

РЕЗЮМЕ

На научните трудове на доцент д-р Лиана Тодорова Герчева - Кючукова, д.м.

Във връзка с участие в конкурс за заемане на академична длъжност „професор“ по научна специалност „Хематология и преливане на кръв“, обнародван в ДВ, бр. 24 /16.03.2018 г.

За участие в обявения конкурс се представят общо **203** научни труда, от които **63** преди и **140** след присъждане на АД „доцент“. Тяхното разпределение е посочено на таблица № 1.

Таблица № 1 Разпределение на научните трудове на доц. д-р Лиана Герчева преди и след придобиване на академичната длъжност „доцент“

Вид ПУБЛИКАЦИИ	До АД „ДОЦЕНТ“	След АД „ДОЦЕНТ“	ОБЩО
1. Реални публикации			
В чуждестранни научни списания с IF	2	22	24
В чуждестранни списания без IF	4	-	4
В български научни списания	26	32	58
Монографии или публикации, приравнени към монографичен труд	-	1	1
Учебници, учебни помагала, сборници	-	5	5
ОБЩО:	<u>32</u>	<u>60</u>	<u>92</u>
2. Отпечатани резюмета от научни конгреси, конференции, симпозиуми			
В чуждестранни научни списания с IF (с резюмета)	1	33	34
В чуждестранни научни списания (с резюмета)	3	8	11
В национални научни списания (с резюмета)	25	39	64
ОБЩО:	<u>29</u>	<u>80</u>	<u>109</u>
ВСИЧКО:	<u>63</u>	<u>140</u>	<u>203</u>
Научни проекти	1	13	14
Рационализация	1	-	1
Общ IF:	<u>11,632</u>	<u>451,606</u>	<u>463,238</u>
• от публикации в списания с IF	<u>5,350</u>	<u>223,240</u>	<u>228,590</u>
• от абстракти в списания с IF	<u>6,282</u>	<u>228,366</u>	<u>234,648</u>

От общо **203** научни труда, **140 (68,96%)** са изработени след присъждане на АД „Доцент“.

Броят на научните публикации и на трудовете с отпечатани резюмета, както и процентното разпределение според мястото на доц. д-р Лиана Герчева в авторския колектив, са представени на таблица № 2.

Таблица № 2 *Разпределение на публикациите и отпечатаните резюмета според мястото на доц. д-р Лиана Герчева в авторския колектив преди и след заемане на АД „доцент“*

Вид ПУБЛИКАЦИИ	До „ДОЦЕНТ“	СЛЕД „ДОЦЕНТ“	ОБЩО (%)
1. Статии в научни списания			
Единствен и първи автор	16 (51,61%)	9 (16,67%)	25 (29,41%)
Втори автор	10 (32,26%)	10 (18,52%)	20 (23,53%)
Трети и последващ автор	5 (16,13%)	35 (64,81%)	40 (47,06%)
ОБЩО:	31 (100%)	54 (100,0%)	85 (100,%)
2. Монографии, учебници, книги, методични ръководства			
Единствен и първи автор	1	1	2
Втори автор	1	-	1
В общ авторски колектив	1	5	6
ОБЩО:	3	6	9
4. Отпечатани резюмета от конгреси, конференции, симпозиуми			
Единствен и първи автор	1	21	22
Втори автор	1	12	13
Трети и последващ автор	7	47	54
ОБЩО:	29	80	109
ОБЩО ТРУДОВЕ	63	140	203

В голяма част от публикуваните статии са спазени академичните изисквания за поставяне името на научния ръководител като „последен автор“, дал идея и контролирал осъществяването на научната разработка.

Представените за рецензиране научни трудове на доц. д-р Лиана Герчева, осъществени след заемане на АД „доцент“, са насочени в следните **основни клинични направления:**

- Остри и хронични миелопролиферативни неоплазми;
- Остри и хронични лимфопролиферативни неоплазми, вкл. болести на плазматичната редица;
- Бенигнени хематологични заболявания: нарушения в системата на хемостазата, вродени и придобити анемии и др.
- Сборна група „други“ публикации, включваща разнородни научни теми, разработки с различна насоченост: експериментални, патофизиологични, психологически, интердисциплинарни, и др. В този раздел са включени също учебници и медицински ръководства, изготвени в съавторство с други специалисти (таблица № 3).

Таблица № 3 Разпределение на научните трудове по клинични направления

НАПРАВЛЕНИЕ ОСТРИ И ХРОНИЧНИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ	
Публикации:	30/60 (50,00%)
Резюмета:	41/80 (51,25%)
Всичко:	71/140 (50,71%)
НАПРАВЛЕНИЕ ОСТРИ И ХРОНИЧНИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ	
Публикации:	14/60 (23,33%)
Резюмета:	27/80 (33,75%)
Всичко:	41/140 (28,28%)
НАПРАВЛЕНИЕ БЕНИГНЕНИ КРЪВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ	
Публикации:	12/60 (20,00%)
Резюмета:	8/80 (10,00%)
Всичко:	20/140 (14,28%)
НАПРАВЛЕНИЕ „ДРУГИ“ (ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, СОЦИАЛНИ, СТВОЛОВИ КЛЕТКИ, УЧЕБНИЦИ)	
Публикации:	4/60 (6,66%)
Резюмета:	4/80 (5,00%)
Всичко:	8/140 (5,71%)

На конкурса на академичната длъжност „професор“ по научната специалност „Хематология и преливане на кръв“ е представен **1** рецензиран научен труд (монография), **34** рецензирани статии, публикувани в български и международни медицински списания и **103** нерцензирани научни труда, от които **25** публикации и **78** научни съобщения. Най-голям процент от публикациите са свързани с острите и хронични миелопролиферативни неоплазми, където е насочен основният научен интерес на доц. д-р Лиана Герчева (**50,71%**). Научните разработки, свързани с лимфопролиферативните неоплазми съставляват **28,28%**, а тези, насочени към бенигнените кръвни заболявания плюс групата „други“ са общо **19,99%**.

Общият импакт фактор на научните трудове, представен на официална бланка, издадена от Отдел „Наука“ при МУ „Проф. Д-р Параскев Стоянов“, Варна е **451,606**.

