нива на IL-10 е вземана едновременно и еднократно от 90 пациенти и 20 здрави контроли. Нивата на IL-10 са определени в кръвен серум чрез готов тестов набор Human IL-10 Immunoassay, Quantikine ELISA Kit, каталожен номер D1000B, на фирмата R&D Systems, USA. Материалът за изследване е серум, взет със затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Becton Dickinson. След венепункцията кръвта е оставяна за 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 15 минути при  $1\ 000\times g$  и е съхраняван при температура  $-80\ ^\circ C$  до извършването на анализа. Анализът на IL-10 е осъществен според протокола на производителя, както следва:

1. Към всяко кладенче на плаката се прибавят по 50  $\mu l$  от разтворител RD1W.
2. Към съответните кладенчета се прибавят по 200  $\mu l$  от стандартите, контролите и пробите в рамките на 15 минути. Плаката се запечатва със самозалепващо се фолио и се инкубира за 2 часа на стайна температура.
3. Съдържанието на кладенчетата се аспирира и се измива с 300  $\mu l$  от съответния измиващ буфер общо четири пъти. След последното измиване кладенчетата се изпразват щателно и се попиват върху хартия.

4. Към всяко кладенче се прибавят по 200  $\mu$ l от вторичното антитяло за IL-10, конюгирано с ензим и плаката се запечатва със самозалепващо се фолио. Инкубира се 2 часа на стайна температура.
5. Плаката се измива, аналогично на стъпка 3.
6. Към всяко кладенче се прибавят по 200  $\mu$ l от хромогенния субстратен разтвор и плаката се инкубира за 30 минути на стайна температура, защитена от светлина.
7. Към всяко кладенче се прибавят по 50  $\mu$ l спиращ ензимната реакция разтвор, като плаката се разклаща за размесване.
8. В рамките на 30 минути е отчетена оптичната плътност на кладенчетата при 450 nm с корекция при 570 nm с Microplate Reader MIT511-4 на фирмата Nicesound Electronics Group.
9. Концентрацията на IL-10 в pg/ml е изчислена на базата на съответните стандарти чрез 5-параметрична, логистична, нелинейна регресия, използвайки софтуер GraphPad Prism версия 9.2.0 на фирмата GraphPad Software.

### **5.3 Вземане, съхранение и обработка на костно-мозъчна проба (трепанобиопсия) за определяне нивото на VEGF като маркер за ангиогенеза и интерпретация на резултати.**

Костно-мозъчно изследване при всички пациенти с НХЛ (n=90) и здрави контроли (n=20) бе извършено еднократно.

#### **5.3.1 Определяне на степен на експресия на VEGF. Подготовка на биопсичните материали за имунохистохимично изследване.**

1. Биопсичните материали (фиксираны в неутрален формалин и включени в парафинови блокчета) бяха нарязани на срези с дебелина 5 микрона и поставени върху силанизираны стъкла.
2. Депарафинизацията се осъществи в низходяща редица от алкохоли, както следва: Ethanol 100% 3 мин., Ethanol 90% 3 мин., Ethanol 80% 3 мин., Ethanol 70% 3 мин., Xylol 3 x 10 мин. След това срезите се измиха с течаща вода и се поставиха в дестилирана вода.
3. Антигенно разкриване: разкриването на антигените се осъществи с предварително загрят до 65°C En Vision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) в PT Link контейнер, като срезите бяха инкубирани за 20 мин. при температура 97°C и pH=9. 4. След охлаждане пробите бяха промити на стайна температура с измиващ буфер FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути. Срезите бяха оцветени по FLEX протокол, като за всички стъпки се използва влажна камера.
4. Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) за 5 минути на стайна температура за блокиране на ендогенната пероксидазна активност. Изплакване с измиващ буфер за 5 мин.
5. Инкубация с първичното антитяло (Monoclonal Mouse Anti – Human Vascular Endothelial growth Factor clone VG1, Dako) с разреждане 1:50 на стайна температура (overnight).
6. Промиване с измиващ буфер за 2 x 5 мин. на стайна температура.
7. Инкубация с маркиран полимер HRP за 20 мин. на стайна температура.

8. Промиване с измиващ буфер за 3 x 5 мин. на стайна температура.
9. Инкубация на срезове с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2x5 мин., при непрекъснато микроскопиране.
10. Промиване с буфер за 2 мин, изплакване с дестилирана вода за 2 мин., контраоцветяване с Mayer's hematoxylin за 5 мин, изплакване на пробите с дестилирана вода за 5 мин. Дехидриране в обратен възходящ ред етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100% със същата продължителност, както при депарафинизацията, поставяне в монтираща среда.

### **5.3.2 Определяне на нивата на експресия на VEGF и интерпретация на резултатите.**

Имунохистохимичната експресия на анти тялото бе оценена полуколичествено чрез използване на H-score (histo-score) върху тъканните проби. Първо, за всяка клетка в различни полета бе определяна мембранната и цитоплазмена интензивност (0, 1+, 2+, или 3+). Процентът на позитивните клетки за всеки отделен интензитет бе пресметнат, като накрая H-score бе изчислен посредством следната формула:  $[1x (\% \text{ клетки с } 1+) + 2x (\% \text{ клетки с } 2+) + 3x (\% \text{ клетки с } 3+)]$ , в диапазон от 0 до 300.

## **6. Статистически дизайн и анализ**

Статистическият анализ е извършен със SPSS Statistics V.20 за Windows, като са използвани следните поданализи:

- Дисперсионен анализ (ANOVA)
- Вариационен анализ
- Корелационен анализ
- Регресионен анализ
- ROC curve анализ
- Сравнителен анализ (оценка на хипотези)
- Графичен и табличен метод на изобразяване на получените резултати.

При всички проведени анализи се приема допустимо ниво на значимост  $p < 0.05$  при доверителен интервал 95%.

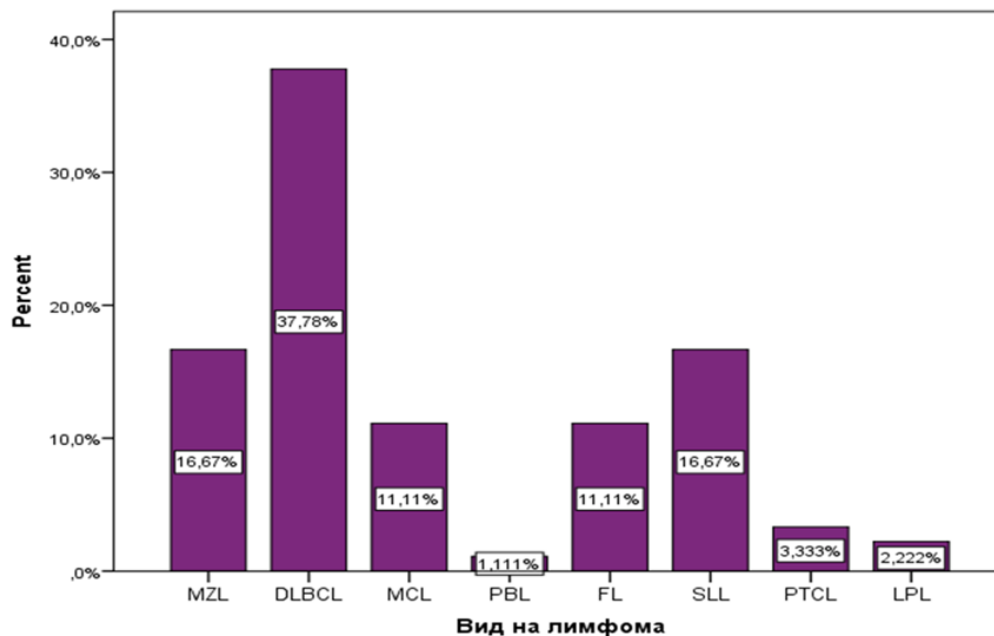
## IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

### 1. Демографска и клинична характеристика на пациентите

Средната възраст на пациентите с агресивни НХЛ е 60.4 години (28-88 г.), а при индолентните - 61.4 години (39-80 г.). Не се наблюдава сигнификантна разлика във възрастовите групи между изследваните пациенти и здравите контроли.

Разпределението по пол е: мъже – 51.1 % (n = 46) и жени – 48.9 % (n = 44). Установи се съществуваща разлика между пола на пациентите и типа на НХЛ {OR=1.87 (0.810-4.317); p<0.05}. В групата с агресивни НХЛ доминира броят на мъжете (58.7 %), а в групата с индолентни НХЛ този на жените (56.8 %). Не се намери съществена разлика между вида на лимфома и средната възраст на пациентите.

Около 37,8% от общо изследваните пациенти с Нехочкинови лимфоми (n = 90) са с диагноза Дифузен В-едроклетъчен Нехочкинов лимфом (DLBCL), последвани от Маргинално-зонови лимфоми (MZL) - 16,7%, Дифузен В-дробноклетъчен лимфом (SLL) - 16,67%, Мантелноклетъчен (MCL) и Фоликуларен лимфом (FL) с по 11,11%, Периферен Т-клетъчен лимфом (PTCL) - 3,33%, около 2,22% са с Лимфоплазмоцитоиден лимфом (LPL) и 1,11% - с Плазмобластен лимфом (PBL) (фигура 2).



Фигура 2. Разпределение според вида на лимфома

Наличието на “В симптоми” (фебрилитет, нощни изпотявания, редуция на телесно тегло с повече от 10 % през последните 6 месеца, упорит сърбеж по кожата и прогресираща умора) установихме в 52.2% от пациентите с агресивните лимфоми и при 43.2% в групата болни с индолентни НХЛ {OR=1.44 (0.625-3.295); p<0.05}.

Установи се умерена зависимост между IPI и типа на лимфома (r=-0.352; p=0.001). При 43,5% от пациентите с агресивни лимфоми се отчете висок прогностичен риск спрямо IPI, за разлика от тези с индолентни НХЛ, които в преобладаващата си част са с нисък риск (54.5 %) (p=0.003).

По-голямата част от изследваната популация са в IV клиничен стадий на заболяването, израз на дисеминация и очакване за трудно постижима ерадикация на процеса. При направения сравнителен анализ не се намери съществена разлика между стадия на заболяването и степента на малигненост на лимфома, съответно при индолентните и агресивни лимфоми.

Всички пациенти, включени в изследването бяха с нормални показатели на бъбречната и чернодробна функции, както и с нормален коагулационен статус. Не се установи сигнификантна разлика в средните стойности на изследваните лабораторни показатели: хемоглобин, левкоцити, тромбоцити, абсолютен лимфоцитен брой, абсолютен неутрофилен брой, ЛДХ и бета 2-микроглобулин при агресивните и индолентни лимфоми.

Ki-67 антигенът е най-често приложимият допълнителен биомаркер за преценка на клетъчната пролиферация и биологичен рисков фактор. Наблюдавахме значително по-висока стойност при пациентите с агресивни лимфоми, в сравнение с индолентните (съответно 0.72 към 0.39) ( $p < 0.001$ ).

Броят и размерите на екстранодалните огнища са един от най-често използваните прогностични фактори в рутинната клинична практика. При агресивните лимфоми се регистрира по-голяма честотата на екстранодално засягане (47.8%) в сравнение с индолентните (15.9%). Доказа се, че пациентите с агресивни НХЛ имат 4.8 пъти по-висок риск от екстранодално ангажиране ( $r=0.341; p=0.001$ ) {OR=4.85(1.794-13.087;  $p=0.001$  }.

Инфекциозни усложнения се регистрираха по-често при агресивните лимфоми в сравнение с индолентните (съответно 26.1 % към 11.4 %). Установи се, че агресивните лимфоми носят 2.7 пъти по-висок риск от развитие на инфекция в хода на заболяването {OR=2.75 (0.880-8.609);  $p < 0.05$ }. От 90-те пациента при 17 се установиха инфекциозни усложнения, при 12 от които се доказва COVID -19.

Всички демографски и клинично-лабораторни характеристики на пациентите са представени в Таблица 1.

**Таблица 1. Демографска и клинично-лабораторна характеристики на пациентите с НХЛ**

Показател		Агресивни НХЛ	Индолентни НХЛ	P value
Пол	Мъже	27/58.7 %	19/ 43.2 %	0.014
	Жени	19/41.3 %	25/ 56.8 %	
Възраст (години)	mean±SD (range)	60.4±13.3 (28-88)	61.4±10.3 (39-80)	0.693
	< 65 г.	26/56.5 %	28/63.6%	0.318
	> 65 г.	20/43.5 %	16/36.4%	
В симптоми	Да	24/52.2 %	19/ 43.2 %	0.026
	Не	22/47.8 %	25/ 56.8 %	
Hb (g/L)	mean±SD (range)	115.00±21.78 (62.00-155.00)	119.07±24.78 (43.00-161.00)	0.410
Leu (x10 <sup>9</sup> /L)	mean±SD (range)	9.22±11.75 (2.01-82.81)	12.20±13.77 (2.30-77.61)	0.271
ANC (x10 <sup>9</sup> /L)	mean±SD (range)	4.54±2.93 (0.80-15.57)	4.19±3.67 (0.38-22.15)	0.629
ALC (x10 <sup>9</sup> /L)	mean±SD (range)	2.67±4.31 (0.38-27.17)	4.38±5.88 (0-27.63)	0.120
Plt (x10 <sup>9</sup> /L)	mean±SD (range)	260.85±187.76 (30-956)	217.79±176.56 (72-1117)	0.266
ЛДХ (U/L)	mean±SD (range)	857.11±1280.64	543.27±482.21	0.131

		(289.0-5935.0)	(143.0-3175.0)	
Бета-2 микроглобулин (mg/l)	mean±SD (range)	4.15±2.11 (1.60-8.50)	4.21±2.06 (1.70-8.20)	0.894
Стадий на заболяването	I	3/6.5 %	7/15.9 %	0.081
	II	5/10.9 %	4/9.1 %	
	III	13/28.3 %	4/9.1 %	
	IV	25/54.3 %	29/65.9 %	
IPI - риск	Нисък риск	12/26.1 %	24/54.5 %	0.003
	Интермедиерен риск	14/30.4 %	14/31.8 %	
	Висок риск	20/43.5 %	6/13.6 %	
Ki 67 %	mean±SD (range)	0.72±0.25 (0.15-1.00)	0.39±0.22 (0.05-0.90)	< 0.001
PNC%	mean±SD (range)	4.81±3.65 (0.91-18.07)	4.82±6.34 (0.88-39.47)	0.994
IL -10 (pg/ml)	mean±SD (range)	47.34±143.0 (2.04-687.14)	14.03±32.91(0.46-152.82)	< 0.001
VEGF %	mean±SD (range)	106.33±45.14 (30.0-200.0)	121.83±50.2 (40.0-260.0)	0.214
Екстранодално ангажиране	Да	22/47.8 %	7/15.9%	0.001
	Не	24/52.2 %	37/84.1 %	
Органомегалия	Да	19/41.3 %	17/ 38.6 %	0.483
	Не	27/58.7 %	27/ 61.4 %	
	Хепато- спленомегалия	7/36.8 %	8/47.1 %	0.757
	Хепатомегалия	3/15.8 %	3/17.6 %	
	Спленомегалия	9/47.4 %	6/ 35.3 %	
Инфекционни усложнения	Да	12/26.1 %	5/11.4 %	0.044
	Не	34/73.9 %	39/88.6 %	

На таблица 2 е представена характеристиката на пациентите според R-IPI, прилагания терапевтичен режим, едногодишната преживяемост, терапевтичния отговор и появата на тромботични усложнения преди и след провеждане на противотуморно лечение.

Най-често използваният терапевтичен режим и в двете пациентски групи беше R-СНОР, съответно в 57.8% при агресивните НХЛ и 46.5% при индолентни НХЛ (p=0.001).

Въпреки, че не се установи статистически значима разлика между R-IPI и типа на малигнения лимфом, трябва да се вземе под внимание факта, че половината от пациентите с агресивни НХЛ още при диагностицирането си бяха категоризирани с лоша прогноза (52.2 %), а повече от половината пациентите с индолентни НХЛ стартираха с добра и много добра прогноза (съответно 52.3% и 11.4%).

Установи се слаба зависимост между едногодишната преживяемост и типа на НХЛ, като пациентите с агресивни НХЛ имат значително по-кратка едногодишна преживяемост в сравнение с тези с индолентни НХЛ (r= 0.226; p=0.032). Регистрира се съществена разлика и слаба зависимост между изхода от заболяването и типа на НХЛ (r= 0.231; p=0.028). Доказа се, че агресивните лимфоми носят 2.89 пъти по-висок риск от настъпване на летален изход {OR=2.89 (1.0.99-7.618); p<0.05}, като в тази група летален изход се регистрира в 39.1% (n=18), а при индолентните лимфоми – в 18.2% (n=8). Приблизително 1/3 от болните с летален изход бяха с регистрирана прогресия на



заболяването, двама с ранен рецидив, а при 1/3 причина за смъртта бяха регистрирани инфекциозни усложнения и тромботични инциденти.

**Таблица 2. Характеристика на пациентите според определената рискова група, прилаганото лечение, терапевтичния отговор и тромботичните усложнения**

Показател		Агресивни НХЛ	Индолентни НХЛ	P value
R-PI	Лоша прогноза	24/52.2%	16/36.4%	0.0296
	Добра прогноза	19/41.3%	23/52.3%	
	Много добра прогноза	3/6.5%	5/11.4%	
Терапевтичен режим	R-B	-	13/30.2%	0.001
	R-ACVBP	2/4.4%	-	
	R-CHOP	30/66.7%	21/48.8%	
	R-CNOP	6/13.3%	1/2.3%	
	DA-EPOCH	1/ 2.2%	-	
	CHOEP	3/6.7%	-	
	R-COP	-	1/ 2.3%	
	R-HCVAD	3/6.7%	-	
Watch and wait	-	7/16.3%		
Терапевтичен отговор	CR	22/48.9%	22/61.1%	0.019
	PR	7/15.6%	10/27.8%	
	SD	2/4.4%	-	
	PD	14/31.1%	4/11.1%	
Едногодишна преживяемост в месеци	mean±SD (range)	8.93±4.41 (1-12)	10.65±2.94 (1-12)	0.032
Тромботични инциденти преди лечение	ДА	11/23.6 %	6/13.6%	0.045
	НЕ	35/76.1%	38/86.4%	
Тромботични инциденти след лечение	ДА	4/8.7 %	1/ 2.3 %	0.049
	НЕ	42/91.3 %	43/97.7 %	
Изход от заболяване	Починал/а	18/39.1%	8/18.2%	0.024
	Жив/а	28/60.9%	36/81.8%	

Спрямо постигнатия терапевтичен отговор, пациентите с агресивни лимфоми бяха разпределени по следния начин: пълен отговор (CR) – 48.9% (n = 6), частичен отговор (PR) – 15.6% (n = 7), стабилна болест (SD) – 4,4% (n = 2), прогресия (PD) – 31.1% (n = 14).

Пациентите с индолентни лимфоми съгласно постигнатия терапевтичен отговор бяха разпределени по следния начин: пълен отговор (CR) – 61,1% (n = 22), частичен отговор (PR) – 27,8% (n = 10), прогресия ( PD ) – 11,1% (n = 4).

Тромботични инциденти преди начало на лечението се регистрираха значимо често при агресивните НХЛ (съответно 23.6 % към 13.6 %), (p=0.045). Доказа се, че пациентите с агресивни НХЛ имат два пъти по-висок риск от настъпването на тромбоза преди терапия {OR=1.99 (0.666-5.953); p<0.05}.

След проведено лечение се установи лек превес на тромботичните усложнения при пациентите с агресивни НХЛ (p=0.049), като рискът от настъпването им в тази група

лимфоми се увеличава още два пъти в сравнение с този преди лечение и достига до 4.09 пъти {OR=4.09 (0.439-38.168); p<0.05}.

## **2. Работа по задача №1: Сравнителен анализ между нивата на PNC, изследвани in vivo и in vitro след стимулация (ADP и PMA) при пациенти с индолентни и агресивни НХЛ.**

На таблица 3 е представен сравнителен анализ на изходните нива на PNC в нестимулирана и стимулирана кръв на пациенти с индолентни и агресивни НХЛ. Установихме съществена разлика между нивата на PNC преди и след стимулация с агонисти (ADP и PMA) при двете изследвани групи лимфоми, като при болните с агресивни НХЛ изходните нива на PNC (PNC EDTA и PNC ACD) се увеличиха приблизително 11.8 пъти след стимулацията на венозна кръв с PMA, в сравнение със стойностите на PNC след стимулация с тромбоцитен агонист ADP.

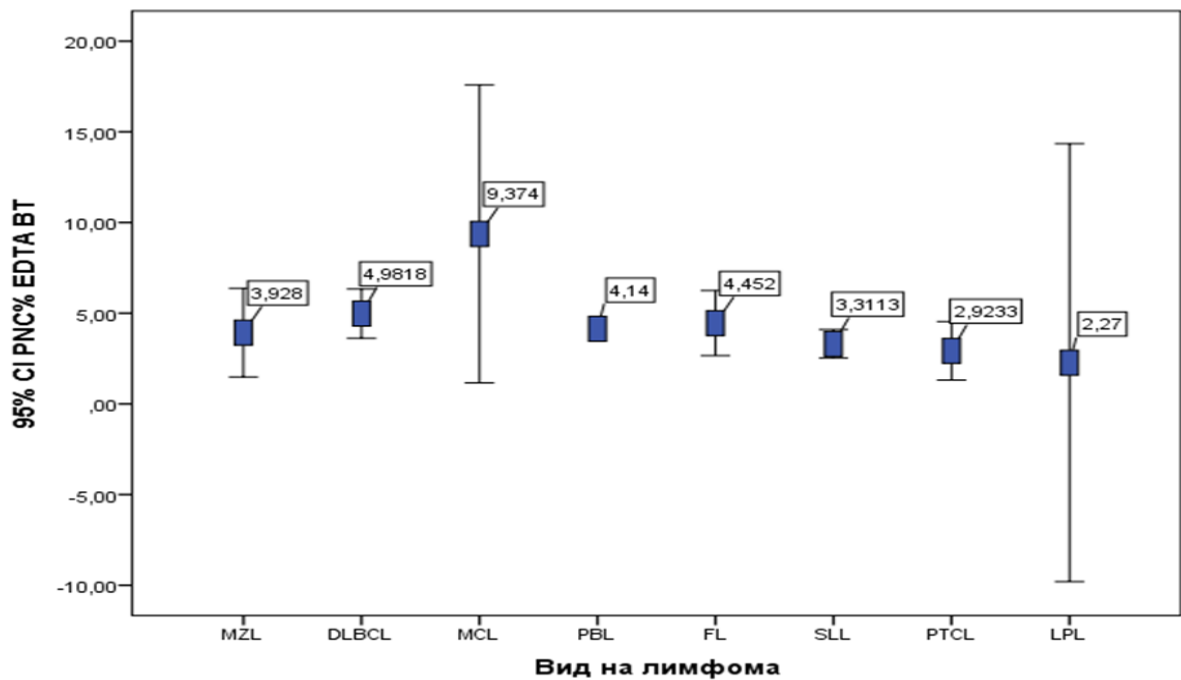
В индолентни НХЛ наблюдавахме същата тенденция, изходните нива на PNC (PNC EDTA и PNC ACD) нарастнаха приблизително 10.9 пъти след стимулацията на венозна кръв с PMA, в сравнение с тези, измерени след стимулация с ADP. Установихме също и съществена разлика между PNC% EDTA и PNC% ACD, както при агресивните НХЛ (p=0.004), така и при индолентните НХЛ (p=0.005).

**Таблица 3. Сравнителен анализ на нивата на PNC при пациенти с индолентни и агресивни НХЛ преди и след стимулация с PMA и ADP**

<b>PNC %</b>	<b>Агресивни НХЛ (n=46)</b>	<b>Индолентни НХЛ (n=44)</b>	<b>P value</b>
PNC% EDTA	4.81±3.65 (0.91-18.07)	4.82±6.34 (0.88-39.47)	0.994
PNC% ACD	11.83±15.07 (0.97-68.53)	10.63±13.71 (0.86-63.64)	0.697
PNC% PMA	56.64±19.90 (8.29-92.28)	52.78±21.92 (4.80-92.62)	0.383
PNC% ADP	53.02±20.06 (5.81-86.25)	50.29±21.61 (7.60-87.47)	0.537
<b>P value EDTA/ PMA</b>	< 0.001	< 0.001	
<b>P value EDTA/ ADP</b>	< 0.001	< 0.001	
<b>P value ACD / PMA</b>	< 0.001	< 0.001	
<b>P value ACD / ADP</b>	< 0.001	< 0.001	

### **2.1 Връзка между PNC %EDTA и вида на лимфома**

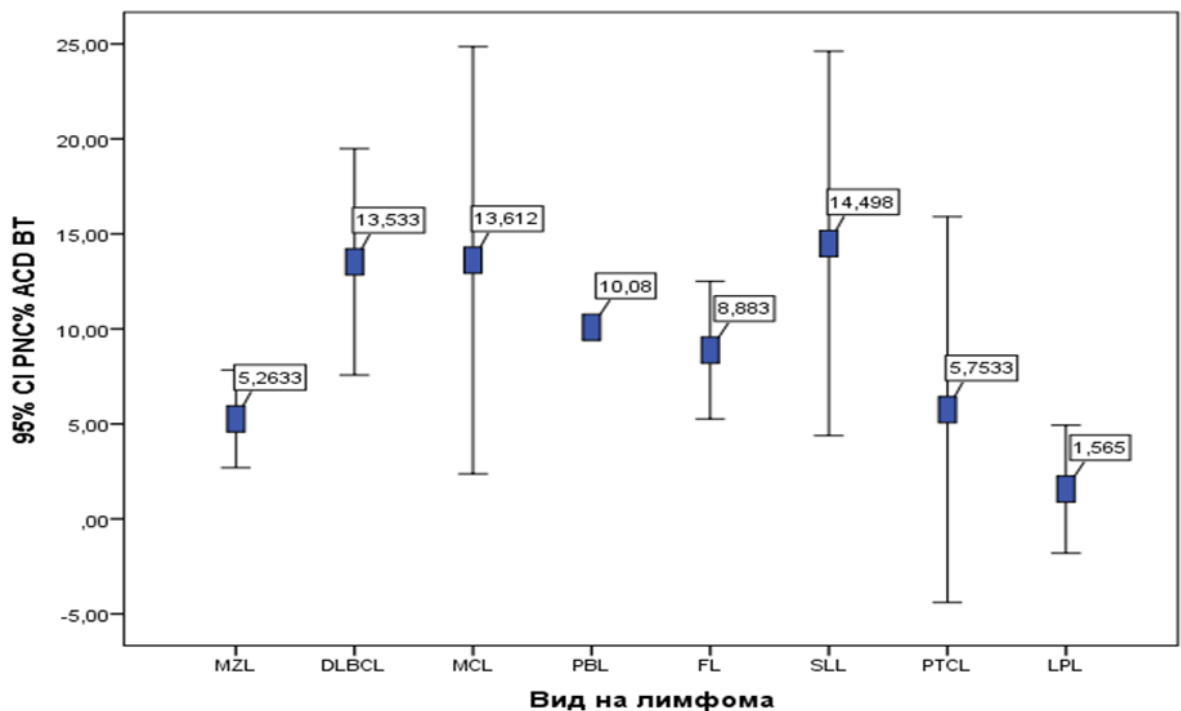
При някои лимфомни подвидове наблюдавахме по-високи нива на PNC (Фиг. 3 и Фиг. 4). Установихме, че пациентите с MCL имат най-високи стойности на PNC% EDTA, съответно 9,374%, а с най-ниски нива са тези с LPL - 2,27%.



**Фигура 3. Сравнителен анализ на стойностите на PNC% EDTA според вида на НХЛ**

## 2.2 Връзка между PNC%ACD и вида на лимфома

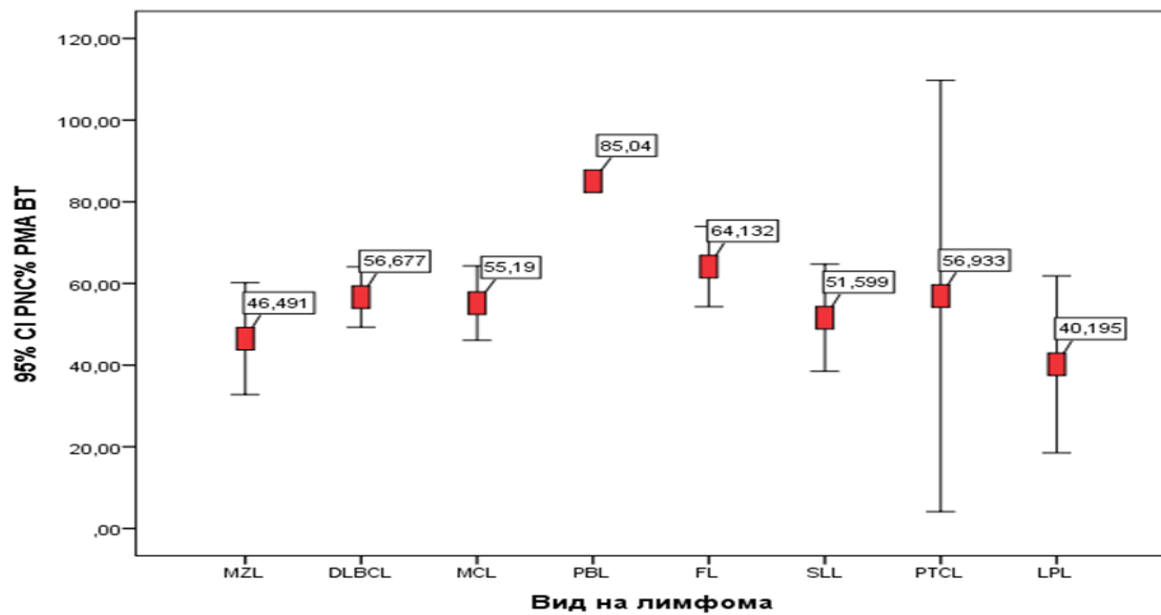
При сравнителен анализ на нивата на PNC%ACD според подвидовете НХЛ най-високи стойности се регистрираха при пациентите с SLL (14,498%), а най-ниски отново при тези с LPL (1,565%) (Фигура 4).



**Фигура 4. Сравнителен анализ на стойностите на PNC%ACD според вида на НХЛ**

### 2.3 Връзка между PNC%PMA и вида на лимфома

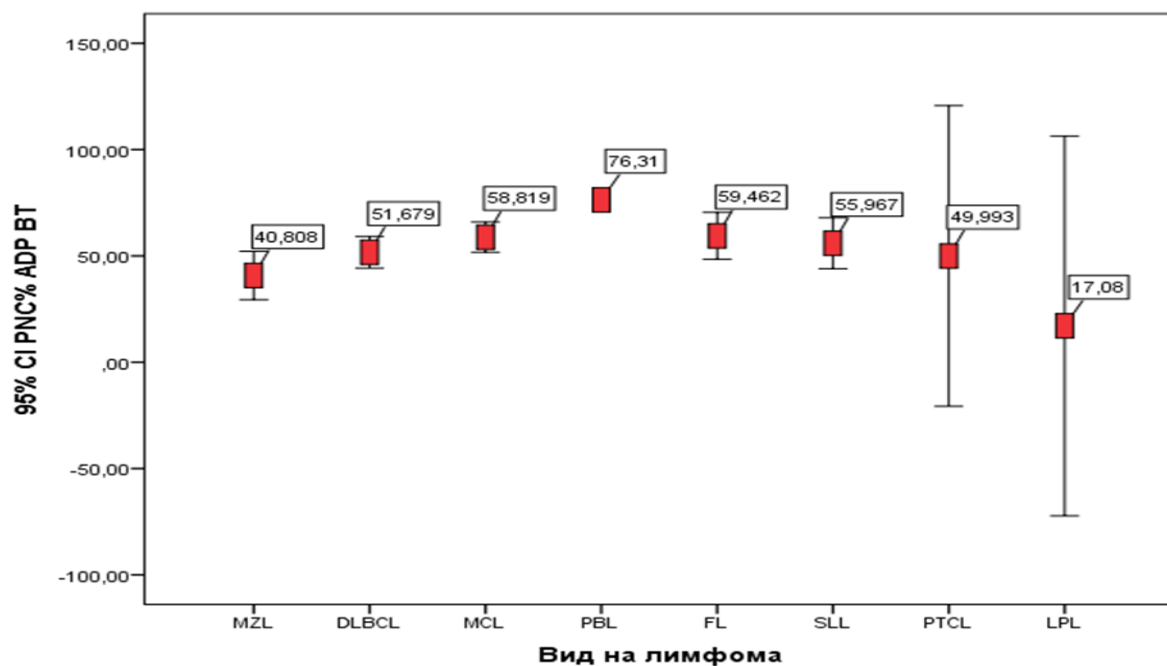
При анализ на нивата на PNC% PMA се регистрираха най-високи стойности при пациентите с PBL (85,04%) и най-ниски отново при LPL (40,195%) (Фигура 5).



Фигура 5. Сравнителен анализ на стойностите на PNC% PMA според вида на НХЛ

### 2.4 Връзка между PNC% ADP и вид на лимфома

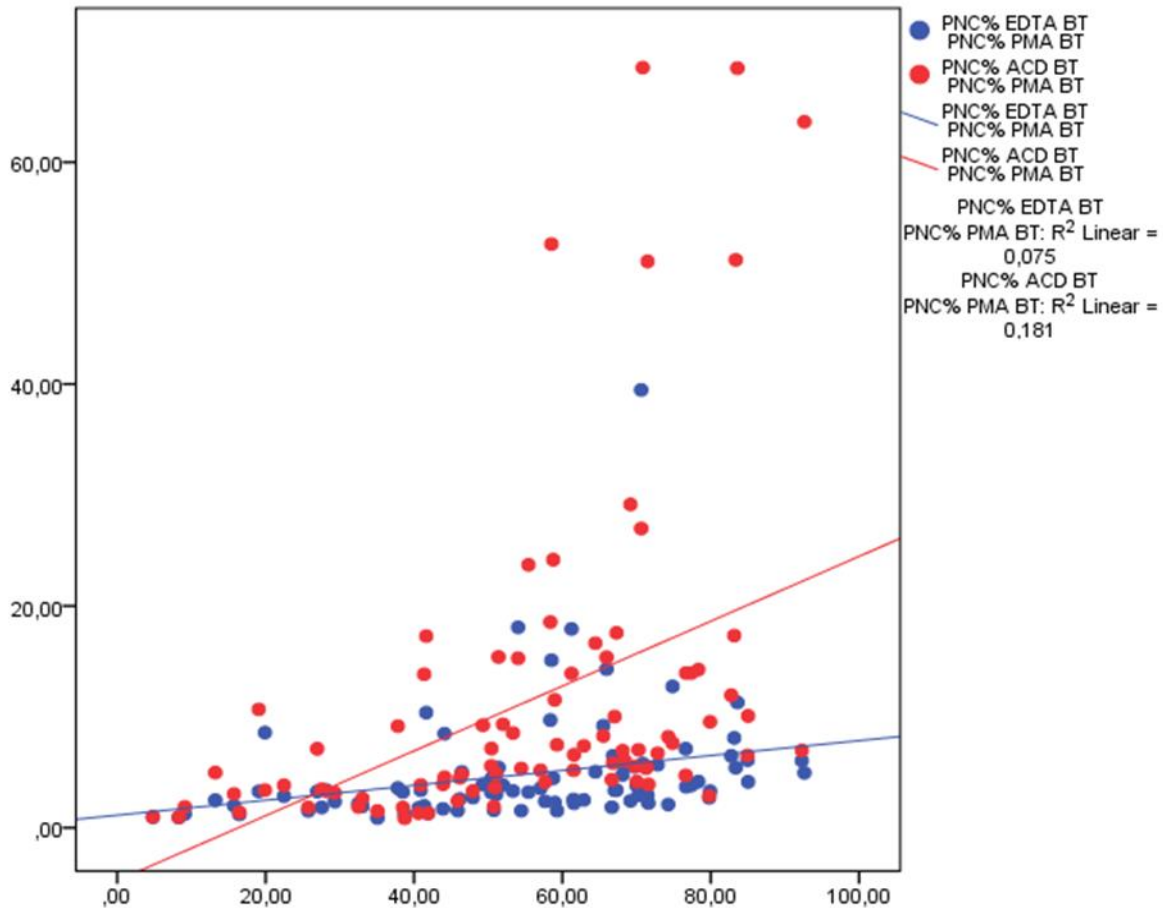
Установихме сигнификантна разлика между нивата на PNC%ADP и вида на НХЛ ( $p=0.038$ ), като наблюдавахме значително по-високи стойности при PBL (76.31%), спрямо LPL (17.08%) (Фигура 6).



Фигура 6. Сравнителен анализ на стойностите на PNC% ADP според вида на НХЛ

## 2.5 Връзка между PNC% (EDTA и ACD ) и PNC%PMA

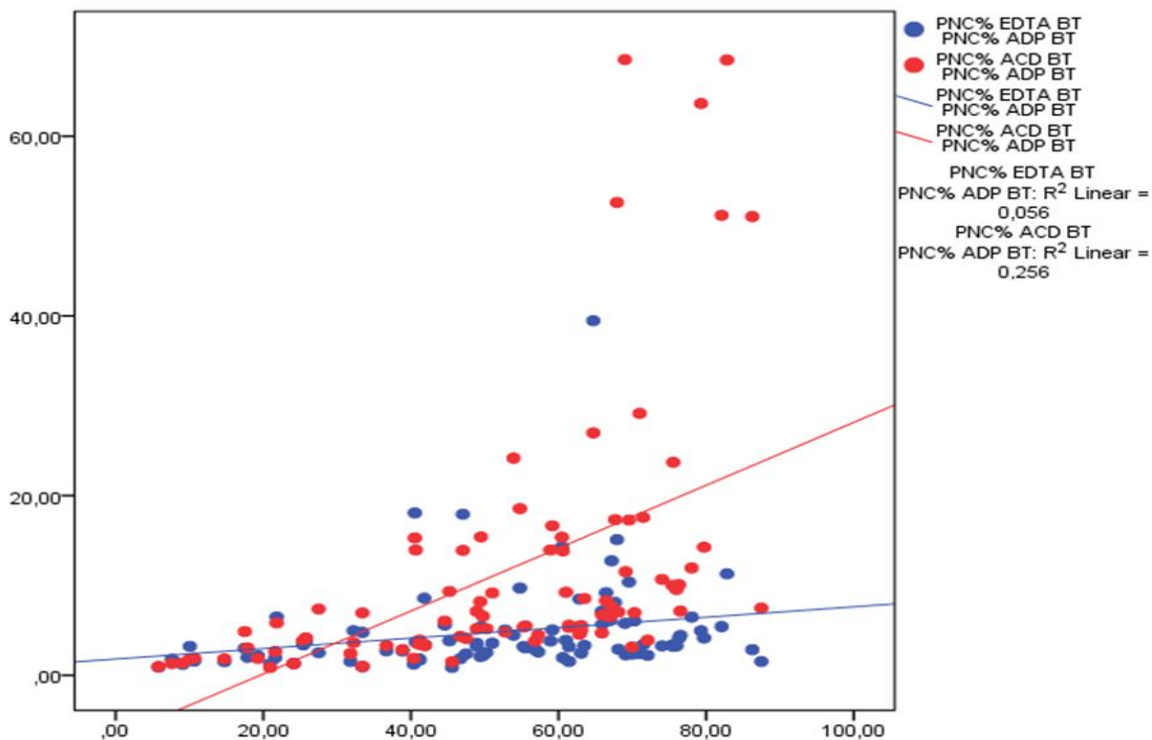
Доказа се, че съществува правопрпорционална зависимост между PNC%EDTA и PNC%PMA ( $r=0.275$ ,  $p=0.009$ ), както и между PNC%ACD и PNC%PMA ( $r=0.425$ ,  $p<0.001$ ). Регистрираната връзка между PNC% ACD и PNC% PMA е по-силна отколкото между PNC% EDTA и PNC% PMA ( $p<0.05$ ) (Фигура 7).



Фигура 7. Корелация между PNC% PMA с PNC% EDTA и PNC% ACD

## 2.6 Връзка между PNC% (EDTA и ACD) и PNC%ADP

Доказа се силна правопрпорционална зависимост между PNC% EDTA и PNC% ADP ( $r=0.236$ ,  $p=0.025$ ), както и между PNC% ACD и PNC% ADP ( $r=0.506$ ,  $p<0.001$ ). Корелацията между PNC% ACD и PNC% ADP е по-силна отколкото между PNC% EDTA и PNC% ADP (Фиг. 8) ( $p<0.05$ ).



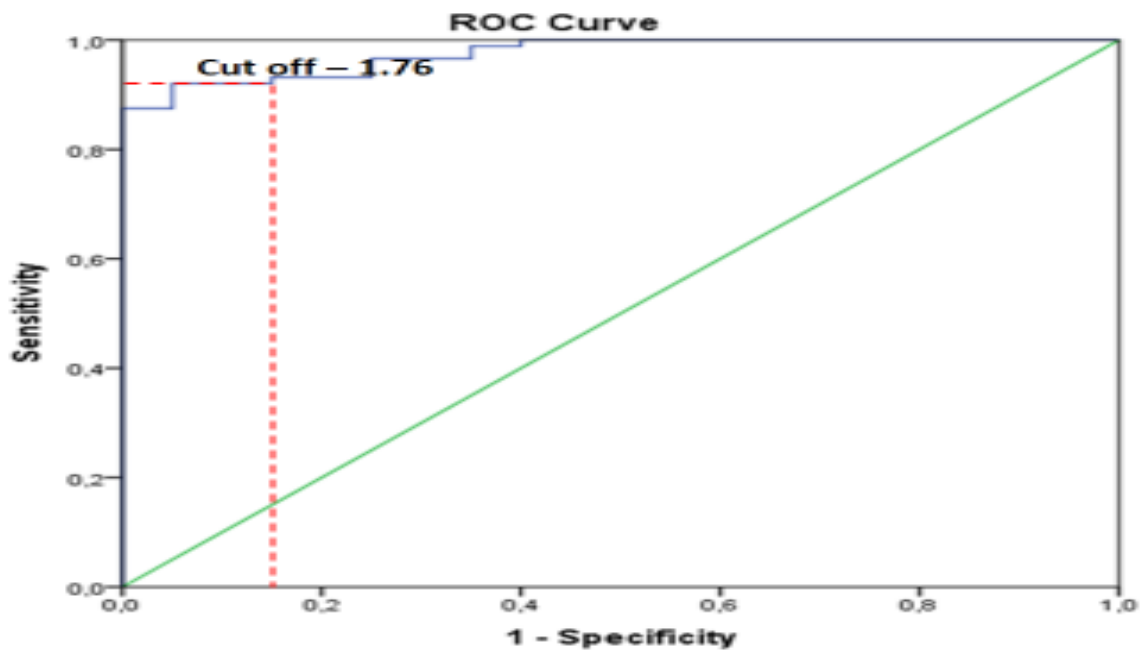
**Фигура 8. Корелация между PNC% ADP с PNC% EDTA и PNC% ACD**

**Обобщение на най-важните резултати по изпълнение на задача №1:**

1. Установи се съществена разлика между нивата на PNC% преди и след стимулация с агонисти (ADP и PMA) при двете изследвани групи лимфоми.
2. Пациентите с агресивни НХЛ имат значимо по-високи нива на PNC% *in vivo* и *in vitro* след стимулация с ADP и PMA в сравнение с индолентните НХЛ.
3. Най-високи стойности на PNC% EDTA се регистрираха при болни с MCL и най-ниски нива на PNC% EDTA при болни с LPL.
4. Най-високи стойности на PNC% ACD се установиха при болни с SLL и най-ниски нива при тези с LPL.
5. Най-високи нива на PNC% PMA и PNC% ADP се регистрираха при болни с PBL и отново най-ниски нива при LPL.
6. Доказа се силна правопрпорционална зависимост между PNC% EDTA и PNC% ADP ( $r=0.236$ ,  $p=0.025$ ), както и между PNC% ACD и PNC% ADP ( $r=0.506$ ,  $p<0.001$ ).
7. Доказа се наличие на правопрпорционална зависимост между PNC% EDTA и PNC% PMA ( $r=0.275$ ,  $p=0.009$ ), както и между PNC% ACD и PNC% PMA ( $r=0.425$ ,  $p<0.001$ ).