Броят на забелязаните цитирания към момента на конкурса е посочен както следва:

- 2478 във Web of Science ;
- 716 цитирания в Scopus и
- 1143 цитирания в Google Scholar (приложена е академична справка)

Специализираните периодични списания на български и английски език, със и без импакт фактор, в които са публикувани научните трудове на доц. д-р Лиана Герчева, д.м. са посочени на таблици № 4 и № 5.

Таблица № 4 Публикации в специализирани, периодични научни списания с импакт фактор (включени са и резюмета, публикувани в списания с импакт фактор)

ПЕРИОДИЧНИ НАУЧНИ СПИСАНИЯ	IF	ПУБЛИКАЦИИ/ АБСТРАКТИ
ЧУЖДЕСТРАННИ СПИСАНИЯ:		
1. Haematologica (Journal Eur Haemat Association)	2014 г. - 5.814; 2015 г. - 6.671; 2016/17г. - 7.702	13
2. Haemophilia	2010 г. - 1.92; 2011 г. - 2.74; 2012 г. - 2.45; 2014 г. - 2.05; 2016 - 1.74	8
3. Blood (Journal American Soc Hematology)	2014 г. - 10.452; 2015 г. - 11.847 2016/17 - 13.164	9
4. Journal of Thrombosis and Haemostasis	2014 г. - 5.720; 2015 г. - 5.565; 2016/17 - 5.287	4
5. Leukemia research	2013 г. - 2.351 2015 - 2.606	3
6. New England J of Medecine	2017 - 72.406	2
7. Lancet haematology	2016 г. - 7.123	1+1 (под печат)
8 American Journal of Hematology	2014 г. - 3.798; 2015 г. - 5.00; 2016/17 - 5.275	1
9. Scandinavian J Clin Lab Inv	2008 г. - 1.756	1
10. Journal of Clinical Oncology	2014 г. - 18.428; 2015 г. - 20.982; 2016/17 - 24.008	1
11. Cancer research	2014 г. - 9.329; 2015 г. - 8.556; 2016/17 - 9.122	1
12. Thrombosis research	2016 г. - 0.46	2
13. Central European J of Medecine	2014 г. - 0.29	2
14. Value in Health	2014 г. - 007	1
15. British J of Haematology	2012 г. - 4.942	2
16. Lancet oncology	2011 - 23.589	1
17. Free radical biology	2002 - 5,532	1
18. European J of Heart Failure	2017 - 6.968	1
ОБЩО:		55

Най-голям е броят на публикациите в Европейския специализиран журнал „Haematologica“ (13), следвани от „Blood“ (основния периодичен журнал на Американската асоциация по хематология) (9) „Haemophilia“ (8), Journal of Thrombosis and Haemostasis (4) и Leukemia research (3).

Таблица № 5 Публикации в български списания

ПЕРИОДИЧНИ НАУЧНИ СПИСАНИЯ	ПУБЛИКАЦИИ/ АБСТРАКТИ
СПИСАНИЯ, ИЗДАВАНИ В БЪЛГАРИЯ НА БЪЛГАРСКИ И АНГЛИЙСКИ ЕЗИК (ВКЛ. С ОТВОРЕН ДОСТЪП):	
1. Клинична и трансфузионна хематология	14
2. Клинична хематология/Хематология	6
3. Scripta scientifica medica	5
4. Journal of IMAV	6
5. Съвременна медицина	1
6. Acta morphologica et anthropologica	1
НЕПЕРИОДИЧНИ ИЗДАНИЯ	
7. Монографии, учебници, ръководства	6
8. Сборници от конгреси/конференции	22
ОБЩО:	<u>61</u>

Методологично научните проучвания са базирани върху възможностите на съвременната диагностика, но също така и върху нестандартни базистни изследвания, осъществявани извън рутинната практика, търсеци патогенетични, патофизиологични и терапевтични зависимости между различни биохимични, генетични, морфологични маркери и протичането на заболяванията. Използвани са общоприети системи за стадиране, оценка на риска и прогнозата при различните нозологични групи.

Научните трудове, осъществени след заемането на академична длъжност „Доцент“, са фокусирани в посочените на таблица № 3 **направления**. Анализът на разработките във всяко едно направление би послужил за обосновка на **научните и практическите приноси**.

1. НАПРАВЛЕНИЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ **ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ОСТРИТЕ И ХРОНИЧНИ** **МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ**

1.1. Проучвания върху патогенетичните механизми при “класическите” хронични миелопролиферативни неоплазми.

В това направление са включени най-иновативните научни разработки на доц. д-р Лиана Герчева, оценяващи патофизиологичната роля на костномозъчната ангиогенеза за неопластичната еволюция на хроничните миелопролиферативни неоплазми (ХМПН). Подробно са проучени корелационната зависимост между степента на ангиогенеза, плазмените нива на проангиогенните стимулатори Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) и Hepatocyte growth factor (HGF), мутационния товар на JAK2^{V617F} и костно-мозъчната фиброза. Особено внимание се обръща на ролята на неоангиогенезата в развитието на отрицателните за

Филадельфийска хромозома хронични миелопролиферативни неоплазми - ФХ(-)ХМПН. По-голямата част от финансирането на проучванията е осъществено чрез средства от спечелени 3 научни проекта.

Веднъж появил се, туморният клон при ФХ(-)ХМПН се нуждае от стимули за развитието и разрастването му. Основният промотор на ангиогенезата е VEGF. Той притежава съдово-пермеабилитетни и ендотелно-клетъчни митогенни свойства, които упражнява чрез своите рецептори: VEGFR-1 и VEGFR-2/KDR. Той е в състояние да стимулира митогенната активност и пролиферацията на ендотелните клетки, да повишава съдовия пермеабилитет и да индуцира вазодилатация на малките кръвоносни съдове.

Другият ангиогенен промотор е HGF, който първоначално е идентифициран като хепатоцитен растежен фактор, но впоследствие е установено че е регулатор на органната реконструкция на много тъкани, участва в канцерогенезата и е индуктор на ангиогенезата.

Въпросът „Каква е ролята на тези два промотора при развитието на МПН“ е движещият стимул за осъществяването на поредица научни изследвания, обединени като „Ангиогенеза и Миелопролиферативни неоплазми“. Част от тези изследвания са обнародвани в дисертационния труд на ръководената от доц. д-р Лиана Герчева докторантка д-р Антонина Ганчева Желязкова, защитен през 2007 г. пред специализиран съвет по гастроентерология, ендокринология, хематология и клинична лаборатория. Финансирането на научните изследвания е базирано на одобрени от фонд „Наука“ при МУ – Варна два научни проекта.