**3. Работа по задача №2: Определяне на изходните нива на PNC% при новодиагностицирани пациенти с индолентни и агресивни НХЛ, както и след проведена противотуморна терапия – мониториране на динамиката на PNC**

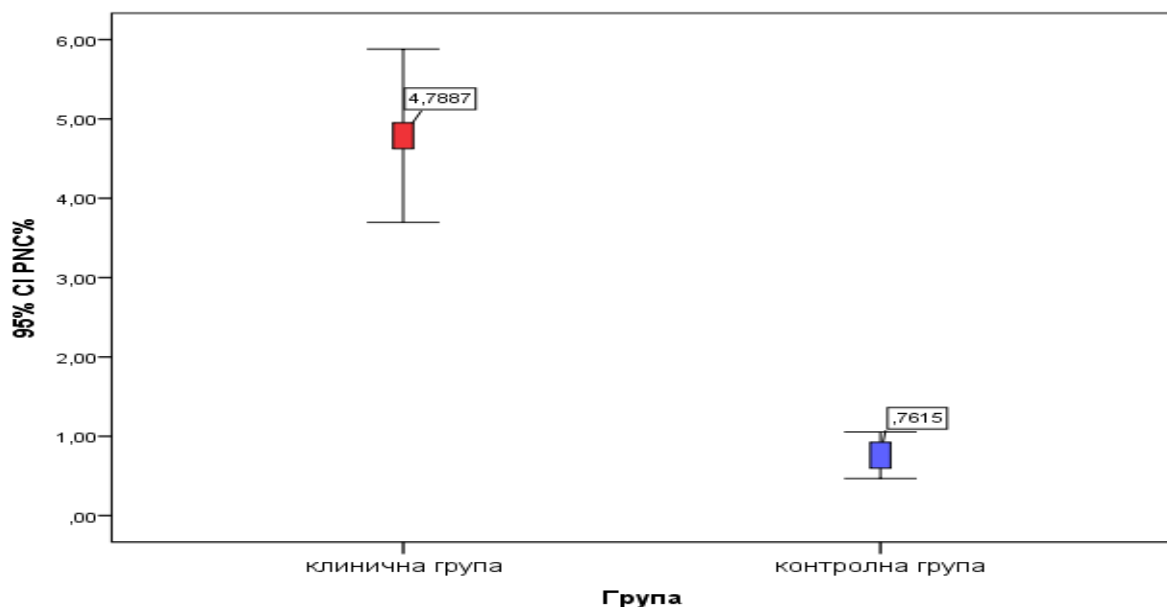
Поради липса на референтни стойности за PNC%, чрез ROC curve анализ беше определена праговата стойност, която разграничава нивата на PNC при анализираниите пациенти от здравите контроли (Фигура 9).



**Фигура 9. Праговата стойност на PNC% EDTA спрямо здрави контроли**

От осъществения анализ се установи, че PNC% EDTA има най-добри показатели за чувствителност и специфичност при разграничаването на пациентите с НХЛ от здрави контроли, като беше определена прагова стойност 1.76 (AUC=0.975 (0.951-0.999) ( $p < 0.001$ ) с чувствителност (92.0 %) и специфичност (99.5 %).

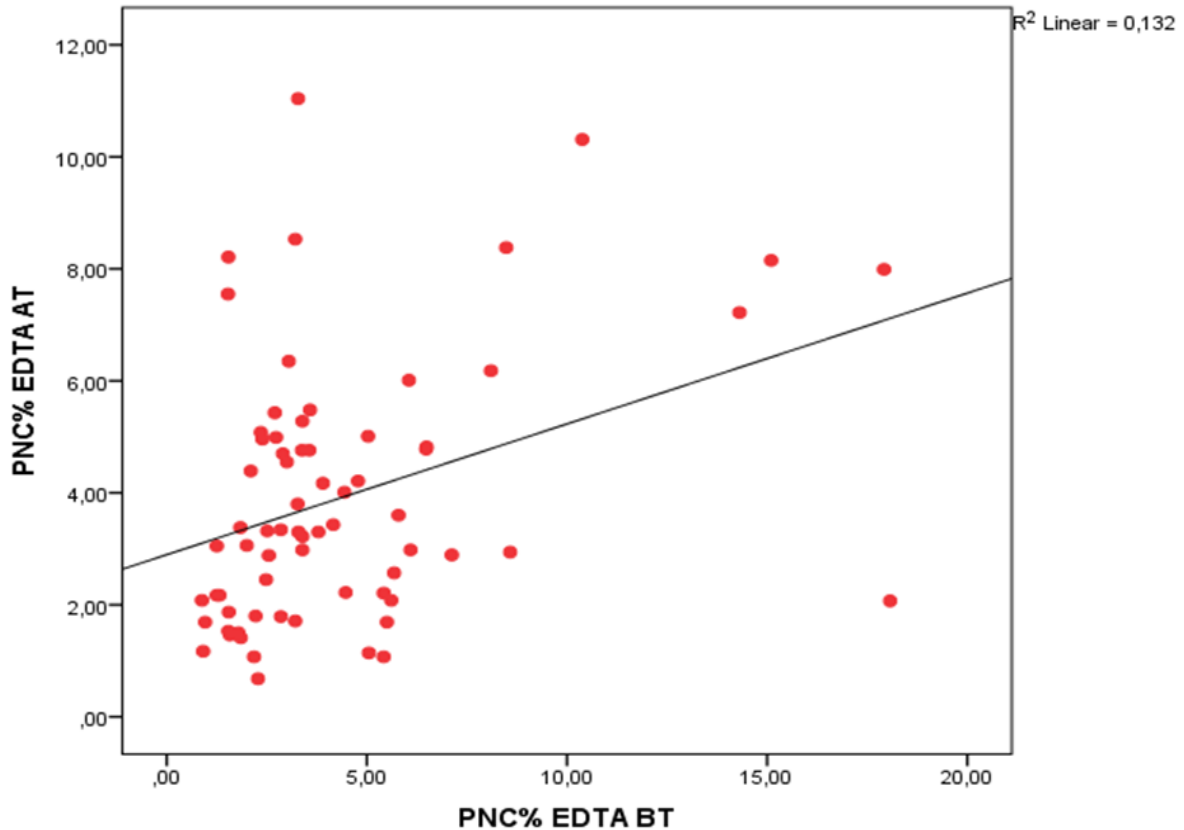
Установи се съществена разлика между нивата на PNC% в клиничната и контролната група ( $p = 0.001$ ) (Фигура 10).



**Фигура 10. Сравнителен анализ на средни стойности на PNC% при пациенти с НХЛ и здрави контроли**

### 3.1 Връзка между нивата на PNC%EDTA преди и след проведена терапия

При анализ на стойностите на PNC%EDTA преди и след имуно/химиотерапия се установи умерена правопрпорционална зависимост, което показва, че провежданото лечение води до повишаване на нивата на PNC%EDTA ( $r=0.364$ ;  $p=0.002$ ) (Фиг. 11).

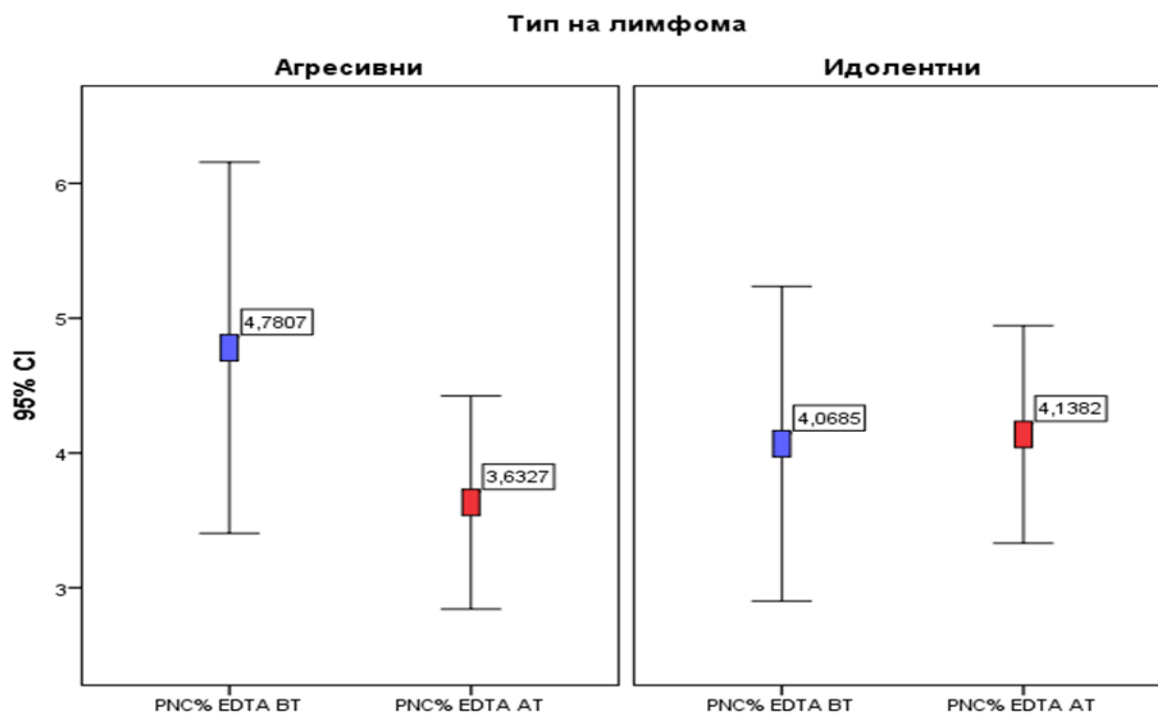


Фигура 11. Корелация на PNC%EDTA преди и след лечение

### 3.2 Сравнителен анализ на нивата на PNC%EDTA преди и след проведено лечение при индолентни и агресивни лимфоми

При сравнителен анализ на нивата на PNC%EDTA преди и след провеждане на имуно/химиотерапия в двете групи НХЛ установихме съществена разлика ( $p<0.001$ ). При агресивните лимфоми проведената имуно/химиотерапия корелира с понижаване на нивата на PNC%EDTA, докато при индолентните се установява повишаването им (Фигура 12).

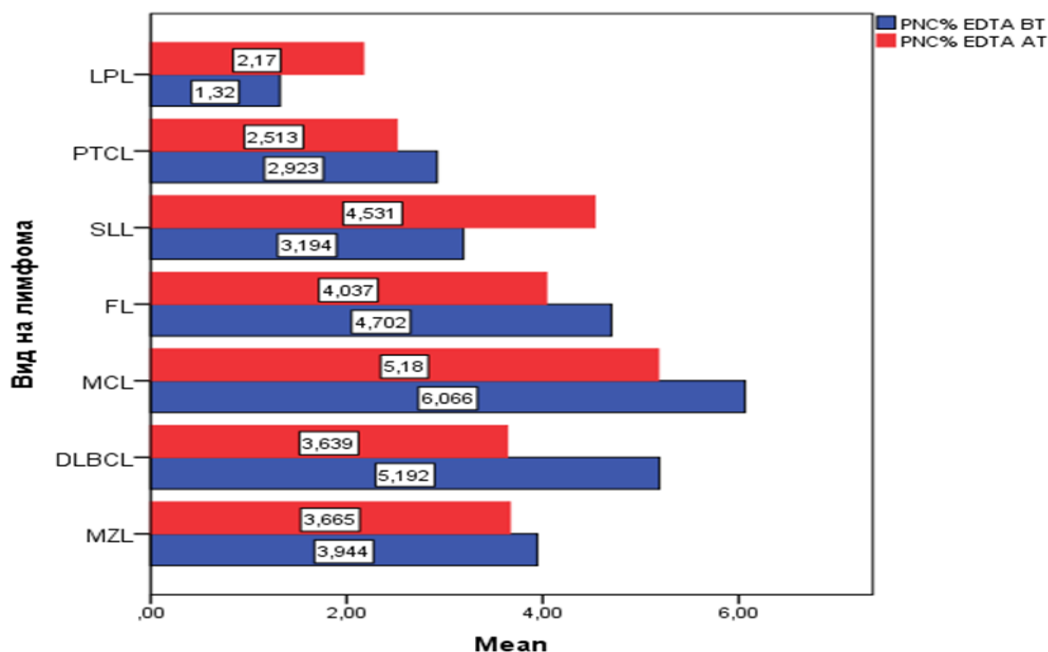




**Фигура 12. Сравнителен анализ на нивата на PNC% EDTA преди и след имуно/химиотерапия при агресивни и индолентни лимфоми**

### 3.3 Връзка между PNC%EDTA и вида на лимфома

Установиха се няколко съществени разлики при анализа на нивата на PNC%EDTA преди и след имуно/химиотерапия според нозологичния вариант на НХЛ (Фигура 13).

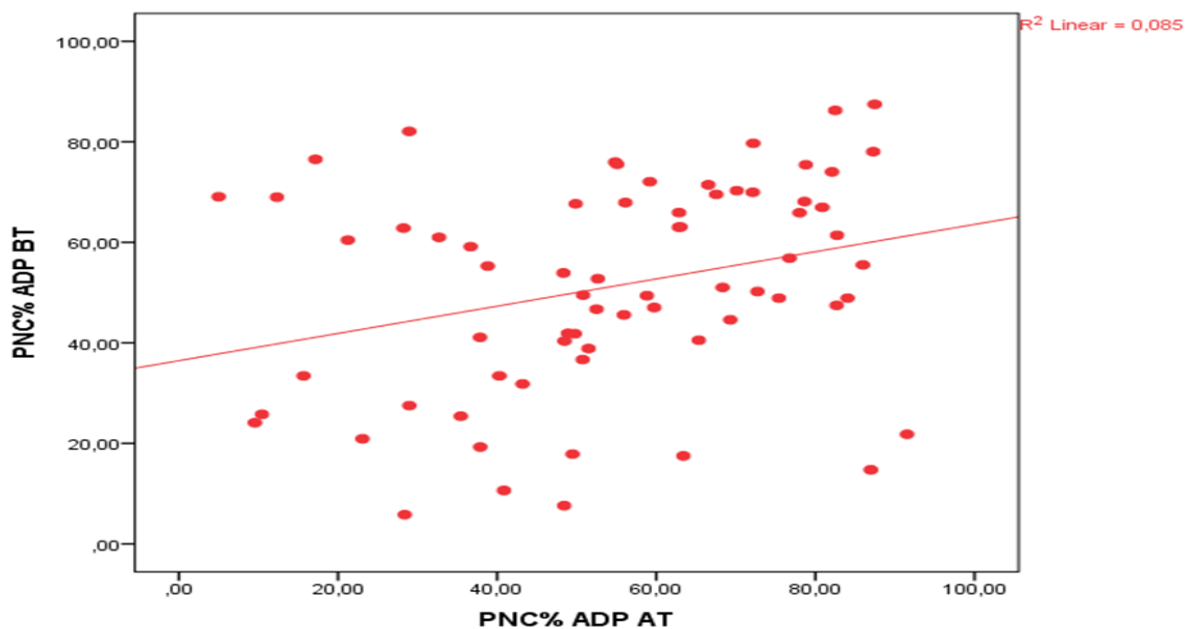


**Фигура 13. Сравнителен анализ на нивата на PNC%EDTA преди и след лечение според нозологичния вариант на НХЛ**

1. При пациентите с SLL и LPL регистрирахме значимо посттерапевтично повишаване на PNC%EDTA ( $p < 0.01$ ).
2. При пациентите с MCL и DLBCL се регистрираха сигнификантно по-ниски нива на PNC%EDTA след завършване на лечението ( $p < 0.01$ ).
3. При болни с FL, MZL и PTCL наблюдавахме тенденция към понижаване на PNC%EDTA след проведената терапия, но разликата беше статистически незначителна.

### 3.4 Връзка между нивата на PNC%ADP преди и след лечение

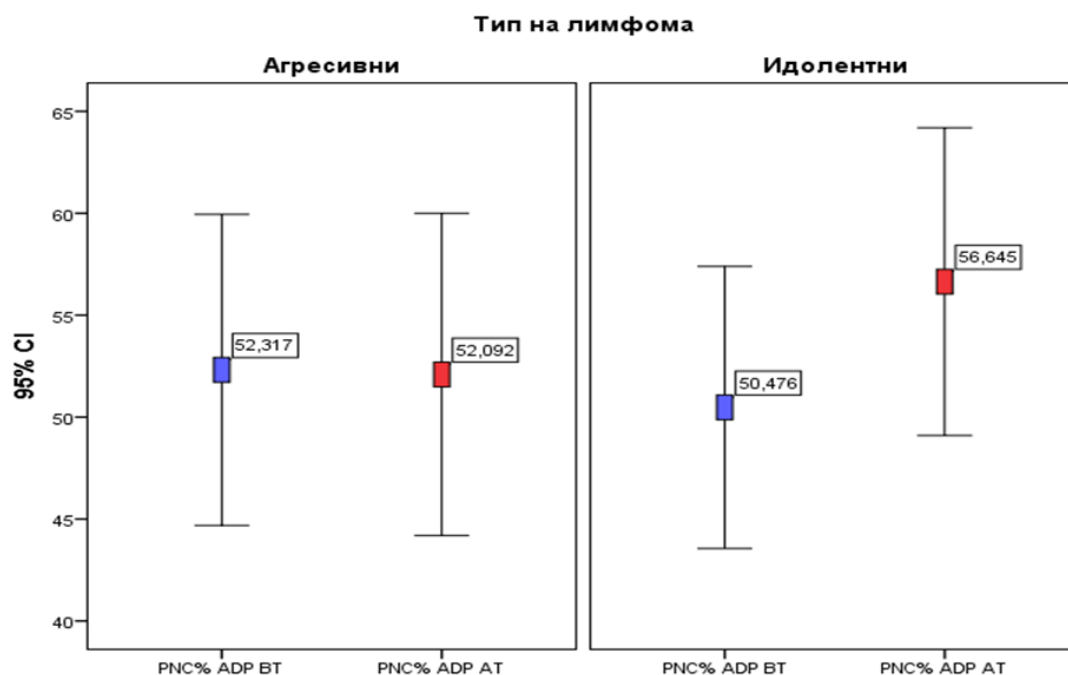
Установихме правопрпорционална, слаба към умерена зависимост между нивата на PNC% преди и след проведено имуно/химиотерапевтично лечение след извършена стимулация с тромбоцитния агонист ADP ( $r = 0.291$ ;  $p = 0.015$ ) (Фиг. 14). Този резултат показва, че и след проведена стимулация имуно/химиотерапията води до повишаване на нивата на PNC%.



**Фигура 14. Корелация на PNC% ADP преди и след имуно/химиотерапевтично лечение**

### 3.5 Сравнителен анализ на нивата на PNC%ADP преди и след лечение при индолентни и агресивни лимфоми

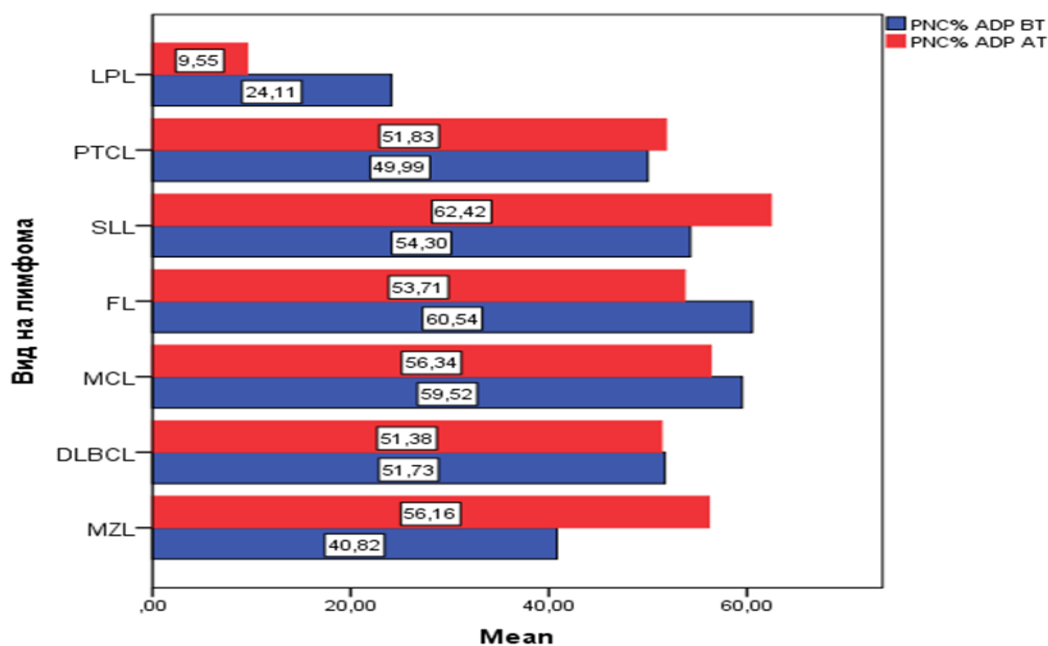
На фиг. 15 е представен сравнителният анализ на PNC% след стимулация с ADP. При агресивните лимфоми не се установи съществена разлика преди и след проведеното лечение ( $p > 0.05$ ), докато при индолентните лимфоми се наблюдаваха значително по-високи нива на PNC% след завършване на терапията ( $p < 0.05$ ).



**Фигура 15. Сравнителен анализ на нивата на PNC%ADP при агресивни и индолентни лимфоми преди и след имуно/химиотерапия**

### 3.6 Сравнителен анализ на нивата на PNC%ADP преди и след лечение според вида на лимфома

При анализ на измененията в нивата на PNC%ADP преди и след лечение според вида на лимфома се установиха две съществени разлики (Фиг. 16).



**Фигура 16. Сравнителен анализ на нивата на PNC%ADP според вида на лимфома преди и след имуно/химиотерапия**

1. При пациентите с MZL и DLBCL наблюдавахме значително по-високи нива на PNC%ADP след имуно/химиотерапия ( $p < 0.01$ ).
2. При пациентите с FL и LPL се регистрираха значително по-ниски нива на PNC%ADP след проведеното лечение ( $p < 0.01$ ).

При останалите видове лимфоми се наблюдаваха вариации в нивата на PNC% преди и след проведената терапия, но не се отчете статистическа значимост.

При проследяване на пациентите се установи, че след проведената стимулация измененията в нивата на PNC% преди и след имуно/химиотерапия показват следната тенденция: пациентите с SLL имат значително по-високи нива на PNC% (преди и след стимулация) след привършване на терапията. От друга страна при пациентите с LPL се наблюдава тенденция за повишаване на нивата на PNC% след привършване на лечението, но след стимулация с ADP се наблюдава обратна тенденция - към понижаването им.

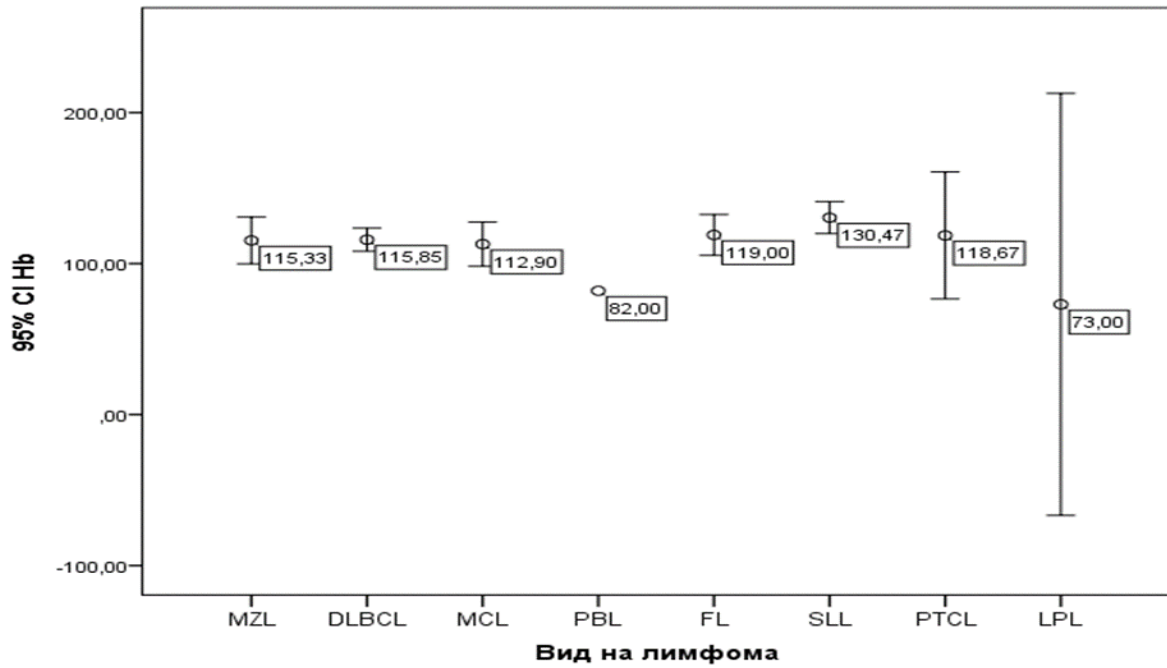
#### ***Обобщение на най-важните резултати по изпълнение на задача №2:***

1. *PNC% EDTA има най-добри показатели за чувствителност и специфичност при разграничаването на пациенти с НХЛ от здрави контроли.*
2. *Установи се съществена разлика между нивата на PNC% в клиничната и контролната група.*
3. *Регистрира се правопрпорционална зависимост между нивата на PNC%EDTA преди и след имуно/химиотерапевтично лечение*
4. *При агресивните лимфоми проведената имуно/химиотерапия корелира с понижаване на нивата на PNC%EDTA.*
5. *При индолентните лимфоми се установява посттерапевтично повишаване на нивата на PNC%EDTA.*
6. *При пациентите с SLL и LPL се установи значително посттерапевтично повишаване на PNC%EDTA ( $p < 0.01$ ).*
7. *При пациентите с MCL и DLBCL се регистрираха сигнификантно по-ниски нива на PNC%EDTA след привършване на лечението ( $p < 0.01$ ).*
8. *Доказа се правопрпорционална, слаба към умерена зависимост между нивата на PNC%ADP преди и след лечението, което показва, че и след стимулация имуно/химиотерапията води до повишаване на нивата на PNC%.*
9. *При индолентните лимфоми се наблюдаваха значително по-високи нива на PNC% след завършване на терапията.*

#### **4. Работа по задача №3: Изследване за евентуална корелационна зависимост между нивата на PNC и различни клинично-лабораторни характеристики на пациентите с агресивни и индолентни НХЛ**

##### **4.1 Връзка между средните стойности на хемоглобина и вида на лимфома**

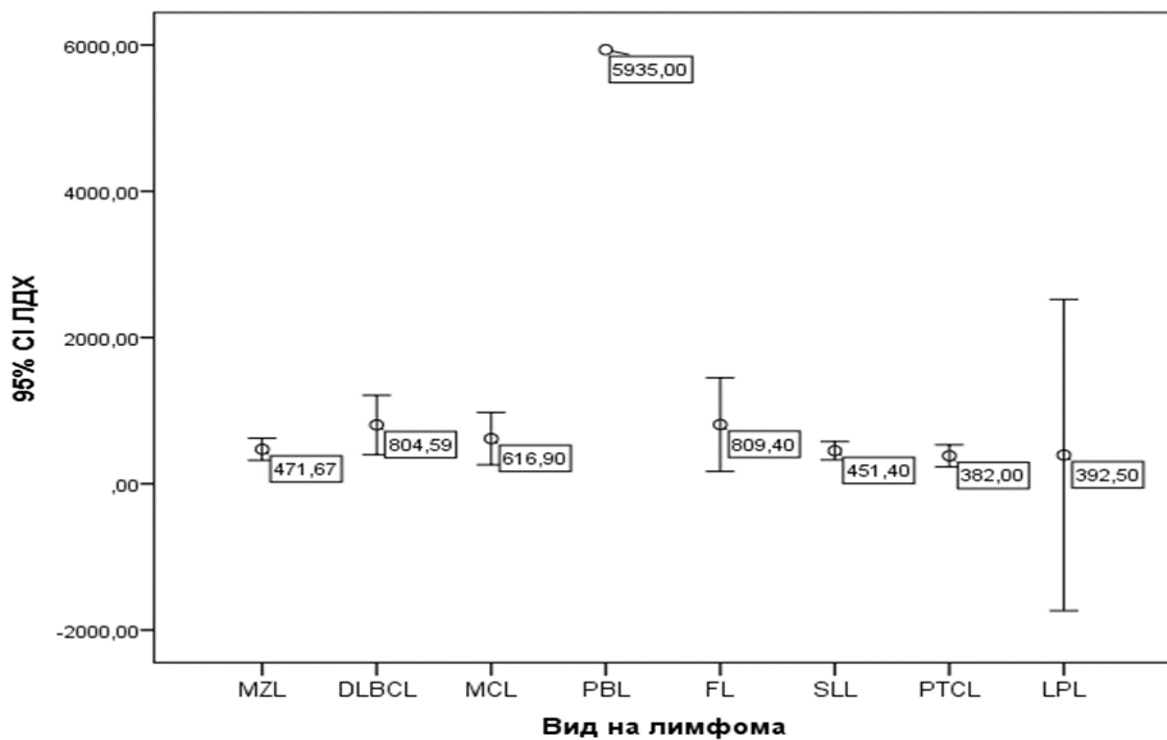
Установява се съществена разлика в нивата на хемоглобин (Hb) според вида на лимфома, като най-ниски стойности се наблюдаваха при пациентите с LPL (73.00) и PBL (82.00) ( $p = 0.029$ ) (Фигура 17).



**Фигура 17. Средни стойности на хемоглобин (g/L) според вида на НХЛ**

#### 4.2 Връзка между средните стойности на ЛДХ и вида на лимфома

Съществена разлика се установи по отношение на ЛДХ и вида на лимфома ( $p < 0.001$ ), като най-високи стойности на прогностичния показател регистрирахме при болните с PBL (5935.0), следван от FL (809.4) и DLBCL (804.59) (Фиг. 18)



**Фигура 18. Средни стойности на ЛДХ (U/L) според вида на лимфома**

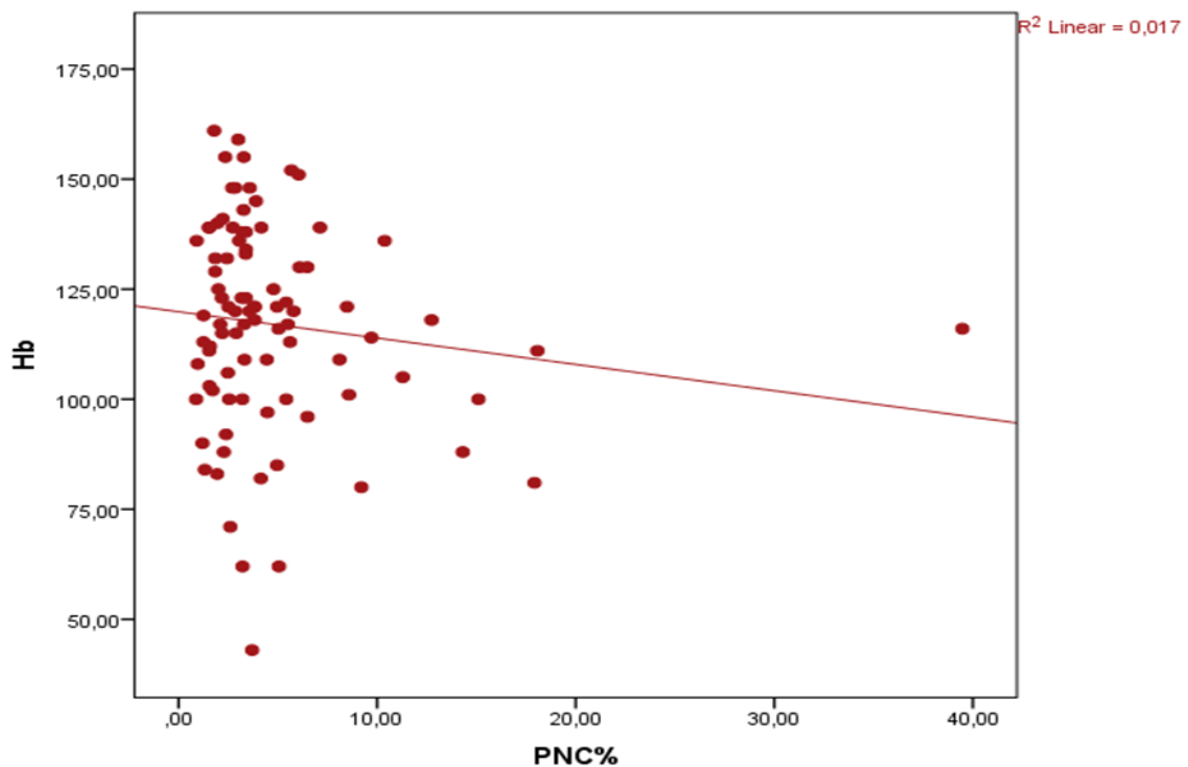
Не се намери свързаност между вида на лимфома и останалите лабораторни показатели: левкоцити, тромбоцити, ANC, ALC, бета2-микроглобулин.

#### 4.3 Връзка между PNC и демографските характеристики на пациентите

Не се намери връзка между средните стойности на PNC% и възрастовото разпределение на пациентите. При пациентите > 65 години се регистрираха по-ниски стойности на PNC в сравнение с пациентите на възраст < 65 години, без разликата да е сигнификантна (съответно 3.61 към 5.61;  $p=0.068$ ). Не се установи свързаност между средните нива на PNC% и разпределението по пол (4.64 за мъже и 5.01 за жени).

#### 4.4 Връзка между PNC и ниво на хемоглобин

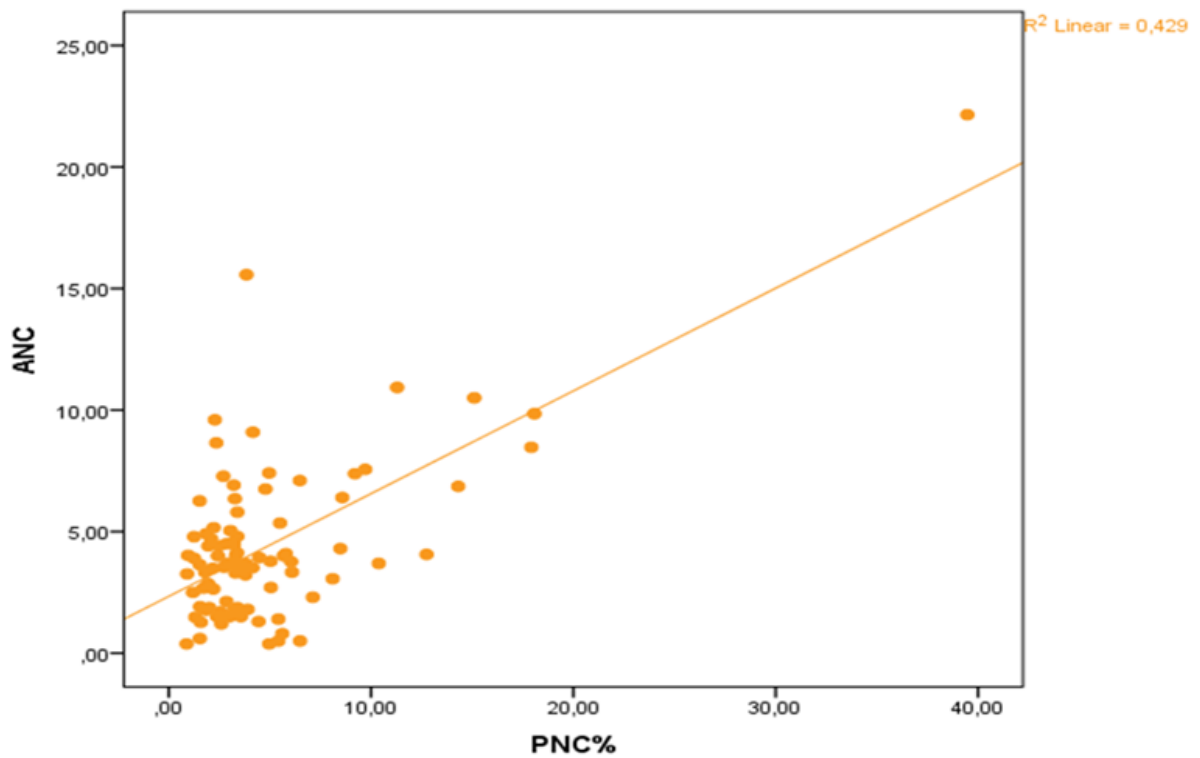
Установи се обратнопропорционална, слаба връзка между средните стойности на PNC% и нивата на хемоглобин ( $r=-0.207$ ;  $p=0.020$ ) (Фиг. 19).



Фигура 19. Корелация между PNC% и нивото на хемоглобин (g/L)

#### 4.5 Връзка между PNC и абсолютен неутрофилен брой (ANC)

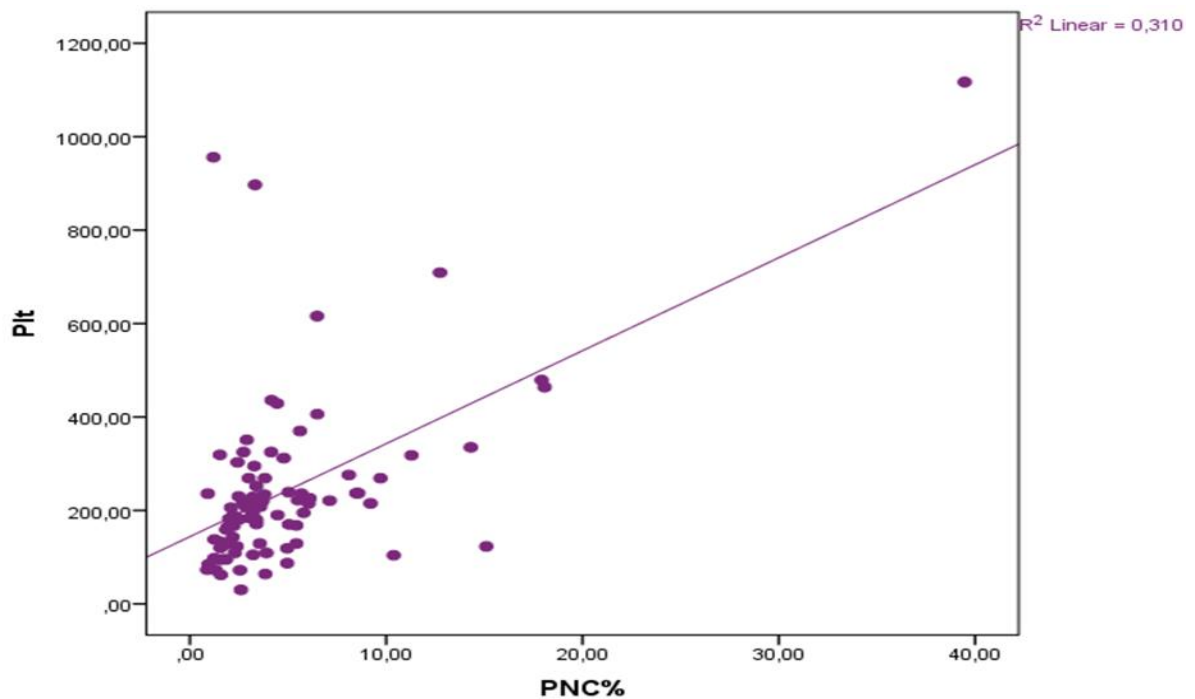
Установи се силна правопрпорционална зависимост между средните стойности на PNC% и абсолютния неутрофилен брой (ANC) ( $r=0.655$ ;  $p<0.001$ ) (Фиг. 20).



**Фигура 20. Корелация между PNC% и абсолютния неутрофилен брой ( $\times 10^9/L$ )**

#### **4.6 Връзка между PNC и тромбоцитния брой**

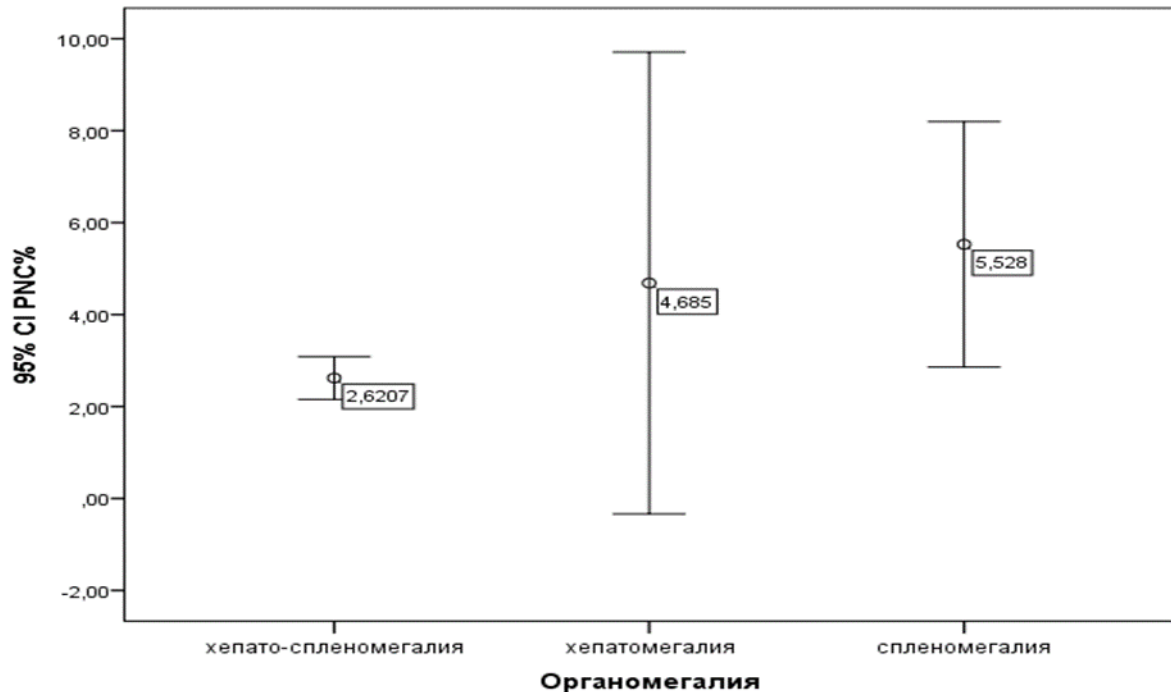
Доказа се сигнификантна, правопрпорционална зависимост между средните стойности на PNC% и броя на тромбоцитите ( $r=0.557$ ;  $p<0.001$ ) (Фиг. 21).