В поредица разработки (15, 18, 40, 97) се доказват повишени плазмени нива на HGF и VEGF при всички ХМПН. Налице е статистически значима междуфакторна зависимост между плазмените нива на двата фактора, което обогатява определянето на ангиогенния профил и ангиогенния потенциал при пациентите с ХМПН. Установява се висока клетъчна експресия на HGF и неговия MET рецептор, със значим потенциращ ефект върху костно-мозъчния ангиогенен потенциал. Доказват се големи вариации в междугруповия анализ, като с най-високи плазмени и клетъчни нива на HGF са пациентите с Хронична миелогенна левкемия (ХМЛ). По-високи плазмени концентрации на HGF спрямо контролната група, са установени също при 76% от пациентите с Първична миелофиброза (ПМФ), при това във всички фази на заболяването. Открива се висока степен на корелация между HGF и броя на левкоцитите в периферната кръв и висока степен на експресия на HGF и MET от гранулоцитните прекурсори и от мегакариоцитите в костния мозък. Значимата степен на корелация между плазмен HGF↔клетъчен HGF↔MET рецептор дава основание да се подозира наличие на взаимовръзка и автокринна стимулация на тази ос на ниво миелоидни клетъчни линии, в частност в гранулоцитните прекурсори и в мегакариоцитите. Увеличени плазмени нива на HGF се установяват също при пациентите с Полицитемия вера (ПВ) и Есенциална тромбоцитемия (ЕТ). Аналогично на ХМЛ и ПМФ, и тук се доказва взаимовръзка между плазмените и клетъчните нива на фактора. Тези данни са в подкрепа на тезата за участието на HGF и рецептора му MET в общия ангиогенен механизъм при ФХ(-)ХМПН. Високата степен на корелация на HGF↔MET веригата с другите ангиогенни параметри: микросъдова гъстота, клетъчни и плазмени VEGF нива, я определя като един от централно действащите механизми в

патогенезта на ХМПН. Проучванията върху ролята на HGF↔MET веригата са едни от първите в световната литература и са цитирани от много автори след 2008 г. (40)

Общите пътища за сигнална трансдукция, която споделят множество ангиогенни молекули, въздействието им върху киназните клетъчни пътища и намесата на други фактори с патофизиологично значение за ХМПН подкрепят тезата, че ангиогенезата е процес, който се активира патологично след първоначалната мутация на един или повече гени и който допринася за нарушаване на цялостния контрол върху миелоидната прогениторна клетка. Активирането на свръхстимулирана ангиогенеза доказва комплексния характер на патогенетичните механизми при ХМПН.

Установява се висока степен на корелационна зависимост между клинично-лабораторните характеристики на пациентите с ХМПН и степента на ангиогенеза в костния мозък. Въз основа на получените резултати се постулира, че плазмените нива на HGF и VEGF отразяват не само ангиогенния потенциал при ХМПН, но също така и клиничната активност на отделната нозологична единица. Логичен извод от всичко това е, че тези показатели биха служили за определяне на клиничния ход, прогнозата и степента на риск при пациентите (4, 15, 18).

Регистрираната висока степен на експресия на клетъчния MET рецептор корелира в значима степен с процента бластни клетки в периферната кръв, а междуфакторния анализ доказва корелация и с плазмените нива на HGF. Този факт колаборира добре със заложената теза за наличие на активна автокринна примка HGF↔MET, експресирана на ниво клонално-клетъчна популация. За първи път се демонстрира на имунохистохимично и на плазмено равнище наличието на взаимозависимост и значимостта ѝ при новодиагностицирани пациенти с хронични миелопролиферативни неоплазии (101).

Чрез имунохистохимично определяне на микросъдовата гъстота е проучена в детайли микроангиогенезата в костния мозък, нейното отношение и значение за развитието на костномозъчна фиброза, характерна за ХМПН (98, 101, 118, 119). Повишената ангиогенна активност потенцира фибротичната дегенерация на костно-мозъчния паренхим.

Проучено е влиянието на степента на ангиогенезата в костния мозък и на туморния мутационен JAK2^{V617F} товар върху склонността към тромбофилия при пациентите с Еритремия вера (ЕВ) и Есенциална тромбоцитемия (ЕТ). Изследвана е връзката между костно-мозъчната ангиогенеза, спленомегалията и честотата на тромботични събития. Установено е, че костно-мозъчната ангиогенеза корелира с мутационния товар и спленомегалията, но не корелира с честотата на ТС. (132). Потвърдена е липсата на корелационна зависимост между степента на мутационния JAK2^{V617F} товар, регистриран чрез qRT-PCR и честотата на тромботичните събития (ТС) при ЕТ и ЕВ. Потвърдена е липсата на корелация между промените в стандартните хематологични показатели, вкл. наличието на левкоцитоза и честотата на ТС. Установена е четирикратно по-голяма честота на ТС при пациенти с носителство на един тромбофилен фактор, а двойното носителство е свързано с нарастване на риска до 7 пъти (132). Изработени са насоки за изследване на факторите за вродена тромбофилия при тези групи болни. Проучванията на описаните по-горе съотношения са намерили място в изготвена

дисертация от д-р Антонио Антонов на тема „Корелационна зависимост между туморната ангиогенеза, мутационния товар и тромбогенния риск при пациенти с есенциална тромбоцитемия и полицитемия вера“, с научен ръководител доц. д-р Лиана Герчева.

Понастоящем при пациенти с ПМФ се изпълнява проект, целящ да доуточни патогенетичните механизми на анемичния синдром, който се появява рано, още в префибротичния стадий на заболяването и не може да се свърже с напреднала фиброза в костния мозък. Установява се, че в случаите с ПМФ желязната хомеостаза е значимо нарушена (34). С цел разгадаване на интимните патофизиологични механизми на потиснатата еритропоеза се проучва ролята на серумните нива на хепцидина и на интерлевкините 6 и 8 върху желязната хомеостаза. Изпълнител на този научен проект е д-р Стела Димитрова, редовен докторант с научен ръководител доц. д-р Лиана Герчева. Първите резултати ще бъдат изнесени на 8-мата Международна конференция по Миелопролиферативни неоплазии (Дъблин Май, 2018), като за целта е изпратено резюме, прието и одобрено за публикация.

Натрупаният изследователски материал върху ролята на ангиогенезата и на JAK2^{V617F} туморния товар върху вариациите в клиничното протичане на ХМПН е намерил място в монографичния труд на доц. д-р Лиана Герчева „Хронични миелопролиферативни неоплазии: „Диагностични, класификационни и терапевтични предизвикателства на отрицателните за Филадельфийска хромозома (и еквивалентите ѝ BCR/ABL) хронични миелопролиферативни неоплазии“ (4), издаден през м. Януари 2016 г. Монографичният труд е рецензиран от двама независими рецензенти. Представено е резюме на монографичния труд на български и английски език.

През 2001 г., заедно с други български хематолози, доц. Д-р Лиана Герчева и нейния екип са приети за членовете на Централно-европейската група за изучаване на левкемиите (CELSG). Това е повод за активно участие в академично, многоцентрово клинично изпитване, изучаващо ролята на приложението на високи дози иматиниб при лекувани преди това пациенти с ХМЛ върху скоростта на постигане на цитогенетичен и дълбочината на молекулярния отговор. Доказва се, че при липса на токсичност и адекватен комплайънс от страна на пациентите, началното лечение с 800 мг. иматиниб довежда до по-бърз и по-добър цитогенетичен отговор. Резултатите от проучването са изнасяни на конгресите на ЕНА и годишните срещи на ASH и са публикувани в няколко международни списания (45, 48, 68, 69).

Водещ клиничен проблем при пациентите с ЕВ са тромботичните усложнения. Доказано е, че при поддържане на хематокрит (Хт) под 0,45 опасността от тях рязко намалява. Ето защо основна цел в лечението на ЕВ е устойчивото потискане на хиперплазиралата еритропоеза в костния мозък. Продължителната терапия изисква подбор на медикамент с висока ефективност и ниска токсичност. Участие в проспективно, многоцентрово, рандомизирано, контролирано клинично изпитване на нова интерферонова молекула – Ropeginterferon Alfa-2b дава възможност да се докаже ефективността на нов тип интерферонова молекула с пролонгирано действие. След анализ на 245 пациента се установява сигнификантно по-дъбър пълен хематологичен отговор (ПХО) 70.5% в рамото с Ropeginterferon Alfa-2b в сравнение с 49.3% от пациентите, лекувани с хидроксиурей (НУ). Данните потвърждават, че тази нова форма на интерфероново лечение има висока и

продължителна ефективност, отлична поносимост и редуцира JAK2 алелния товар у пациентите. Така Ropeginterferon alfa-2b обещава да бъде първото най-ефективно дълготрайно лечение при болни от EB (89, 90, 91).

Изводи от оригиналните проучвания върху ХМПН

Оригиналните проучвания при Еритремия вера доказват следните зависимости:

- Значимо по-високи плазмени нива на VEGF и HGF, свързани с увеличената ангиогенна активност; доказва се значима корелационна връзка между повишените плазмени нива на VEGF, завишения тромбоцитен брой и степента на риск при пациентите, най-вече свързан с тромботични усложнения (15, 97);
- Повишена степен на неоваскуларизация в костния мозък на пациентите, доказваща патологично усилен ангиогенеза (4, 101); повишена експресия на VEGF и рецептора му KDR, както и на HGF и рецептора му MET в гранулоцитните прекурсори и в мегакариоцитите (4, 15, 97, 101); наличие на значима корелационна зависимост между микросъдовата гъстота (МСГ) в костния мозък и клетъчния VEGF; между клетъчния VEGF и рецептора му KDR; между клетъчния HGF и рецептора му MET, всички доказващи активираната неоангиогенеза в костния мозък на пациентите (4, 97, 101);
- Доказана е сигнификантна корелация между JAK2^{V617F} мутационния товар и костно-мозъчната ангиогенна активност (4, 24, 31); установена е зависимост между величината на JAK2^{V617F} мутационния товар и клиничния фенотип на заболяването (4, 29).
- Изследвана е връзката между костно-мозъчната ангиогенеза, спленомегалията и честотата на тромботични събития (37).

Оригиналните проучвания при Есенциална тромбоцитемия доказват следното:

- Плазмените концентрации на HGF са в силна корелационна зависимост с клетъчния HGF в мегакариоцитите и с микросъдовата гъстота в костния мозък; доказва се висока степен на корелация между нивото на плазмения HGF и степента на левкоцитоза, както и по-слаба - между плазмения VEGF и левкоцитния брой (15, 97, 101); доказана е права корелационна зависимост между плазменото ниво на VEGF и степента на риск от тромботични усложнения при ET (4, 15, 97);
- Установява се, че успоредно със степента на неоваскуларизация, в костния мозък е увеличена експресията на клетъчния VEGF и рецептора му KDR, което доказва промотиращата роля на последните в процеса на неоангиогенеза (4, 15, 101); доказана е сигнификантна корелация между JAK2^{V617F} мутационния товар и костно-мозъчната ангиогенна активност (4, 24, 31).
- Прави се връзка между величината на JAK2^{V617F} мутационния товар и клиничния фенотип на заболяването (4, 24, 31).
- Изследвана е връзката между костно-мозъчната ангиогенеза, спленомегалията и честотата на тромботични събития. Доказано е, че костно-мозъчната ангиогенеза

корелира с мутационния товар и спленомегалията, но не корелира с честотата на тромботичните събития (37).

Оригиналните проучвания при Първичната миелофиброза доказват следното:

- В групата на миелопролиферативните неоплазми ПМФ е заболяването с най-изразена патологична ангиогенеза (15, 24, 96, 101). Доказателство за тази теза е високата корелационна зависимост между плазмените концентрации на VEGF и HGF, между клетъчната експресия на VEGF и рецептора му KDR, както и между клетъчната експресия на HGF и рецептора му MET (4, 15, 31, 96, 101);
- Доказва се възходяща динамика в нивото на плазмените концентрации на HGF по време на еволюцията на заболяването, което го прави прогностичен фактор за прогресия (15, 96, 97); чрез междуфакторен анализ се установява силна връзка между плазмените нива на VEGF, неговата клетъчна експресия от миелоидните прекурсори, левкоцитния брой, плазмения HGF и процента на бластите в костния мозък (15, 31, 96, 101) ;
- Доказва се, че от трите класически ФХ(-)МПП при ПМФ микросъдовата гъстота е най-значимо увеличена (24, 101, 118, 119); установява се значима позитивна корелационна връзка между МСГ и степента на фиброза в костния мозък (24, 101, 118);
- Прави се връзка между величината на JAK2^{V617F} мутационния товар и клиничния фенотип на заболяването (29, 116). Доказва се значима позитивна корелационна връзка между величината на МСГ и наличието/големината на JAK2^{V617F} мутационния товар (24);
- Проучва се ролята на нарушения железен метаболизъм в патогенезата на анемичния синдром (проект в развитие) (34).