**Фигура 21. Корелация между PNC% и тромбоцитния брой ( $\times 10^9/L$ )**

#### 4.7 Връзка между PNC и наличието на органомегалия

Установи се умерена зависимост между PNC% и регистрирана органомегалия ( $r=0.351$ ;  $p=0.036$ ), като най-високи стойности на PNC% се наблюдаваха при пациентите със спленомегалия (5.52) (Фиг. 22).



Фигура 22. Средни стойности на PNC % според наличната органомегалия

#### 4.8 Връзка между PNC и наличието на В симптоматика

Не се доказва сигнификантна разлика в нивата на PNC% според наличието на В симптоми, но се установи тенденция безсимптомните пациенти с НХЛ да имат по-ниски нива на PNC% (съответно 5.36 към 4.32;  $p = 0.337$ ).

#### 4.9 Връзка между PNC% и Ki67

Не се намери връзка между PNC% и нивото на Ki 67. Също така не се намери връзка между нивата на PNC, екстранодалното ангажиране и настъпили инфекциозни усложнения. Такава не беше намерена и спрямо праговите стойности на PNC.

#### Обобщение на най-важните резултати по изпълнение на задача №3:

1. Установи се съществена разлика в нивата на хемоглобин (Hb) според вида на лимфома, като най-ниски стойности се наблюдаваха при пациентите с LPL и PBL.
2. Най-високи стойности на прогностичния показател ЛДХ регистрирахме при болните с PBL.
3. Установи се обратнопропорционална връзка между средните стойности на PNC% и нивото на хемоглобин.
4. Доказа се правопрпорционална зависимост между средните стойности на PNC% и абсолютния неутрофилен брой (ANC).

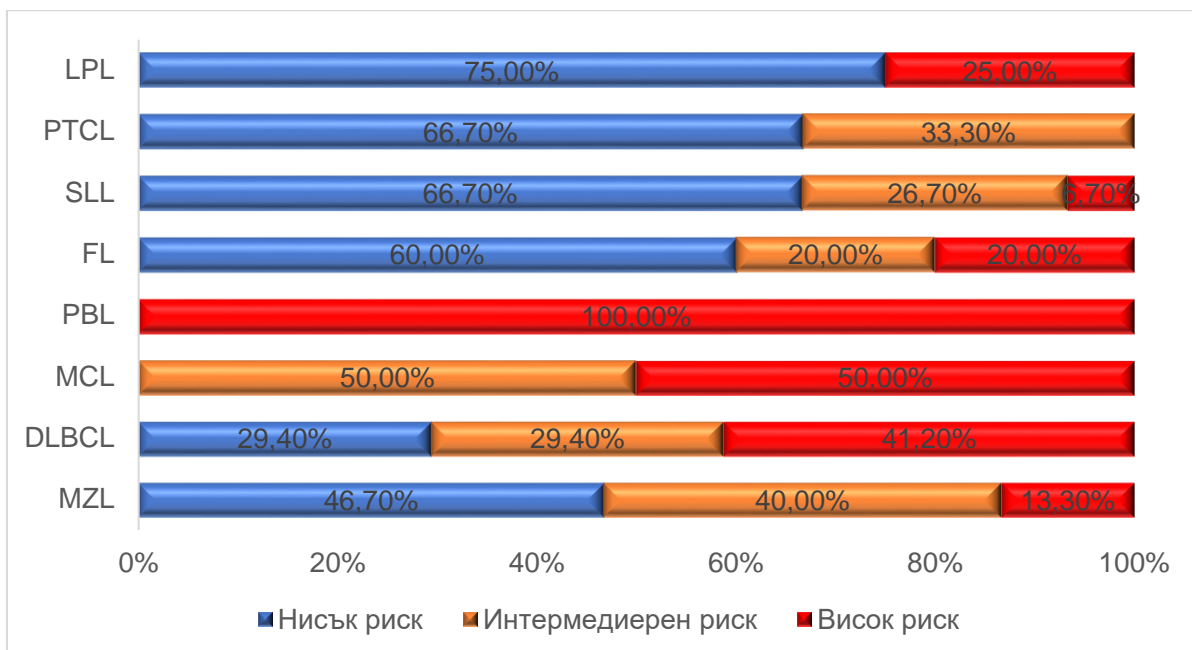


5. Доказа се сигнификантна правопрпорционална зависимост между средните стойности на PNC % и броя на тромбоцитите.
6. Установи се умерена зависисимост между PNC% и регистрирана органомегалия, като най-високи стойности на PNC % се наблюдаваха при пациентите със спленомегалия.

**5. Работа по задача №4** Да се изследва евентуална зависимост между стадия на заболяването, рисковия профил на пациента, терапевтичния режим и промените в нивата на PNC.

### 5.1 Връзка между IPI и вида на лимфома

Установи се съществена разлика в IPI рисковата група според вида на лимфома ( $p=0.034$ ), като висок риск имат пациентите с PBL, MCL и DLBDL (Фиг. 23).



**Фигура 23. Разпределение на пациентите според IPI и вида на НХЛ**

### 5.2 Връзка между стадия и вида на лимфома

Не се установи връзка между вида на лимфома и стадия на заболяването.

### 5.3 Връзка между терапевтичния режим и вида на лимфома

Установи се съществена разлика във вида на терапевтичен режим според вида на лимфома ( $p<0.001$ ), както и умерена зависимост между изследваните два показателя ( $r=0.326$ ;  $p=0.002$ ) (Табл. 4). В изследваната пациентска популация най-често използван терапевтичен режим беше R-CHOP при пациентите с MZL, FL, DLBC.

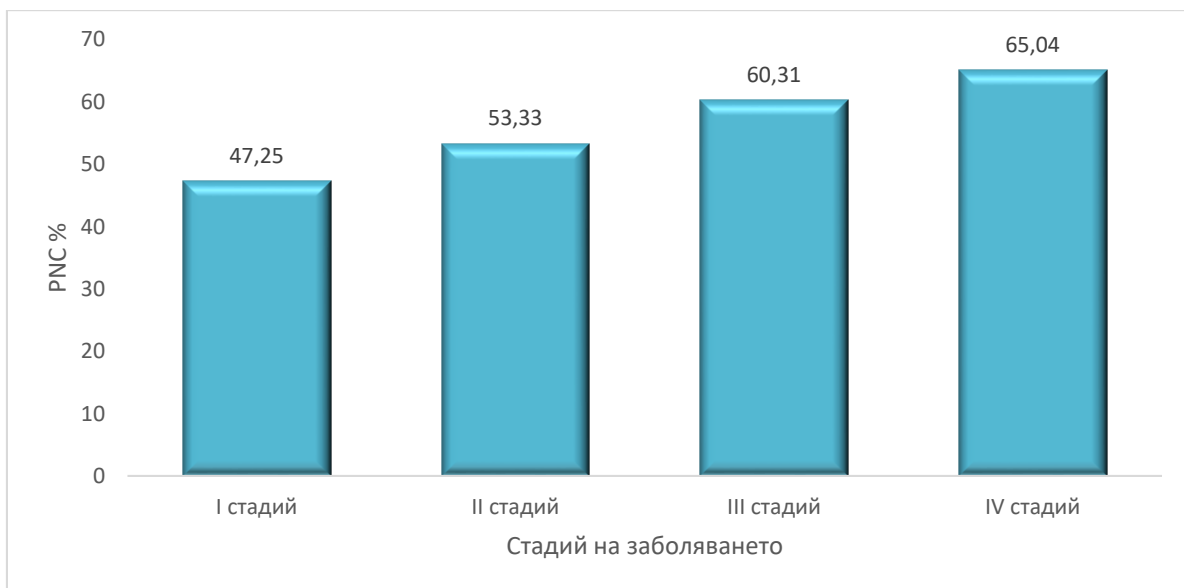
**Таблица 4. Химиотерапевтични режими според вида на лимфома**

Терапевтичен режим \* Вид на лимфома Crosstabulation

			Вид на лимфома								Total
			MZL	DLBCL	MCL	PBL	FL	SLL	PTCL	LPL	
Терапевтичен режим	R-B	Count % within Вид на лимфома	4 28,6%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	2 20,0%	6 40,0%	0 0,0%	1 50,0%	13 14,8%
	R-ACVBP	Count % within Вид на лимфома	0 0,0%	2 6,1%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	2 2,3%
	R-CHOP	Count % within Вид на лимфома	9 64,3%	26 78,8%	6 60,0%	0 0,0%	6 60,0%	4 26,7%	0 0,0%	0 0,0%	51 58,0%
	R-CNOP	Count % within Вид на лимфома	1 7,1%	5 15,2%	1 10,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	7 8,0%
	DA-EPOCH	Count % within Вид на лимфома	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 1,1%
	CHOEP	Count % within Вид на лимфома	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	3 100,0%	0 0,0%	3 3,4%
	R-COP	Count % within Вид на лимфома	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 6,7%	0 0,0%	0 0,0%	1 1,1%
	R-HCVAD	Count % within Вид на лимфома	0 0,0%	0 0,0%	3 30,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	3 3,4%
	Watch and wait	Count % within Вид на лимфома	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	2 20,0%	4 26,7%	0 0,0%	1 50,0%	7 8,0%
	Total	Count % within Вид на лимфома	14 100,0%	33 100,0%	10 100,0%	1 100,0%	10 100,0%	15 100,0%	3 100,0%	2 100,0%	88 100,0%

**5.4 Връзка между PNC и стадия на заболяването**

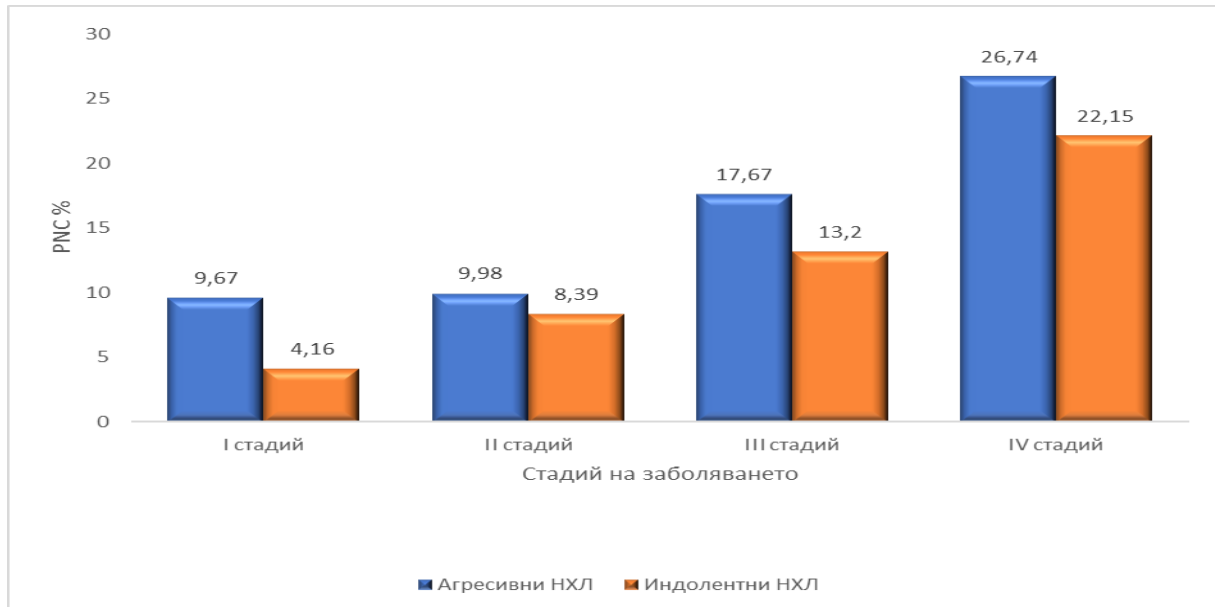
Доказа се правопрпорционална, умерена зависимост между PNC% и стадия на заболяването ( $r=0.304$ ;  $p=0.004$ ). По-високите нива на PNC корелират с напреднал стадий - III и IV. Намери се статистически значима разлика между нивата на PNC% при отделните стадии на заболяването ( $p=0.038$ ) (Фигура 24).



**Фигура 24. Средни стойности на PNC % според стадия на заболяването**

### 5.5 Връзка между PNC и стадия на заболяването в групите с индолентни и агресивни НХЛ

Съществена разлика в стойностите на PNC% се установи спрямо стадия на заболяването в двете групи НХЛ ( $p=0.042$ ). Пациентите с агресивните НХЛ в I, III и IV стадий имат сигнификантно по-високи нива на PNC%, в сравнение с индолентните НХЛ в същите клинични стадии (Фиг. 25).



Фигура 25. Средни стойности на PNC% според стадия на заболяването при индолентни и агресивни лимфоми

### 5.6 Връзка между PNC и IPI

Доказа се съществена разлика и слаба правопрпорционална зависимост между нивата на PNC % и IPI прогностичния риск ( $r=0.263$ ;  $p=0.028$ ), като отново се наблюдава същата тенденция - пациентите с висок риск да имат по-високи нива на PNC% (Фиг. 26).



Фигура 26. Средни стойности на PNC % според IPI

### 5.7 Връзка между PNC% и IPI при индолентни и агресивни НХЛ

При анализ на нивата на PNC% и IPI в двете групи лимфоми се намери съществена разлика само по отношение на агресивните НХЛ ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 27).



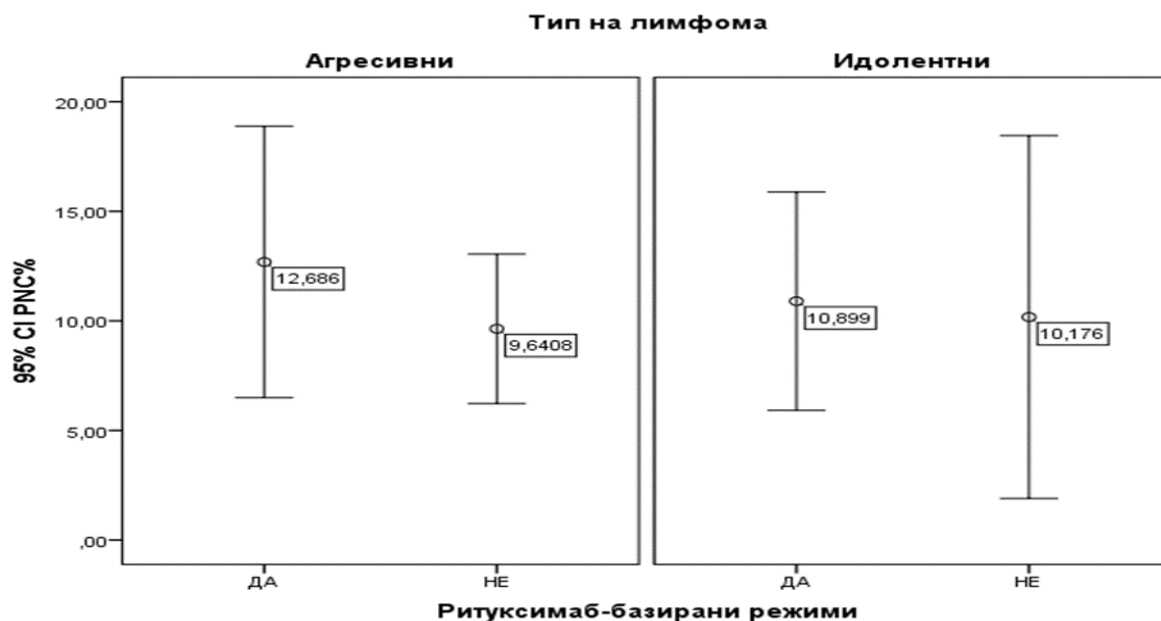
**Фигура 27. Средни стойности на PNC % според IPI при индолентни и агресивни лимфоми**

### 5.8 Връзка между PNC и терапевтичния режим

За яснота на анализа и поради хетерогенността на популацията, пациентите бяха разделени в две групи според проведения терапевтичен режим: ритуксимаб-базирани и антрациклин-базирани режими.

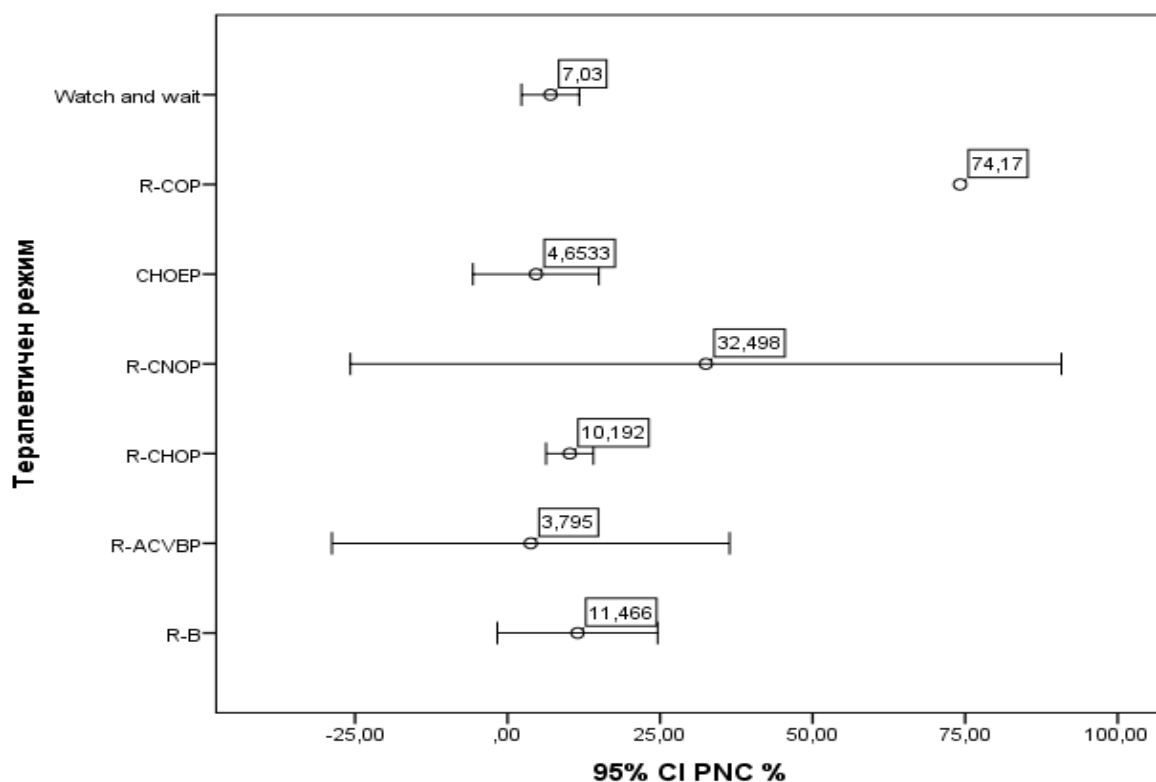
1. Значително по-високи нива на PNC% се наблюдаваха при използване на ритуксимаб-базирани режими, за разлика от случаите, при които в терапевтичния протокол не е включен Ритуксимаб. Установихме съществена разлика между стойностите на PNC% и ритуксимаб-базираните терапевтични режими само по отношение на агресивните НХЛ ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 28).

2. Не се намери сигнификантна разлика или зависимост между нивата на PNC% и антрациклин-базираните режими за двете групи НХЛ.



**Фигура 28. Средни стойности на PNC % според проведения ритуксимаб-базирани режим при агресивни и индолентни лимфоми**

Доказа се съществена разлика между нивата на PNC% и вида терапевтичен режим ( $p=0.001$ ) (фигура 29). В изследваната пациентска популация терапевтичният режим R-CNOP се свързва със значително по-високи нива на PNC%, в сравнение с останалите режими.



**Фигура 29. Средни нива на PNC % според проведения терапевтичен режим**

**Обобщение на най-важните резултати по изпълнение на задача №4:**

1. Установи се съществена разлика в IPI рисковата група според вида на лимфома, като висок риск имат пациентите с PBL, MCL и DLBDL.
2. По-високите нива на PNC% корелират с напреднал стадий на лимфома - III и IV.
3. Съществена разлика се установи по отношение на PNC% и стадия на заболяването при агресивни и индолентни лимфоми.
4. Доказа се съществена разлика и правопрпорционална зависимост между нивата на PNC % и IPI прогностичния риск.
5. При анализ на нивата на PNC% и IPI в двете групи лимфоми се намери съществена разлика само по отношение на агресивните НХЛ.
6. В изследваната пациентска популация терапевтичният режим R-CNOP се свързва със значително по-високи нива на PNC%, в сравнение с останалите видове терапевтични режими.

**6. Работа по задача №5** Да се изследва влиянието на нивото на PNC върху степента на терапевтичния отговор, прогнозата и едногодишната преживяемост

**6.1. Връзка между терапевтичния отговор и вида на НХЛ**

Съществена разлика се установи във вида на терапевтичния отговор според характеристиката на лимфома ( $p=0.046$ ). Прави впечатление, че при болните с DLBCL 48,5 % са постигнали пълен терапевтичен отговор, а 27,3 % от тях са с регистрирана прогресия на заболяването. Резултатите са представени на таблица 5.

По отношение на доказани рецидиви, те са при един пациент с DLBCL, един с PBL и един с FL.

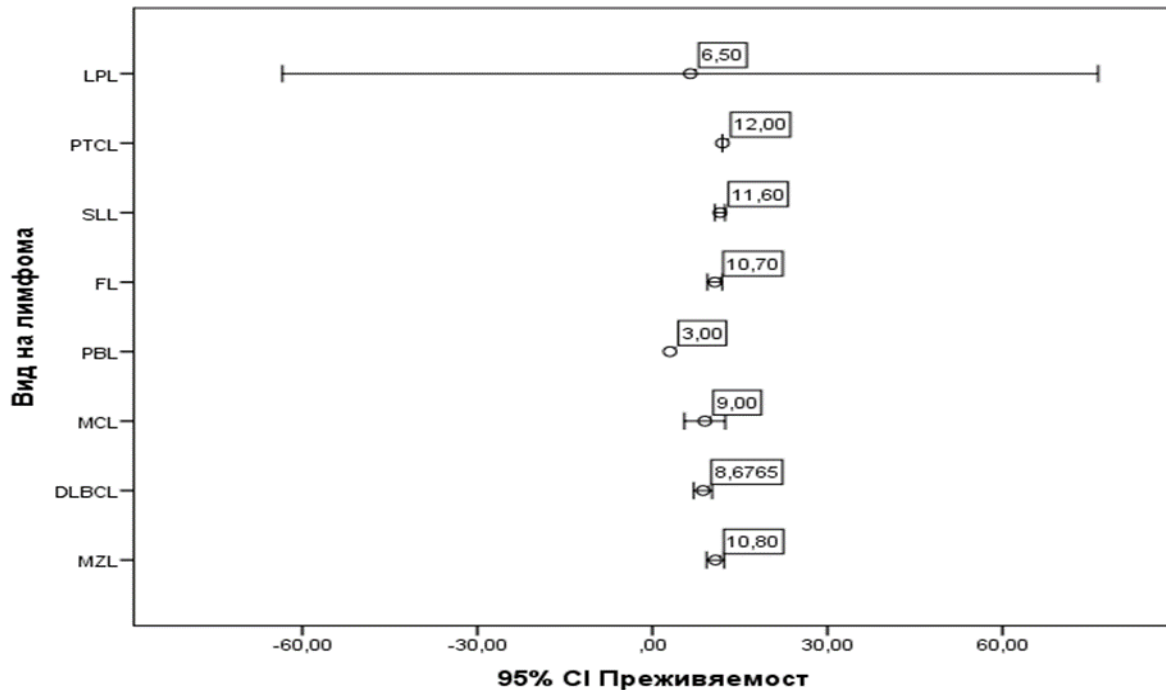
**Таблица 5. Терапевтичен отговор според вида на лимфома**

Терапевтичен отговор \* Вид на лимфома Crosstabulation

			Вид на лимфома							Total	
			MZL	DLBCL	MCL	PBL	FL	SLL	PTCL		LPL
Терапевтичен отговор	PR	Count	4	5	3	0	2	3	0	0	17
		% within Вид на лимфома	28,6%	15,2%	30,0%	0,0%	25,0%	27,3%	0,0%	0,0%	21,0%
	CR	Count	9	16	3	0	4	8	3	1	44
		% within Вид на лимфома	64,3%	48,5%	30,0%	0,0%	50,0%	72,7%	100,0%	100,0%	54,3%
	SD	Count	0	2	0	0	0	0	0	0	2
		% within Вид на лимфома	0,0%	6,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,5%
	PD	Count	1	10	4	1	2	0	0	0	18
		% within Вид на лимфома	7,1%	30,3%	40,0%	100,0%	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%	22,2%
Total		Count	14	33	10	1	8	11	3	1	81
		% within Вид на лимфома	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

## 6.2 Връзка между едногодишна преживяемост и вида на НХЛ

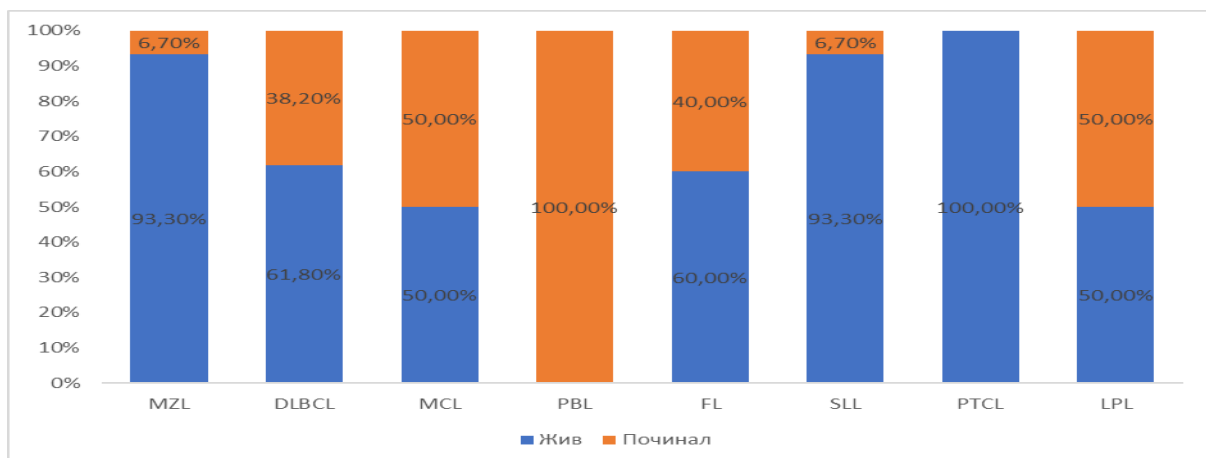
Установи се сигнификантна разлика в едногодишната преживяемост според вида на лимфома ( $p=0.047$ ). Най-ниска преживяемост се регистрира при пациентите с PBL (3 мес.) и LPL (6.5 мес.) (Фигура 30).



Фигура 30. Средна преживяемост (в месеци) според вид на лимфома

## 6.3 Връзка между изхода от заболяването и вида на лимфома

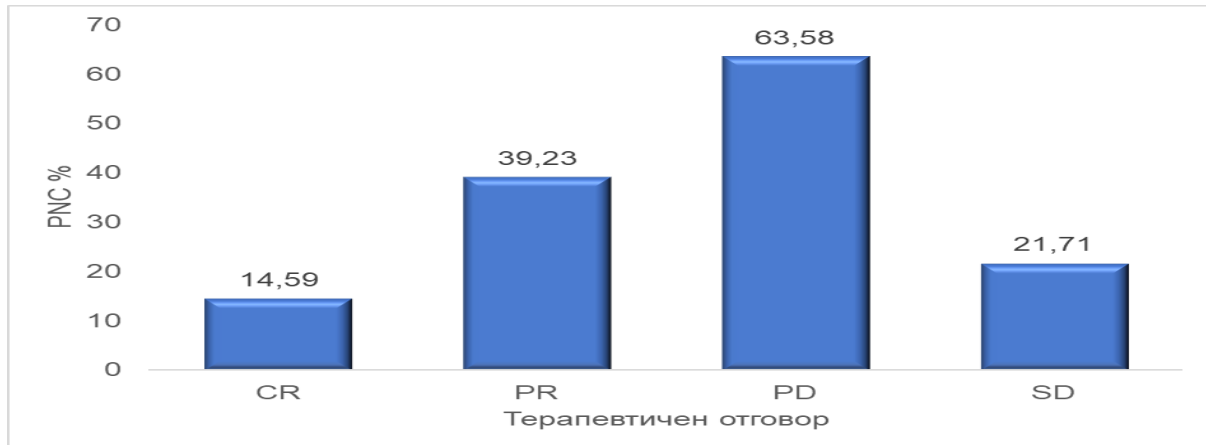
Съществена разлика се намери и по отношение на изхода от заболяването и вида на лимфома ( $p=0.030$ ) (Фигура 31). Най-висок леталитет се регистрира при пациентите с PBL, което се свързва с твърде агресивния ход на заболяването и биологичната му активност.



Фигура 31. Изход от заболяването според вид на неходжкиновия лимфом

#### 6.4 Връзка между PNC и терапевтичния отговор

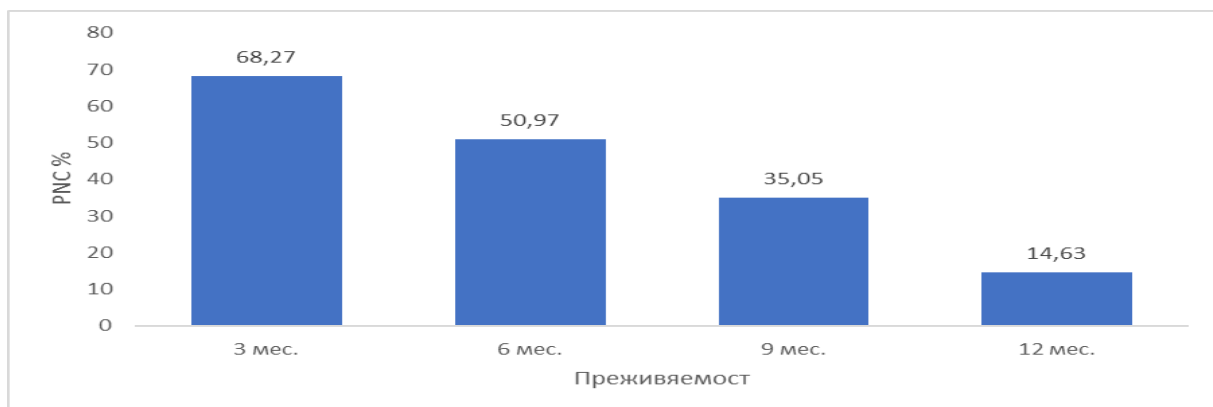
Установи се силна зависимост между нивото на PNC% и постигнатия терапевтичен отговор ( $r=-0.476$ ;  $p<0.001$ ). Най-високи стойности на PNC% се наблюдаваха при пациентите с прогресия на заболяването (Фигура 32).



**Фигура 32. Средни стойности на PNC % според постигнатия терапевтичен отговор**

#### 6.5 Връзка между PNC% и едногодишната преживяемост

Доказа се обратнопропорционална, слаба зависимост между PNC% и едногодишната преживяемост на пациентите ( $r=-0.262$ ;  $p=0.030$ ). Високите нива на PNC корелират с ниска едногодишна преживяемост (Фигура 33).



**Фигура 33. Средни стойности на PNC % според едногодишната преживяемост**

#### 6.6 Връзка между PNC и R-IP1

Не се установи съществена разлика в нивата на PNC% според степента на рисковата скала R-IP1. При проведения анализ на PNC% наблюдавахме следната тенденция: пациентите с лоша прогноза имаха най-високи нива на PNC% (53.34), следвани от тези с добра прогноза (48.27), а с най-ниски стойности бяха пациентите с много добра прогноза (41.32).



## 6.7 Връзка между PNC и изхода от заболяването

Не се намери значима връзка между PNC% и изхода от заболяването.

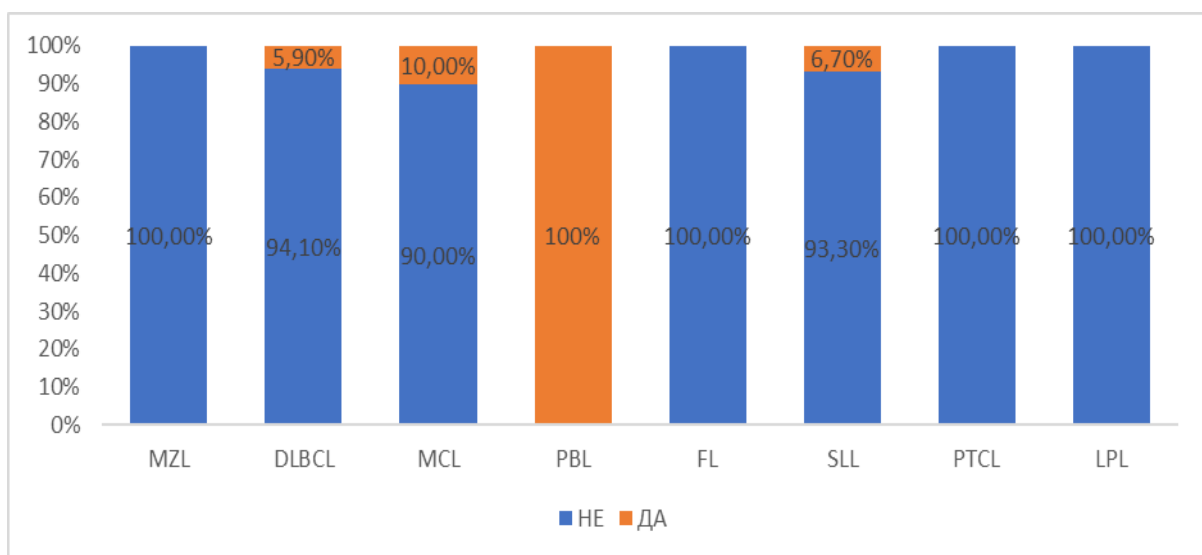
### Обобщение на най-важните резултати по изпълнение на задача №5:

1. Съществена разлика се установи във вида на терапевтичния отговор според характеристиката на лимфома- около 48,5 % от болните с DLBCL са постигнали пълен терапевтичен отговор, а 27,3 % от тях са с регистрирана прогресия на заболяването.
2. Най-ниска преживяемост се регистрира при пациентите с PBL (3 мес.) и LPL (6.5 мес).
3. Съществена разлика се намери и по отношение на изхода от заболяването и вида на лимфома, като най-висок леталитет се регистрира при пациентите с PBL.
4. Най-високи стойности на PNC% се наблюдаваха при пациентите с прогресия на заболяването.
5. Доказа се обратнопропорционална зависимост между PNC% и едногодишната преживяемост на пациентите.
6. Не се установи съществена разлика в нивата на PNC% според степента на рисковата скала R-IPI.

## 7. Работа по задача №6 Да се идентифицира евентуалната роля на PNC при определяне на риска от тромботични усложнения преди, по време и след лечение

### 7.1 Връзка между вид на лимфома и тромботичните събития

Установи се съществена разлика между вида на НХЛ и възникването на тромботични инциденти след проведено лечение ( $p=0.008$ ) (Фигура 34). Прави впечатление, че пациентите с PBL имат най-висок риск от тромботични усложнения след провеждане на имуно/химиотерапия.



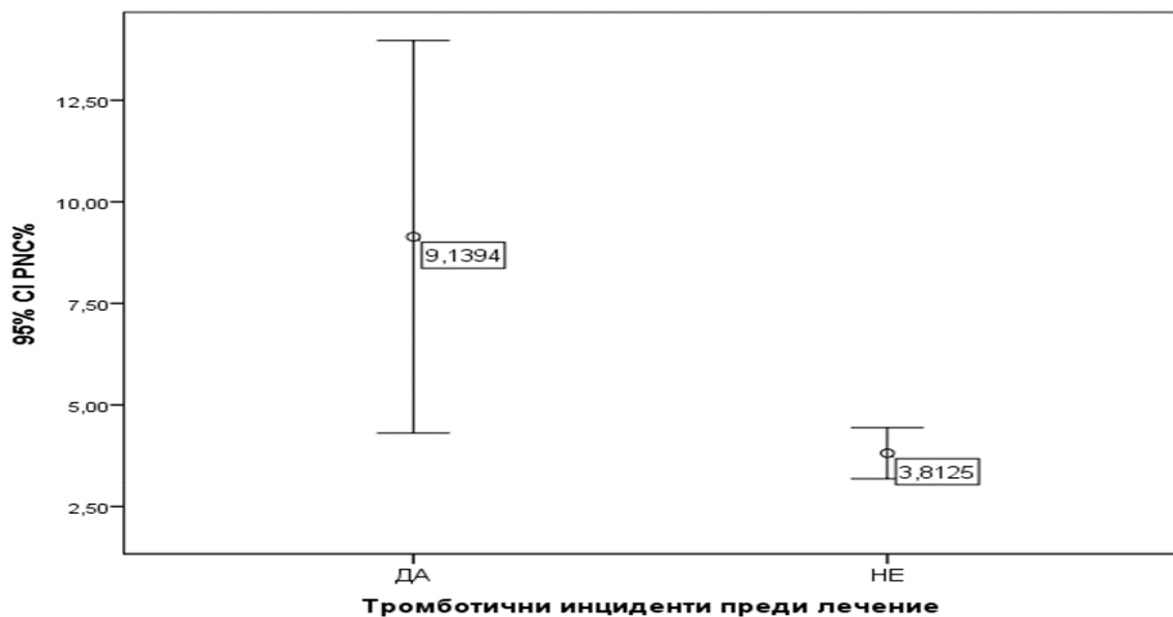
Фигура 34. Тромботични инциденти след лечение според вид на лимфома

## 7.2 Връзка между броя на тромбоцитите и тромботичните събития преди и след лечение на НХЛ

Средният брой на тромбоцитите при пациентите с тромботични усложнения беше  $376.06 \pm 340.23$  (30-1117), докато при останалите е  $208.07 \pm 100.50$  (62-616). Между двата анализирани показателя се намери умерена зависимост ( $r=0.0362$ ;  $p<0.001$ ), която показва, че по-високите нива на тромбоцити корелират с по-висок риск от настъпване на тромботични инциденти.

## 7.3 Връзка между PNC и появата на тромботични събития преди началното лечение

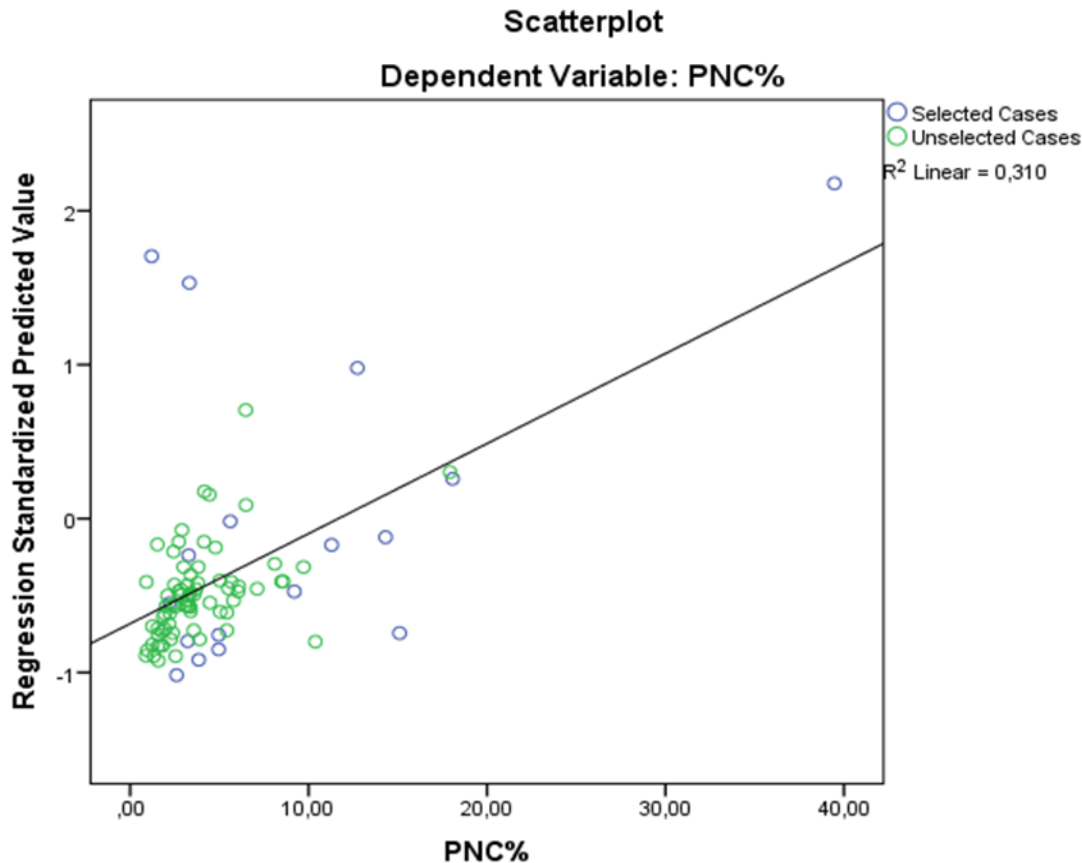
Установи се умерена зависимост между PNC% и тромботичните усложнения преди началното лечение ( $r=0.410$ ;  $p<0.001$ ). В 16.8 % от пациентите тромботичните усложнения се свързват с по-високи нива на PNC % (фигура 35).



Фигура 35. Средни стойности на PNC% според тромботичните инциденти преди начало на лечението

## 7.4 Връзка между PNC, брой на тромбоцитите и тромботични инциденти преди лечение

Установи се умерена към силна правопрпорционална зависимост между нивата на PNC% и тромбоцитния брой при пациентите с анамнеза за тромботични усложнения преди началното лечение ( $r=0.480$ ;  $p<0.05$ ) (Фиг. 36).



**Фигура 36. Регресионен анализ на връзката между PNC% и тромбоцитния брой при пациентите с тромботични усложнения преди началното лечение**

### 7.5 Връзка между PNC и появата на тромботични усложнения след лечение

При анализ на връзката между тромботичните усложнения след проведено лечение и нивата на PNC% се установи слаба зависимост ( $r=0.232; p<0.05$ ). Средните стойности на PNC% при пациентите с тромботични усложнения бяха 55.28, докато при тези без тромбози - 12.32 ( $p<0.05$ ).