Оригиналните проучвания при Хроничната миелогенна левкемия доказват следното:

- При всички изследвани пациенти са установяват сигнификантно повишени плазмени нива на VEGF и HG, доказващи повишена проангиогенна активност в хроничния стадий на ХМЛ (4, 18, 40, 98); установява се сигнификантна корелация между нивото на плазмения HGF, степента на левкоцитоза, спленомегалия и процента на миелобласти в периферната кръв (18, 40); доказва се сигнификантна корелационна зависимост между VEGF, тромбоцитния брой, нивата на левкоцитите и на ЛДХ (18, 40);
- Доказва се, че началното лечение с високи дози imatinib (800мг/дн) довежда до по-бърз и значим терапевтичен отговор при третирани преди това с други медикаменти пациенти (45, 48, 68, 69).
- Успоредно с въвеждане на Европейските критерии за отговор към използвания тирозинкиназен инхибитор imatinib, е проследявана динамиката на цитогенетичния отговор в българските центрове. Подробно са проучвани промените в кариотипа на пациентите, като е описан много рядък вариант на ХМЛ – 8p11 миелопролиферативен синдром (14, 16, 19, 94, 102).

1.2.Проучвания върху миелодисплазиите и острите миелоидни левкемии.

В този раздел се акцентира върху клиничната характеристика и преживяемостта на пациентите с Миелодиспластични синдроми (МДС) и Остра миелоидна левкемия (ОМЛ) Проследени са ретроспективно и проспективно досиета на повече от 245 пациента, страдащи от МДС и ОМЛ, лекувани в Клиниката по хематология при МБАЛ „Св. Марина“, Варна. Основните параметри, заложи в клиничните анализи са следните: прогностична стойност на демографските данни, на цитогенетичния профил, на промените в кръвната картина и в костния мозък за протичането на заболяванията, ефекта от лечение им с различни химиотерапевтични протоколи и общата продължителност на живот (**21, 23, 30, 35, 38, 95, 123**).

Цитогенетичният профил при пациентите с МДС и ОМЛ е основен рисков показател. В тази връзка той е проучен при пациенти с вторични, свързани с предшестваща терапия МДС и ОМЛ. Доказва се висок процент на носителство на крайно неблагоприятен кариотип и свързана с това много кратка преживяемост. Отчита се фактът, че липсва модел на най-добро лечение при тази група пациенти (**23, 30, 95**).

Обсъждат се съвременните диагностични и класификационни проблеми при МДС и клиничната приложимост на новите рискови скали, които значително облекчават и правят по-прецизен избора на адекватно лечение (**11, 23, 28, 30, 35**).

В оригинална разработка се доказва, че дендритните клетки, произхождащи от моноцитите при пациентите с МДС са функционално непълноценни. Установяват се значими данни за съществуващи дефектни вътреклетъчни сигнали, провеждани чрез NF- κ B и MAPK, които стоят в основата на функционалните абнормности и липсата на матурация на моноцитно-произхождащите дендритни клетки (MoDC) след въздействие на TNF- α . (**28**).

Обобщават се данни за Хроничната миело-моноцитна левкемия, която заема междинна позиция между МДС и МПН. Споделя се опита на клиниката по хематология, Варна като резултатите потвърждават изразената агресивност на това заболяване и лошата му прогноза. Установява се кратка средна преживяемост, само 21,4 месеца и висок риск от трансформация във вторична остра левкемия при 60% от пациентите, като средната преживяемост след трансформацията е само 2,5 месеца. Обсъжда се ролята на наличието на тризомия 8 като лош прогностичен фактор, довеждащ до висок риск от ранна трансформация в ОМЛ и определящ кратка преживяемост (**35**).

В оригинална разработка е проучено въздействието на антилевкемичната цитотоксична терапия при ОМЛ върху кръвния баланс между антиоксиданти/прооксиданти, като е установено, че мониторирането на malondialdehyde (MDA), пикочната киселина и тоталния плазмен антиоксидативен статус (TAS) е показателно и може да бъде използвано като маркер за увреда в антиоксидантната система. Поставя се въпросът за ползата от антиоксидантно лечение, прилагано след всеки химиотерапевтичен цикъл (**39**).

Изводи от оригиналните проучвания върху МДС и ОМЛ

Оригиналните проучвания при МДС и ОМЛ доказват следното:

- Дендритните клетки при пациентите с МДС, произхождащи от моноцитите, са функционално непълноценни, което се дължи на дефекти в NF-κB и MAPK сигналните пътища (28).
- Подробно е проучена прогностичната стойност на цитогенетичния профил при пациенти с МДС и ОМЛ, като особено внимание се отдава на вторично възникналите МДС и ОМЛ (30, 71, 95).
- Проучени са клинично-лабораторните показатели при пациенти с ХММЛ, като идентифицирането на тризомия 8 се оценява като много лош прогностичен фактор (35).
- Изследвана е подробно ролята на оксидативния стрес, възникващ под влияние на химиотерапевтичните режими, широко използвани при ОМЛ. Поставен е на дискусия въпросът за провеждане на антиоксидираща терапия след всеки химиотерапевтичен цикъл с цел възстановяване на антиоксидативния баланс (39).

II. НАПРАВЛЕНИЕ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗМИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ОСТРИ ЛИМФОБЛАСТНИ ЛЕВКЕМИИ, МАЛИГНЕНИ ЛИМФОМИ И МИЕЛОМНА БОЛЕСТ

Осъществени са обобщени проучвания върху Българския опит при терапевтичното повлияване на различните видове малигнени лимфоми, особено след въвеждането на високотехнологични, таргетни лекарствени средства. Използването в ежедневната практика на Rituximab, а от скоро и на Brentuximab, очакваната ефективност и високата им цена, наложи обединяване на данните на университетските центрове и стриктен анализ на тяхната ефективност (20, 36, 88). В обобщено проучване се обсъжда ролята на проведената индукционна терапия за успеха на автоложната трансплантация на хемопоетични стволови клетки при пациенти с миеломна болест (22).