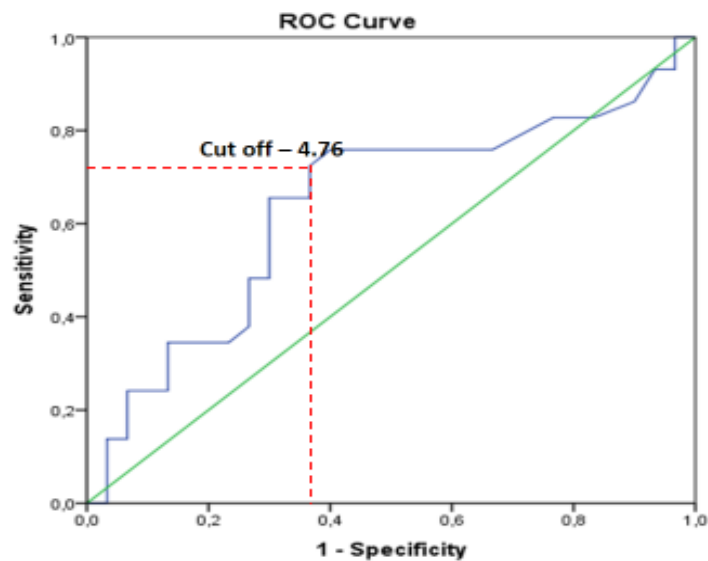
#### **Обобщение на най-важните резултати по изпълнение на задача №6:**

1. Пациентите с PVL имат най-висок риск от тромботични усложнения след провеждане на противотуморна терапия.
2. Регистрира се умерена зависимост между PNC% и тромботичните усложнения преди началното лечение.
3. В 16.8 % от пациентите тромботичните усложнения се свързват с по-високи нива на PNC %
4. Установи се умерена към силна правопрпорционална зависисимост между нивата на PNC% и тромбоцитния брой при пациентите с анамнеза за тромботични усложнения преди началното лечение.
5. Установи се слаба зависимост между нивата на PNC% и тромботичните усложнения след проведено лечение.

## 8. Работа по задача №7 Да се потърси свързаност между нивата на IL-10, VEGF и PNC при индолентни и агресивни лимфопрлиферативни неоплазми

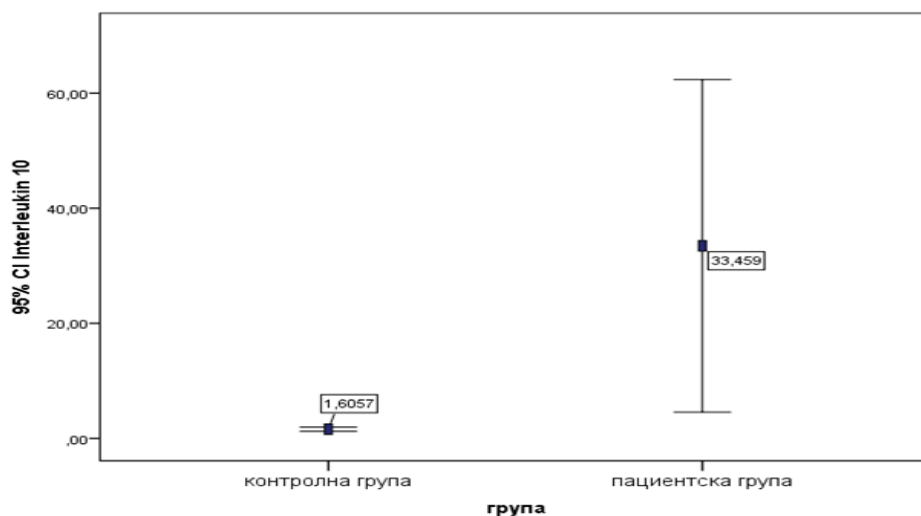
### 8.1. Сравняване на серумните нива на IL-10 при пациенти с индолентни и агресивни НХЛ и здрави контроли

Поради липсата на референтни стойности на IL-10 за здрави индивиди чрез ROC curve анализ се определи праговата стойност, която разграничава нивата на IL-10 при анализиранияте пациенти от здравите контроли. За прагова стойност на IL-10 се прие 4.76 pg/ml (AUC=0.639 (0.493-0.785),  $p < 0.05$ ), като резултатите се отнасят за пациенти с НХЛ с чувствителност 65.5% и специфичност 70.0% (Фиг. 37).



Фигура 37. Прагова стойност на IL-10 pg/ml спрямо здрави контроли

Установена е сигнификантна разлика в средните стойности на IL-10 в клиничната и контролна група ( $p < 0.001$ ) (фиг. 38).



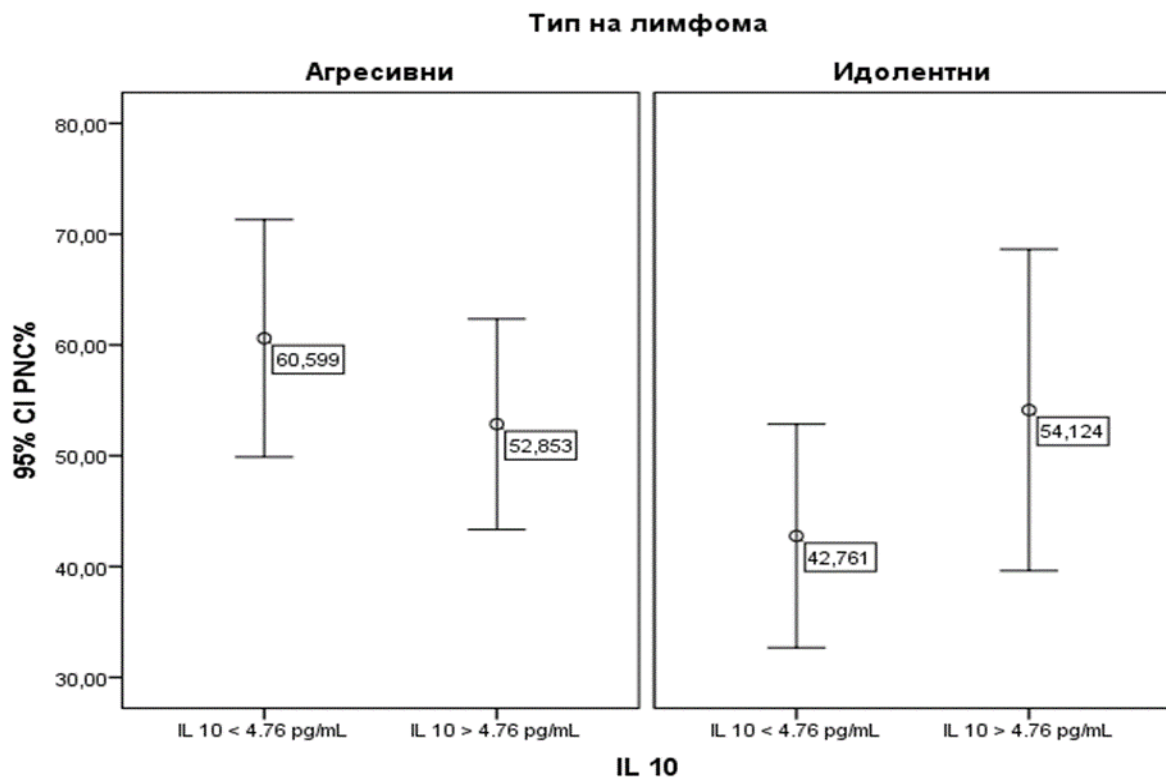
Фигура 38. Сравнителен анализ на средните стойности на IL-10 pg/ml при пациенти с НХЛ и здрави контроли

## 8.2. Връзка между IL-10, PNC и тип на НХЛ

При анализ на нивата на IL-10 при агресивните и индолентни НХЛ се установи наличие на сигнификантно по-високи стойности на IL-10 при пациентите с агресивни НХЛ ( $p < 0.001$ ) спрямо пациентите с индолентни НХЛ (съответно 47.34 към 14.03). Доказа се умерена обратнопропорционална зависимост ( $r = -0.356$ ;  $p = 0.006$ ) между нивата на IL-10 и типа на лимфома. Пациентите с агресивни НХЛ имат 2.1 пъти по-голям риск от високи нива на IL-10 {OR=2.11 (1.168-3.804,  $p = 0.009$ )}

При анализ на стойностите на PNC% според серумните нива на IL-10 и типа на лимфома се установиха две съществени разлики (Фиг. 39).

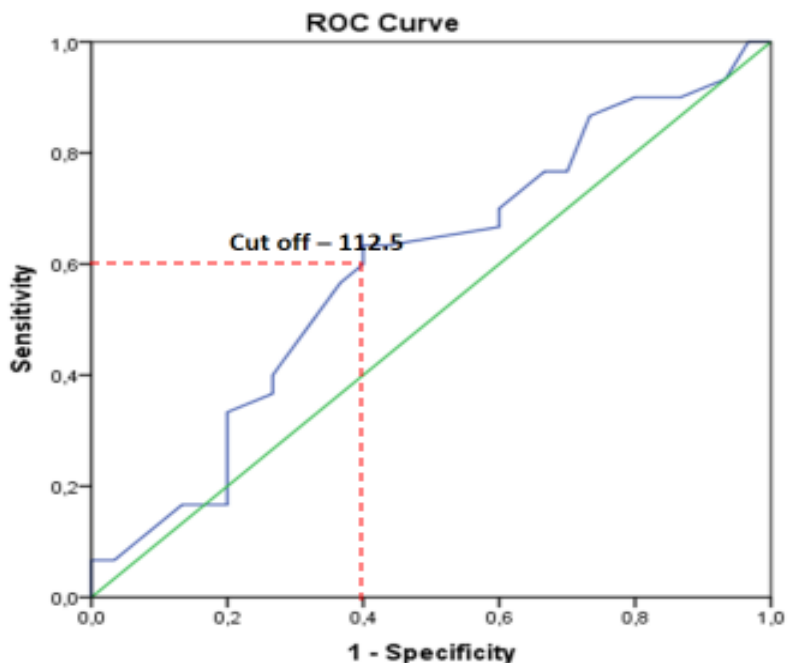
1. При агресивните НХЛ високите нива на IL-10 са свързани с ниски нива на PNC% ( $p < 0.05$ )
2. При индолентните НХЛ се установи правопрпорционална зависимост между нивата на PNC % и на IL-10 ( $p < 0.01$ ).



Фигура 39. Средни стойности на PNC% според нивата на IL-10 pg/ml при агресивни и индолентни лимфоми

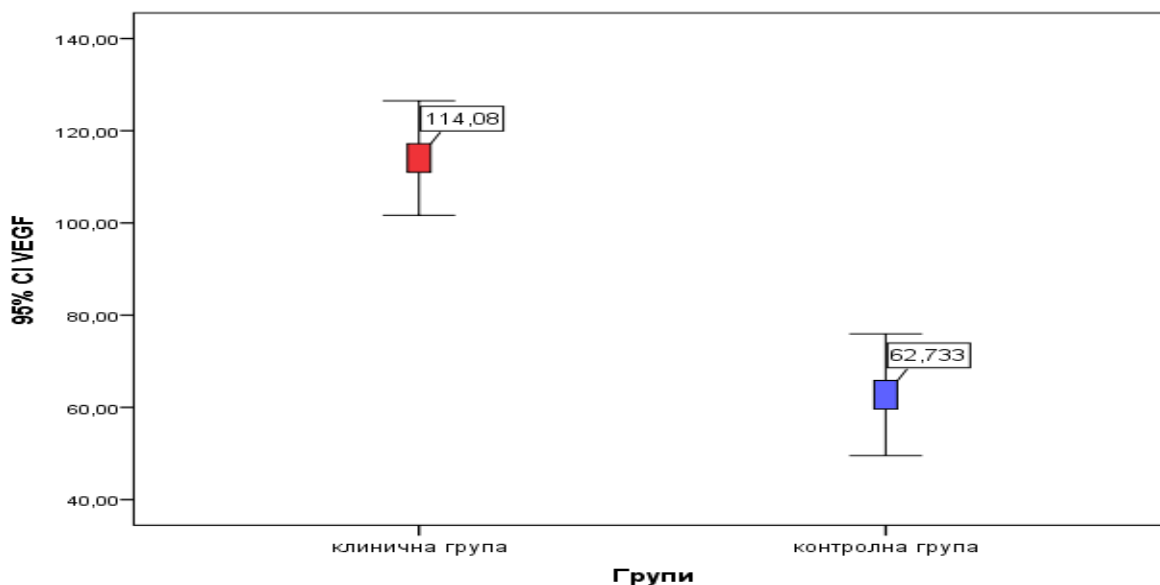
## 8.3 Сравняване нивата на VEGF при пациенти с индолентни и агресивни НХЛ и здрави контроли

За яснота на анализа и поради липсата на референтни стойности за VEGF беше определена прагова стойност 112.5 (AUC=0.593 (0.448-0.738),  $p < 0.05$ ) със специфичност и чувствителност 60.0 % (Фиг. 40).



**Фигура 40. Прагова стойност на VEGF спрямо здрави контроли**

Установена е сигнификантна разлика в средните стойности на VEGF в клиничната и контролна група ( $p < 0.001$ ) (фиг. 41).

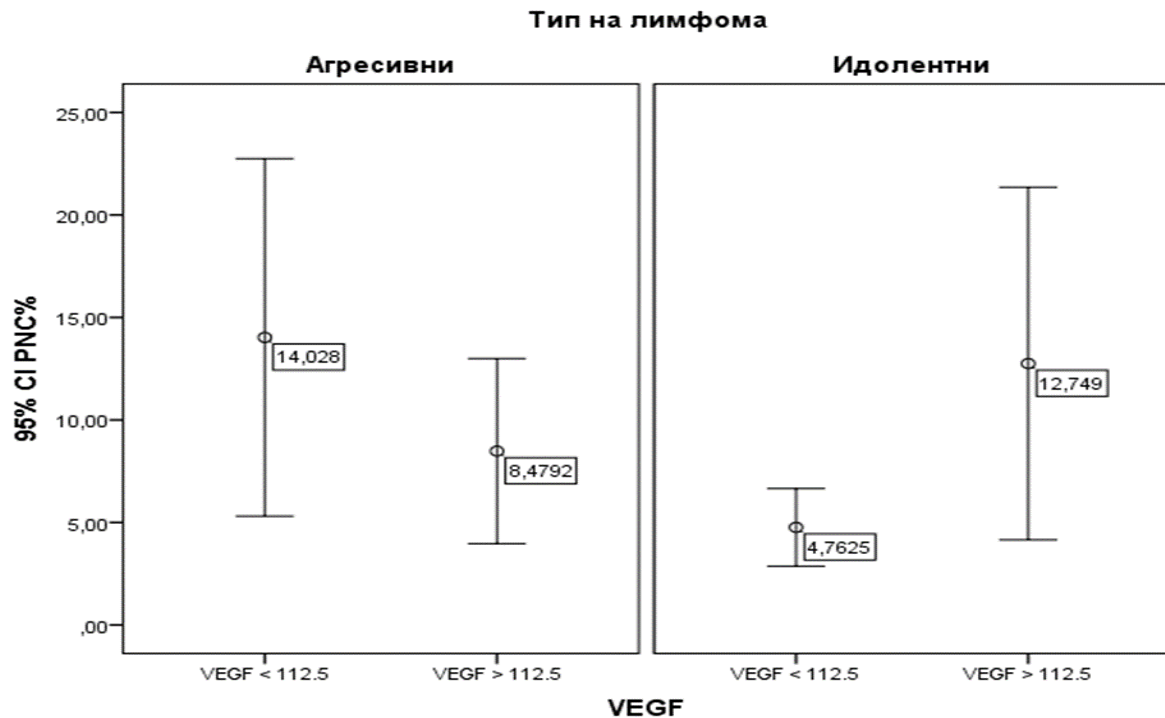


**Фигура 41. Сравнителен анализ на средните стойности на VEGF% при пациенти с НХЛ и здрави контроли**

#### 8.4 Връзка между VEGF, PNC и тип на НХЛ

При анализ на нивото на експресия на VEGF при двете групи НХЛ се установи, че пациентите с индолентни лимфоми имат над два пъти по-висок риск от костномозъчно ангажиране и експресия на VEGF в сравнение с тези с агресивни лимфоми {OR=2.25 (0.801-6.321),  $p < 0.05$ }.

При анализ на PNC% според нивото на експресия на VEGF и типа на лимфома се установи статистически значима зависимост. При агресивните НХЛ ниските нива на PNC% корелират с по-висока експресия на VEGF ( $p < 0.01$ ), докато при индолентните НХЛ повишената експресия на VEGF се свързва с високи нива на PNC% ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 42).



**Фигура 42. Средни стойности на PNC% според нивата на VEGF %при прагова стойност 112.5 и типа на лимфома**

**Обобщение на най-важните резултати по изпълнение на задача №7:**

1. Регистрирана е сигнификантна разлика в средните стойности на IL-10 в клиничната и контролна група.
2. Установи се наличие на значимо по-високи стойности на IL-10 при пациентите с агресивни НХЛ спрямо пациентите с индолентни НХЛ.
3. При индолентните лимфоми се установи правопрпорционална зависимост между нивата на PNC % и на IL-10.
4. При агресивните лимфоми високите нива на IL-10 са свързани с ниски нива на PNC %.
5. Регистрирана е сигнификантна разлика в средните стойности на VEGF в клиничната и контролна група.
6. Пациентите с индолентни лимфоми имат над два пъти по-висок риск от костно-мозъчно ангажиране и експресия на VEGF в сравнение с тези с агресивни лимфоми.
7. При агресивните НХЛ се установи обратнопрпорционална зависимост между нивата на PNC % и на VEGF.
8. При индолентните НХЛ повишената експресия на VEGF се свързва с високи нива на PNC %.

## V. ДИСКУСИЯ

Туморната микросреда, вродената имунна система, системният възпалителен отговор и междуклетъчните взаимодействия са ключови фактори, които определят клиничното протичане и прогнозата при пациентите с малигнени заболявания.

Ролята на циркулиращите неутрофили и тромбоцити в патогенезата на солидните тумори е проучена и публикувана в редица статии. Доказано е значимото им въздействие върху туморната биология, туморната прогресия, неоангиогенезата и процесите на метастазиране. Образуването на PNC предизвиква модулиране на поредица от реакции, необходими за регулирането на вътреклетъчния баланс и за осъществяване на поредица от взаимосвързани процеси, целящи адекватно поддържане на клетъчната хомеостаза.

Въпреки, че все още въздействието на циркулиращите неутрофилно-тромбоцитни комплекси върху развитието и еволюцията на НХЛ не е напълно изяснено, предполага се тяхната роля като неизменен, независим прогностичен фактор. Липсват достатъчно проучвания и натрупани данни за детайлно изследване нивата на PNC при НХЛ, но познанията за ролята им при други малигнени хемопатии ни дават основание да предвидим тяхното потенциално значение в клиничната изява, прогресия и въздействие върху ефекта от противотуморно лечение. Не е изяснено дали PNC като самостоятелен фактор са подходящ или достатъчен прогностичен маркер, тъй като е само един от многото потенциални предиктивни фактори, участващи в етапите на туморния растеж на толкова хетерогенна група заболявания като лимфопрлиферативните неоплазии.

В нашия проспективен анализ установихме, че нивата на PNC при пациентите с НХЛ са значимо по-високи спрямо тези в здравата контролна популация. Подобен резултат е публикуван през 2021 г. от Jaradeh и сътрудници, които анализират PNC при 98 пациенти с Нехочкинови лимфоми, сравняват ги с контрола от здрави лица и установяват статистически значимо по-високи нива при пациентите, в сравнение с контролната група (Jaradeh M et al, 2021). В друго проучване на Tekelioglu Y и сътрудници са изнесени идентични резултати (Tekelioglu Y et al, 2012). В допълнение на тези данни ние установихме, че пациентите с агресивни лимфоми имат три пъти по-висока активност на PNC, в сравнение с индолентните. Значително по-високите нива на PNC при пациентите с агресивни НХЛ се регистрират *in vivo* и *in vitro*, след стимулация с ADP и PMA. Получените резултати се свързват с допълнителна активация и агрегация на тромбоцитите, настъпваща след стимулация с тромбоцитни агонисти. При активиране тромбоцитите освобождават редица фактори и възпалителни хемокини (PAF, RANTES, CCL3, CXCL1, CXCL4 и CXCL7), които стимулират тромбоцитната адхезия, агрегация, клетъчна сигнализация, имуен отговор и по този начин модулират туморната микросреда (von Hundelshausen et al, 2005).

Проучване на Izzì и сътрудници от 2007 година, което анализира стойностите на PNC в стимулирана и нестимулирана кръв, потвърждава значителното им повишаване след стимулация (Izzì B et al, 2007). За разлика от тях в нашата пациентска група високи нива на PNC регистрирахме, както в стимулирана, така и в нестимулираната кръв. Анализът показва, че стимулацията на венозната кръв с PMA води до 11,8 пъти повишаване на средните стойности на PNC, в сравнение с ADP. Статистически значима



зависимост се установи при пациентите с агресивни лимфоми, които имат високи нива на PNC, както *in vivo* така и *in vitro*, след стимулация с PMA.

При мониториране на PNC се доказва умерена, правопрпорционална зависимост между стойностите им преди и след проведена имуно/химиотерапия. Установихме, че при агресивните лимфоми пост-терапевтично нивата на PNC се понижават, докато при индолентните се установява обратна тенденция към повишаване. Получените резултати потвърждават тезата, че противотуморното лечение води до повишаване на нивата на PNC, най-вече при пациентите с индолентни НХЛ. Антитуморната терапия е свързана с повишен риск от развитие на тромбоза, но патогенетичните механизми, чрез които тя повлиява хемостазата, активирайки я, все още не са напълно изяснени. Известно е, че някои от цитостатиците (доксорубин, епирубин), често използвани при лечението, както на малигнени хемопатии, така и на солидни тумори, стимулират експресията на тъканен фактор върху раковите клетки (Boles JC et al, 2011). Тези данни бихме могли да свържем с прокоагулантния фенотип на антрациклините и тяхната неизменна роля при процесите на тумор-индуцираната NETosis.

Поради липсата на референтни стойности за PNC чрез ROC curve анализ беше определена прагова стойност за анализираната пациентска група от 1.76%. Установи се, че високите нива на PNC са свързани с по-ниски нива на хемоглобина, като връзката е статистически значима. В изследваната пациентска популация най-ниски стойности на хемоглобин се регистрираха при Плазмобластен лимфом, което асоциираме с ранна дисеминация и твърде агресивен ход на болестта. Имайки предвид патофизиологичното въздействие на NETosis и на PNC, свързваме тяхната по-висока активност с тежестта на клиничните прояви и по-висока степен на малигненост на лимфома.

Доказахме наличие на правопрпорционална зависимост между високите нива на PNC и абсолютния неутрофилен брой. Такава връзка се намери и между PNC и броя на тромбоцитите. Установи се, че по-високите нива на PNC при агресивните лимфоми корелират с наличие на тромбоцитоза, като израз на активност на лимфома. Подобен резултат е описан и в анализа на Jensen и сътрудници, където се установява правопрпорционална зависимост между повишените стойности на PNC и броя на тромбоцитите (Jensen M. K et al, 2001). За разлика от нашите резултати Jaradeh и сътрудници не установяват значима връзка между PNC и тромбоцитния брой (Jaradeh M et al, 2021).

При анализ на получените данни не установихме свързаност между средните стойности на PNC и останалите лабораторни показатели, проследими при НХЛ, като левкоцити, абсолютен лимфоцитен брой, ЛДХ и бета2-микроглобулин. Подобни резултати са описани в достъпната литература, но липсата на статистически значима зависимост авторите обясняват с недостатъчен брой анализирани болни (Leanne R et al, 2020)

При пациентите с агресивни лимфоми принципно се наблюдават значимо по-високи стойности на лабораторни прогностични критерии за активност като ЛДХ, Ki67, а също и наличие на конституционални симптоми. Ние установихме значима правопрпорционална връзка между нивата на PNC и стадия на заболяването, прогностичния риск спрямо IPI и използвания терапевтичен режим. Описаната зависимост е от голямо значение за изграждане на клиничен модел за определяне

участието на PNC в развитието, клиничната изява, туморната прогресия и въздействие върху терапевтичното повлияване на лимфома.

В изследваната пациентска популация се доказва корелация между по-високи нива на PNC и напреднал III и IV клиничен стадий на НХЛ. Установи се, че повишените PNC корелират с висок прогностичен риск спрямо IP1 при пациентите с агресивни НХЛ, в сравнение с индолентните. Подобни резултати са изнесени и в други проучвания, където по-високите нива на PNC са неизменно свързани с висок IP1 риск при пациентите в III/IV стадий на заболяването (Zhang Y et al, 2020). Високият риск е допълнителен, значим фактор за избор на терапевтичен режим, прогнозиране на терапевтичния отговор, предвиждане на рецидивите и преживяемостта при болните с агресивни лимфоми.

В нашите групи пациенти най-често прилаган терапевтичен протокол беше R-СНОР. При пациентите с агресивни НХЛ, провеждали лечение с ритуксимаб-базирани режими се установиха сигнификантно по-високи нива на PNC, в сравнение с тези, в чието лечение не е включен Ритуксимаб. Вероятно този факт може да се свърже със специфичния механизъм на действие на моноклоналните антитела, активиращи общия имунен отговор.

Не се установи сигнификантна разлика или зависимост между PNC и проведените антрациклин-базираните режими, както при индолентните, така и при агресивните НХЛ. При редица проучвания е анализирана ролята на цитостатичните средства върху тумор-индуцираната нетоза. Химиотерапевтичните лекарства предизвикват клетъчна смърт, като водят до освобождаване на ДНК фрагменти в плазмата, което се асоциира с висок риск от развитие на артериална и/или венозна тромбоза (McMahon et al, 2012). Най-вероятно появата на тези големи ДНК фрагменти се дължи на бързо настъпваща туморна некроза под влияние на противотуморното лечение. Swystun и сътрудници установяват, че цитостатичните лекарства, като доксорубицин, епирубицин и 5-флуорорурацил, често използвани за лечение на малигнени заболявания, индуцират освобождаване на безклетъчна ДНК. При *in vitro* условия е доказано, че единствено антрациклините доксорубицин и епирубицин имат потенциал за модулиране на прокоагулантен фенотип. В своя анализ Swystun описва пациенти с карцином на гърда в ранен стадий, при които 24 часа след проведена химиотерапия е регистрирано наличие на ДНК фрагменти в плазмата. В същото проучване се анализира потенциалната прокоагулантна роля на тези ДНК фрагменти за генериране на тромбин, увеличаване нивата на тромбин-антитромбин комплексите (ТАТ) в плазмата и участие в хемокоагулацията (Swystun LL et al, 2011). В анализ на сравнително голяма пациентска популация с агресивни НХЛ, провеждали лечение с доксорубицин-съдържащи режими, Moser и сътрудници установят, че при половината от пациентите са налице данни за висока сърдечно-съдова смъртност, която свързват с посттерапевтични усложнения и висок тромботичен риск (Moser EC et al, 2005). Такива резултати регистрирахме и в нашата пациентска група - три случая на БТЕ и 2 случая на ИМИ като посттерапевтични усложнения.

При статистическа обработка на данните се доказва силна, правопрпорционална зависимост между изследваните нива на PNC и степента на терапевтичен отговор. По-високи нива на PNC се регистрираха при пациентите с прогресия и рецидив на заболяването. От друга страна се намери обратнопропорционална зависимост между нивата на PNC и едногодишната преживяемост, като високите стойности на PNC

корелират с ниска преживяемост. Не се установи съществена разлика между PNC и R-PI. Въпреки липсата на статистически значима зависимост се наблюдава тенденция болните с високи стойности на PNC да се асоциират с лоша прогноза. Подобни резултати са представени в скорошна публикация, установяваща правопрпорционална зависимост между нивата на изследваните моноцитно-тромбоцитни комплекси (PMC) и ниска обща преживяемост при пациенти с НХЛ (Zhang Y et al, 2020).

По-високата активност на PNC при агресивните лимфоми свързваме с напреднала фаза на заболяването, по-голям туморен обем, по-затегнато клинично протичане, по-висок процент на рефрактерност и по-висок риск от инфекциозни и тромботични усложнения.

При анализ на нашите данни се установи правопрпорционална връзка между тромбоцитния брой и риска от възникване на тромботични усложнения преди започване на противотуморното лечение. Също така подобна връзка се намери между нивата на PNC и наличието на анамнеза за тромбоза преди имуно/химиотерапевтичното начало. В 16.8 % от пациентите тромботичните усложнения се свързват с по-високи PNC. От друга страна се доказва слаба зависимост между PNC и поява на тромботични усложнения след завършило лечение. Пациентите с PBL имат най-висок риск от тромботични събития след провеждане на имуно/химиотерапия.

Получените резултати бихме могли да обясним с патогномоничната роля на полиморфонуклеарните левкоцити в патофизиологията на тромбозата при малигнени хемопатии. Основни фактори като активирани неутрофили и освободените от тях хемокини, проангиогенни молекули, инфламаторни цитокини и прилаганото лечение водят до ендотелна дисфункция, която е свързана с последваща активация на тромбоцити и коагулационна каскада (Falanga A et al, 2000). Полиморфонуклеарните левкоцити освобождават NETs, предизвикват активирание на JAKV617F-STAT сигналния път и развитие на тромбоза (Casini A et al, 2013). Колективно при пациенти с малигнени хемопатии всичко това се асоциира с висок риск от кардиоваскуларни усложнения и мозъчно-съдови инциденти (Demers M et al, 2012).

При изследване на връзката между PNC, тромбоцитния брой и тромботични инциденти, развили се преди започване на лечението се доказва правопрпорционална зависимост. При пациенти с миелопролиферативни неоплазии Jensen и сътр. установяват права корелация между PNC и наличие на висок тромбоцитен брой. В същото проучване доказват, че пациентите, преживяли микроваскуларни нарушения или тромботично събитие, в сравнение с тези без анамнеза за тромбоза, имат по-висок среден процент на PNC и PMC в нестимулирана цяла кръв и по-висок процент на PNC в стимулирана с ADP кръв. Тези данни доказват повишена честота на PNC в нестимулирана кръв при пациенти с МПН, свързана с предишна анамнеза за тромбоза или микроваскуларни нарушения (Jensen M K et al, 2001). В друго проучване от 2002 година, при анализ на група пациенти с МПН се наблюдават по-високи нива на PNC и PMC, в сравнение със здравите контроли. В същото проучване пациентите с анамнеза за венозни или артериални тромбози имат по-високи нива на левкоцитно-тромбоцитни комплекси и тромбоцитни микропартикули в сравнение с контролната група (Villmow T et al, 2002). Изнесените резултати могат да се свържат с прокоагулантната роля на PNC и тяхното участие в процесите на тумор-

индуцирана тромбоза. Следователно, високите нива на PNC се асоциират с висок риск от артериални, венозни и микроваскуларни тромботични събития.

При изследване на връзката между нивата на PNC и нивата на тумор индуцираната патологична цитокинова секреция, в случая определяна чрез IL-10, се намериха значими статистически зависимости. Интерлевкин-10 е имуномодулиращ цитокин, синтезиран от широк спектър клетъчни типове, включително Т и В-лимфоцити, моноцити, макрофаги, НК клетки и неопластични В-лимфоцити (Commins S et al, 2008). IL-10 регулира туморния растеж, участва в клетъчния мотилитет, миграция и възстановяване, както и в придобиване на клетъчна ефекторна функция и е тясно свързан с малигнените хемопатии (Culig Z et al, 2005). Отдавна е известна ролята на възпалителните цитокини в патогенезата на лимфопролиферативните заболявания. От една страна IL-10 стимулира пролиферацията на В-клетките, увеличава експресията на bcl-2 и предпазва туморните клетки от апоптоза чрез секреция на големи количества имуноглобулини от различни класове (Ig G, Ig A и Ig M) (Moore KL et al, 2001). От друга страна инхибиращият ефект на IL-10 върху макрофагите и антиген-специфичен Т-клетъчен отговор допринася за прогресията на лимфома *in vivo* (Del Prete G et al, 1993). Нашите резултати показват три пъти по-високи нива на IL-10 при агресивните лимфоми, в сравнение с тези при индолентните. Подобни данни са докладвани и от други изследователски групи (Gunev N et al, 2009).

По литературни данни IL-10 води до блокиране процеса на образуване на NETs и съответно NETosis (Saitoh T et al, 2012). На база на тези данни ние изследвахме каква би била евентуалната връзка между нивото на PNC и на IL-10 при пациентите с Нехочкинови лимфоми. При проведения от нас анализ се установи, че високите нива на PNC корелират с високи серумни нива на IL-10 при индолентни лимфоми, като израз на активност на лимфома. От друга страна се доказва обратнопропорционална зависимост между изследваните стойности на PNC и серумните нива на IL-10 при агресивните лимфоми. Въпреки липсата на достатъчно проучвания в достъпната литература за подобен корелационен анализ между PNC и IL-10, предполагахме тяхната патофизиологична роля в туморната биология и активност на лимфома.

При анализ на връзката между PNC и степента на костно-мозъчната ангиогенеза, чрез изследване нивото на експресия на VEGF се доказаха значими зависимости. VEGF е един от проангиогенните фактори, който играе важна роля в ангиогенезата при много злокачествени заболявания. Прогностичното значение на ангиогенните фактори при НХЛ е все още дискутабилно, поради хетерогенността на нозологичната група, наличието на различни класификационни системи и методи за анализ.

VEGF играе важна роля в патогенезата на НХЛ чрез два основни механизма на действие. Първият механизъм е експресията от лимфомните клетки на VEGF и VEGF рецептори (VEGFR) чрез автокринна стимулация. Dias и сътрудници установяват, че *in vivo* и *in vitro* лимфомните клетки произвеждат не само VEGF, но също така експресират функционален VEGFR-2 рецептор. Това води до генериране на автокринна бримка и стимулира пролиферацията на туморните клетки (Dias S et al, 2000). Вторият механизъм се характеризира с паракринно влияние на други растежни фактори върху експресията на VEGF (Ruan J et al, 2009). В тази връзка ние изследвахме наличието на корелация между нивото на VEGF и PNC при агресивни и индолентни НХЛ. Установихме високи

нива на VEGF при общата група НХЛ в сравнение със здравите контроли. Въпреки липсата на статистическа разлика в нивата на VEGF според типа на лимфома се наблюдаваха по-високи стойности при пациентите с индолентни НХЛ. Сходни резултати са представени и в литературата, където подобно на нашия анализ не се установява съществена разлика в степента на експресия на VEGF при индолентните и агресивни НХЛ (Ozbudak I. H. et al, 2011).

При по-нататъшен анализ на данните се доказва правопрпорционална зависимост между високите нива на PNC и VEGF при индолентните лимфоми. В нашето проучване установихме, че пациентите с индолентни НХЛ имат над два пъти по-висок риск от костно-мозъчно ангажиране и висока експресия на VEGF, в сравнение с тези с агресивни НХЛ {OR=2.25 (0.801-6.321)}. При агресивните НХЛ се доказва обратнопропорционална зависимост между PNC и нивото на експресия на VEGF. Въз основа на получените резултати можем да обобщим, че експресията на VEGF, като основен маркер за костно-мозъчна ангиогенеза е паралелно свързан процес с клетъчните особености и начина на разпространение на различните видове НХЛ.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Хетерогенността на НХЛ е клинично отражение на различните биологични и хистопатологични характеристики на лимфомния процес. Патогенетичната роля на тромбоцитите и левкоцитите, както и тяхното активиране при НХЛ предстоят да бъдат изследвани задълбочено и детайлно. Необходими са повече проспективни клинични данни с големи пациентски извадки, за да се потвърдят еднородни констатации в бъдещи посоки на научно изследване.

Въз основа на получените в нашето проучване резултати можем да обобщим, че циркулиращите PNC, изследвани при новодиагностицирани пациенти с НХЛ са значими не само като рисков показател, но и като предиктивен маркер за тежестта и еволюцията на НХЛ. Нашето проспективно проучване потвърждава, че НХЛ като група лимфоидни неоплазии, подобно на другите малигнени заболявания, се характеризират с висока активност на PNC, което бихме свързвали с висока степен на агресивност, по-напреднала фаза на заболяването и по висок процент на усложнения.

Като цяло PNC могат да се използват като ранни прогностични показатели при пациентите с НХЛ. Освен това бихме могли да използваме PNC за изграждане на клиничен модел за предварителен скрининг, рисково стратифициране на пациентите и формулиране на персонализирани стратегии за адекватно комбинирано лечение. Имайки предвид патофизиологичното въздействие на NETosis и на PNC, свързваме техните по-високи нива с няколко основни прогностични показатели и маркери за активност на лимфома.

На база на направения анализ се разработи клинично-лабораторен модел на пациенти с НХЛ, демонстриращ взаимовръзката между изследваните нива на PNC, фенотипните характеристики на анализиранията популация и основните биологични белези на НХЛ.

### **При пациенти с НХЛ висока активност на PNC се асоциира с:**

1. Агресивна биология на НХЛ (тежестта на клиничните прояви и по-затегнато клинично протичане)
2. Висок риск спрямо IP1
3. Напреднала фаза на лимфома при поставяне на диагнозата (III и IV стадий)
4. По-ниска едногодишна преживяемост
5. По-висок процент на рецидиви и рефрактерност към лечението с таргетна терапия и химиотерапия
6. По-кратки ремисии
7. Изразена ангиогенеза в костния мозък (в случая определяна чрез VEGF)
8. Високи нива на тумор-индуцирана патологична цитокинова секреция (в случая определяна чрез IL-10)
9. Допълнително пациентите с изразена NETosis и високо ниво на циркулиращи неутрофилно-тромбоцитни комплекси развиват повече тромботични усложнения преди и след имуно/химиотерапевтично лечение.

Високите нива на PNC се свързват с неблагоприятна прогноза и играят ролята на независим негативен прогностичен фактор върху биологичната активност на лимфома. Те моделират клиничното протичане, терапевтичното повлияване и в повечето случаи скъсяват преживяемостта на пациентите.

## ИЗВОДИ

1. Пациентите с агресивни НХЛ имат значимо по-високи нива на PNC in vivo и in vitro след стимулация с ADP и PMA в сравнение с индолентните НХЛ, което се свързва с по-неблагоприятен клиничен ход.
2. Пациентите с малигнени хемопатии, в лицето на индолентни и агресивни НХЛ имат значимо по-високи нива на PNC, IL-10 и VEGF в сравнение със здравите контроли за съответната възраст и пол, изцяло зависещи от лимфопрролиферативния процес.
3. При агресивните лимфоми проведената противотуморна терапия корелира с понижаване на нивата на PNC.
4. Съществува значима и правопрпорционална зависимост между нивото на PNC, абсолютния неутрофилен брой и броя на тромбоцитите, всички те – израз на активност на лимфома.
5. Високите нива на PNC корелират с по-ниски стойности на хемоглобина при пациентите с НХЛ, свързано с необходимост от съпътстващо лечение.
6. Високите нива на PNC модулират клиничната манифестация, рисковия профил, прогнозата и терапевтичния отговор при лимфопрролиферативните неоплазии.
7. Доказа се правопрпорционална зависимост между PNC и тромботичните усложнения при агресивните НХЛ, което поставя въпроса за антитромботична профилактика по време на лечението им.
8. Високите стойности на PNC корелират с по-високи нива на IL-10 и на VEGF при пациентите с индолентни НХЛ, свързано с по-ранната генерализация на туморния процес при тази група лимфоми.
9. Високите нива на PNC, IL-10 и VEGF са независими прогностични фактори в развитието на двете групи НХЛ.

## **ПРИНОСИ**

### **ПРИНОСИ С ОРИГИНАЛЕН ХАРАКТЕР**

1. За първи път в България е проведено изследване за установяване на връзка между нивата на PNC, IL-10 и VEGF при голяма група пациенти с агресивни и индолентни Нехочкинови лимфоми.
2. За първи път в България се сравняват нивата на PNC при пациенти с НХЛ и здрави контроли.
3. За първи път в България се изследва връзката на PNC с клиничко-лабораторни показатели, свързани с развитието на НХЛ.
4. За първи път в България се изследва връзката на PNC с рисковия профил спрямо IPI, стадий на заболяването и прогноза при пациенти с агресивни и индолентни НХЛ.
5. За първи път в България се докладват данни за обратнопропорционална зависимост между високи нива на PNC и едногодишна преживяемост.

### **ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР**

1. Потвърди се правопрпорционалната връзка между високите нива на PNC и клиничната изява, туморната прогресия и терапевтичния отговор при пациенти с НХЛ.
2. Потвърди се ролята на PNC като независим предиктор за поява на тромбоза преди и след проведена имуно/химиотерапия при пациенти с НХЛ.
3. Затвърди се правопрпорционалната връзка между нивата на PNC, IL-10 и VEGF при пациенти с индолентни НХЛ.



## НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА

1. Sheniz Yuzeir and Liana Gercheva. The Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in the Pathogenesis and Complications of Malignant Disease. In: Kumar V, Editor. INFLAMMATION IN THE 21ST CENTURY. London. IntechOpen; October 19th 2020. p. 1-10. DOI: 10.5772/intechopen.93651 – Глава от книга “Inflammation in the 21 st century 2020“
2. Sheniz Yuzeir, Bozhidara Shtereva, Pina Micheva, Liana Gercheva. PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PLATELET- NEUTROPHIL COMPLEXES IN NON-HODGKIN’S LYMPHOMA PATIENTS – American Scientific Journal. 2021; vol.1, (54):14-17, DOI: 10.31618/asj.2707-9864.2021.1.54.127
3. Ш. Юзеир и Л. Герчева. Ролята на NETosis в патофизиологията на усложненията при злокачествени заболявания – Хематология. 2018; 1-2:3-8
4. Sheniz Yuzeir, Trifon Chervenkov, Liana Gercheva. ELEVATED SERUM LEVEL OF INTERLEUKIN-10 IN ADULT NEWLY DIAGNOSED NON-HODGKIN’S LYMPHOMA, Knowledge International Journal. 2021; 48(3): 435 - 439.

## БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение изказвам искрени благодарности на:

- ✓ Научния ми ръководител проф.д-р Лиана Герчева, д.м за ясните и целенасочени напътствия, за търпението, неоченимата подкрепа, доверието и помощта при разработването и анализа на дисертационния труд.
- ✓ Доц. д-р Трифон Червенков, д.м и д-р Божидара Щерева от Лаборатория по Клинична имунология към Катедра по медицинска генетика- за осъществяване на флоуцитометричен анализ на неутрофилно-тромбоцитни комплекси и ELISA изследване на серумните проби
- ✓ Д-р Надежда Стефанова, д.м от Катедра по Обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология-за осъществяване на имунохистохимичните изследвания за VEGF
- ✓ Медицинска сестра Стоянка Петрова – за колекция на пробите на участниците в научното изследване
- ✓ Валентина Великова – за статистическата обработка на резултатите
- ✓ Всички пациенти и здрави доброволци, които дадоха съгласието си за участие в научно-изследователския проект, послужил като основа на настоящия дисертационен труд
- ✓ Семейството ми – за безрезервната любов, доверие и подкрепа