Непрестанните опити за подобряване на терапевтичните резултати при пациентите с лимфопролиферативни неоплазми намират място и в международни клинични изпитвания, в които доц. д-р Лиана Герчева участва като главен изследовател и като съавтор в публикации (след доказване на необходимия принос). Интерес представляват данните за положителното въздействие на лечение с Bendamustine при пациенти с ХЛЛ, както и ефекта на комбинацията от MabCampath с Fludarabine, чието прилагане води до значително удължаване на свободната от прогресия преживяемост, обща преживяемост и продължителност на получения отговор. Участието на доц. д-р Лиана Герчева като водещ изследовател в клинични изпитвания на нови молекули за лечение на лимфопролиферативните неоплазми е видно от публикации, в които, след доказване на обективните приноси при подготовката на труда, е поканена за съавтор (42, 47, 49, 54, 56, 63, 64, 65, 66, 70, 73).

Значително място в този раздел заемат проучванията, целящи подобряване на терапевтичния изход при хочкиновите и нехочкинови лимфоми (индолентни и агресивни). В академично, многоцентрово проучване на Австрийската група AGMT с включени общо 262 пациента, страдащи от ХЛЛ, се установява, че поддържащото лечение с моноклоналното анти тяло Rituximab значимо удължава свободната от прогресия преживяемост и общата преживяемост при пациентите, постигнали преди това пълен или частичен терапевтичен

отговор. Резултатите от проучването са изнасяни на годишните конгреси на Европейската и Американска хематологични асоциация и впоследствие публикувани (56, 80).

Установява се, че пациентите с активен множествен миелом (ММ) имат намален брой на циркулиращи дендритни клетки в периферната кръв. Предполага се с голяма вероятност, че това се дължи на повишените нива на $\beta 2$ -микроглобулин и на κ -6, два протеина, чиито стойности нарастват при активен ММ. Намалените циркулиращи дендритни клетки се свързват с потискането на имунния отговор и фактически наличието на първичен имуен дефицит при пациентите (26).

Влиянието на конвенционалната химиотерапия върху патобиохимичните процеси при възникване на оксидативен стрес е изследвано при пациенти с остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ). Доказва се, че дори „по-мекото“ лечение при тях води до потискане на физиологичните антиоксидативни процеси и до значим риск от възникване на тъканно увреждане (17).

Понастоящем в проспективно проучване, провеждано в клиниката по хематология се анализира ролята на ^{18}F FDG PET/SCAN при диагностиката, определянето на стадия и оценка на терапевтичния ефект на пациенти с ММ (133).

Изводи от оригиналните проучвания върху острите и хронични лимфопролиферативни неоплазми

Оригиналните проучвания при пациенти с лимфопролиферативните неоплазми доказват следното:

- При пациентите с ММ се установява значима редукция на циркулиращите в периферната кръв дендритни клетки, което е от особено значение за първично потиснатия имуен отговор и клинично изявения имуен дефицит (26).
- Установява се значимо потискане на естествените антиоксидативни механизми по време и след лечение на пациенти с ОЛЛ (17).
- Доказва се, че при пациенти с ХЛЛ след проведено първоначално лечение с комбинация от алкилиращи агенти и Rituximab, следвано от поддържащо такова с Rituximab, прилаган през 3 месеца в продължение на поне 2 години, свободната от прогресия преживяемост, общата преживяемост и продължителността на постигната ремисия са статистически значимо удължени (56, 80).

III. НАПРАВЛЕНИЕ БЕНИГНЕНИ КРЪВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ АНЕМИЧНИ СЪСТОЯНИЯ И НАРУШЕНИЯ В ХЕМОСТАЗАТА

Основният акцент в това направление са проучвания на терапевтичните възможности, целящи подобряването на състоянието на хемостазата и качеството на живот при пациенти с тежка форма на хемофилия А и В. Всички публикации в този раздел са свързани с резултати от клинични изпитвания. В групата клинични изпитвания са включени както такива, изследващи

ефективността на технологично различни, пречистени плазмени антихемофилни фактори, така и най-съвременни възможности за третиране на пациентите чрез рекомбинантна технология, вкл. антихемофилни фактори с пролонгирано действие (43, 44, 46, 50, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 59).

Голям интерес представляват **участията** в последните клинични изпитвания с таргетиране на антитромбина при пациентите с хемофилия А или В чрез RNAi терапия. Fitusiran, който представлява RNA interference (RNAi) осигурява лечение, насочено към antithrombin (кодиран чрез SERPINC1). Доказва се, че понижавайки нивото на антитромбин субкутанното приложение на fitusiran веднаж в месеца повишава тромбиновата генерация, без да причинява продукция на инхибиторни антитела. По този начин чрез революционно нов механизъм на действие се преустановяват хеморагиите в тази група пациенти (59).

От изключителна важност за ежедневната работа е персонализираното профилактично приложение на антихемофилни фактори при пациентите с тежка форма на хемофилия А. В актуално проучване се реализира базирано на фармако-кинетичните особености на пациента персонализиране на профилактиката на кръвоизливите с human-cl rhFVIII. По този начин се прецизира както интервалът между отделните вливания на антихемофилния фактор, така и необходимата индивидуална доза (55).

Интердисциплинарен екип от кардиолози и хематолози доказва, че нивото на NT-proBNP при пациенти с хомозиготна бета таласемия позитивно корелира със степента на увреда на левокамерната функция (92). Това поставя въпроса за ранното проследяване на NT-proBNP с цел уточняване на сърдечния статус на таласемците, още преди клиничната изява на кардиомиопатията, дължаща се на желязно свръхнатрупване в миокарда.

Доц. д-р Лиана Герчева няма оригинални проучвания в този раздел, освен като участник в представените по-горе клинични проучвания.

IV. НАПРАВЛЕНИЕ „ДРУГИ“ ТРУДОВЕ: ПАТОФИЗИОЛОГИЯ, СОЦИАЛНИ, ФАРМАКО-ИКОНОМИЧЕСКИ, СТВОЛОВИ КЛЕТКИ, ИНТЕРЕСНИ СЛУЧАИ, УЧЕБНИЦИ, РЪКОВОДСТВА

Този раздел включва всички публикации, които не могат да се приобщят към вече изброените три направления. Освен участието като съавтор в учебници, справочници, помагала и като автор на обзори, към това направление могат да се отнесат единични публикации, засягащи интересни теми като:

- Психологичните и социални проблеми при пациентите с малигнени хемопатии. Тази публикация е свързана с разработен проект, включващ подготовка на специална анкетна карта и психологически тест, целящи да определят степенно нуждата от социално-психологическа подкрепа на пациентите и техните семейства (13).

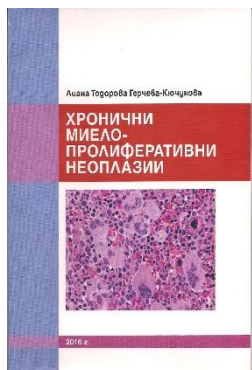
- Участие в международен екип (с Норвежкия раков център) за експериментално добиване на дендритни клетки с вградена mRNA от CD34+ кръвни прогенитори (41).
- Участие в проучване, целящо оценка на ресурсите, необходими за поддържане на доброто състояние на хоспитализирани пациенти с фебрилна неутропения, получена в резултат на предшестваща химиотерапия (79). Такова проучване се осъществява за първи път в България.
- Участие в публикации на необичайни клинични случаи (25, 32).
- Проучване на ефективността от практическото приложение на рекомбинантен човешки гранулоцитен растежен фактор, прилаган в зората на неговото синтезиране (1998 г.) на пациенти с медикаментозна или пост-лъчетерапевтична неутропения и апластична анемия (61)
- Публикации и резюмета на интердисциплинарни теми (92).
- Участия в авторски колективи на учебници и ръководства (1, 2, 3, 5, 6)
- Практически препоръки при лечение на различни усложнения на имunosупресивната терапия (134)
- Препоръки при въвеждане в практиката на нови медикаменти (136, 137, 139, 140)

Резюмета на пълнотекстови публикации на научни трудове, в чийто екип участва доц. д-р Лиана Герчева, д.м.

(подредени са според номерата в приложения списък на цялостната научна продукция на доц. д-р Лиана Герчева, д.м., след придобиване на академичното звание „Доцент“)

№1, №2, №3, №5, №6 са учебници и ръководства и не подлежат на резюмиране.

№4 Л. Герчева (рецензирана монография): *Хронични миелопрлиферативни неоплазии: Диагностични, класификационни и терапевтични предизвикателства на отрицателните за Филадельфийска хромозома (и еквивалентите ѝ BCR/ABL) хронични миелопрлиферативни неоплазии, 2016*



Резюме на монографията

Хроничните миелопролиферативни неоплазии (ХМПН) представляват клонални нарушения на хемопоезата, настъпили в резултат на спонтанни мутации в генома на хемопоетичните стволови клетки. Характеризират се със свръхнатрупване на различни по зрялост клетки от миелоидната редица в костния мозък, периферната кръв и слезката (а в някои случаи и в други тъкани и органи). Неопластичните клетки при ХМПН са добре диференцирани и предимно морфологично зрели. Нарастването на броя им води до поредица от патологични последици с клинично значение: промяна в показателите на кръвната картина, функционални клетъчни нарушения, хемопоеза извън костния мозък (в слезка, черен дроб, лимфни възли, меки тъкани), нарушения в микроциркулацията, промени в хемостазата със склонност към тромбозирание и/или хеморагии и пр.

Филадельфийската хромозома (ФХ), установена при хроничната миеложенна левкемия (ХМЛ) е първият, описан в медицинската наука онкологичен маркер. Неговият молекулярно-биологичен еквивалент – хибридният ген BCR-ABL и съответният хибриден протеин се използват за оценка на терапевтичния отговор към съвременното лечение на това заболяване. Останалите ХМПН не носят в кариотипа си ФХ и класификационно се определят като отрицателни за Филадельфийска хромозома МПН - ФХ(-)ХМПН.

Миелопролиферацията при ФХ(-)ХМПН може да засяга трите основни клетъчни миелоидни линии с преобладаване на едната от тях: еритроидната при полицитемия вера (ПВ), мегакариоцитната/тромбоцитна при есенциалната тромбоцитемия (ЕТ) и мегакариоцитно-гранулоцитната при първична миелофиброза (ПМФ). Тези три нозологични единици са т.нар. „класически“ ФХ(-)ХМПН. Общата им морфологична характеристика включва задължително наличие на следните белези:

1. Клоналност в костния мозък;
2. Обичайно силно изразен костно-мозъчен хиперцелуларитет;
3. Различен по степен атипизъм на мегакариоцитите;
4. Персистираща пролиферация на миелоидните клонове в костния мозък, повишен клетъчен брой в периферната кръв, екстрамедуларна хемопоеза в слезката.

Клиничната картина на ФХ(-)ХМПН най-често включва нарушения на микросъдовата циркулация, тромбози и/или хеморагии, спленомегалия и свързани с нея оплаквания (тежест в лявото подребрие, бързо насищане при хранене, спленални инфаркти и пр.). Специфичните клинични белези се съчетават с неспецифични, конституционални симптоми (немотивирано висока температурата, загуба на телесно тегло, обилни нощни изпотявания, сърбеж по кожата и пр.). Те влошават качеството на живот на пациентите, а наличието им се свързва с по-кратка преживяемост. При различните нозологични единици степента на изява на тези симптоми е различна.

Клиничният ход и прогнозата за усложнения и преживяемост при трите „класически“ ФХ(-)ХМПН зависят от възрастта на пациента при поставяне на диагноза, промените в костния мозък, възможните усложнения (тромбози/хеморагии) и естеството на самата нозологична единица. Средната обща преживяемост е най-кратка при ПМФ.

Патогенезата на ХМПН се свързва с промени в няколко направления:

1. Клоналност

Тя играе ключова роля в патогенезата на ХМПН. Клонални нарушения в стволовите клетки са установени още в най-ранните фази на тяхното развитие, в т.нар. примитивни CD34+, CD38- хемопоетични стволови клетки. (Jamieson 2006) В хода на развитието си ХМПН претърпяват допълнителни мутации, довеждащи до пролиферация на нови патологични клонове, в резултат на което еволюират или до остри левкемии или до миелофиброза. (Sterkers1998) Генетичната база на клоналната хемопоеза при ХМПН е подробно изследвана през последните години.

Независимо от пусковия механизъм, отключващ патологичната клонална хемопоеза и съобразно статуса на противотуморния имунитет, мутиралата стволова клетка се дели, пролиферира и постепенно измества нормалната хемопоеза. Причината за агресивната клонална експанзия са активираният между клетъчни взаимодействия и вътреклетъчни пътища, които ускоряват изпращането на интензивни сигнали до клетъчното ядро. Тези клетъчни пътища могат да бъдат стимулирани от различни молекули, най-вече от такива, притежаващи ензимна активност. В хода на миелопролиферативния процес сигналите за клетъчно деление и пролиферация нарастват, а заедно с това и ензимната активност на патологичния клон. Чрез отделяне на цитокини от микроокръжението в костния мозък се задвижват допълнителни биохимични и патологични механизми, стимулиращи неоангиогенеза, позволяваща на туморната маса да се „храни“ и развива. Ускорените деление и пролиферация на патологичния

клон създават благоприятни условия за поява на нови мутации, променящи поведението на заболяването и превръщащи го в мултиклонално. Тази фаза от развитието на туморния клон винаги е свързана с неговата прогресия.

С въвеждането на нови техники за изследване на човешкия геном (genome sequencing) информацията за генетичните и епигенетични взаимодействия при ХМПН значително се обогати. Изясни се ролята, която мутиралите гени играят в комплексирания патогенеза на различните ХМПН, обособявайки различни отклонения в хемопоезата, различна клинична картина и различна прогноза.

2. Генетични нарушения при хроничните миелопролиферативни неоплазии

Развитието на патологичния клетъчен клон при ХМПН се дължи на генетични мутации. Те водят до специфична патологична активация на протеин тирозин-киназите. Тази активация е резултат от различни по вид и честота молекулярни нарушения в гените, отговарящи за синтеза и активацията на тези ензими.

През последните десетина години при различните ХМПН се откриха нови, повтарящи се генетични мутации, които имат определяща роля за класификацията на отделните нозологични единици. Тяхното присъствие се включва в критериите за диагностика, прогноза, начин на протичане и възможностите за настоящо и бъдещо лечение.

Основна роля в предаването на цитокиновите сигнали от клетъчния им рецептор им към клетъчното ядро имат JAK (Just Another Kinase) тирозин киназите. Janus киназите се намират във всички клетки на бозайниците и са пряко свързани с активацията на цитокиновите рецептори и рецепторите за тирозин кинази. Поредица биохимични и генетични данни показват, че предаването на сигнала от и до цитокиновия рецептор е невъзможно без активацията на JAK киназите. JAK протеините (протеин-кинази) функционират като свързка между сигнализиращите молекули (цитокени, най-вече растежни фактори) и мембранните рецептори на хемопоетичните клетки. Във физиологично състояние JAK2 медираат сигналите за пролиферация и диференциация на клетките от миелоидния ред, постъпващи от хемопоетичните цитокини: еритропоетин (ЕРО), тромбопоетин (ТРО) и гранулоцитен колони-стимулиращ фактор (G-CSF), като подпомагат тяхното пренасяне до клетъчните органели. Мутациите в областта на JAK2 довеждат до нарушена регулация на киназната активност.

Специфичната за ФХ(-)ХМПН **JAK2V617F мутация** е локализирана в псевдокиназния домейн на JAK2 протеина. В зависимост от нивото на експресия и клетъчния тип, JAK2V617F упражнява роля или на активна киназа или на киназа, свръхчувствителна към постъпващите сигнали. (Kralovics 2005)(Levine 2005) След откриването на тази мутация се доказва, че наличието ѝ увеличава еритроидните колонии на пациентите и предизвиква еритропоетин (ЕРО) независим растеж *in vitro*. (Kralovics 2005) По рядко срещана е друг вид JAK2 мутация – в областта на exon 12. Най-общо функционалните последици от появата на JAK2 мутациите върху физиологията на хемопоезата са следните:

- Клетъчните линии, експресиращи JAK2 мутации, могат да функционират независимо от цитокиновото ниво;
- Мишки, трансплантирани с хемопоетични стволови клетки, съдържащи JAK2V617F бързо развиват еритроцитоза и спленомегалия;
- Миши костномозъчни линии, експресиращи JAK2V617F причиняват ПВ подобно състояние с повишени хемоглобин и хематокрит, левкоцитоза, мегакариоцитна хиперплазия, екстрамедуларна хемопоеза, спленомегалия и ретикулинова фиброза в костния мозък. (Tiedt 2008)

Въздействието на JAK2V617F върху вътреклетъчните връзки все още не е напълно изяснено и продължава да бъде обект на множество изследвания. Най-важна ефекторна роля играе **STAT5 транскрипционният фактор**, който има критично значение за патогенезата на ФХ(-)ХМПН. Той активно провежда сигнали до клетъчното ядро и до редица таргетни клетъчни протеини, чиято дизрегулация е свързана с малигнения ход на ФХ(-)ХМПН .

Освен чрез STAT, JAK2V617F упражнява своя патофизиологичен ефект чрез редица други протеини, които довеждат до ремоделиране на ядрения хроматин, трансформация на клетъчните колонии, нарушаване активността

на p53, усилване на цитокиновата свръхчувствителност, усилване на вътреклетъчните оксидативни реакции, активация на протоонкогени и др. (Chen 2014)

Установени са 2 количествени форми на JAK2V617F: хетерозиготна и хомозиготна. В зависимост от това коя форма е налице, фенотипът на заболяването е различен. Механизмът, който води до хомозиготно състояние в повечето случаи е свързан с митотични клетъчни рекомбинации. (Kralovics 2005) Присъствието на JAK2V617F мутацията и различното ниво на мутационния товар (хомозиготен или хетерозиготен) не се отразяват негативно върху преживяемостта при болните с ПВ и ЕТ. Доказа се също, че те не водят до по-честа левкемична трансформация при тези две заболявания.

Мутацията JAK2V617F не се среща в 100% от пациентите с различни ФХ(-)ХМПН. Наблюдават се известни различия в клиничния ход и лабораторната констелация при носителите и неносители на JAK2V617F. Доказано е, че болни с ЕТ и JAK2V617F имат по-високи нива на хематокрит/ хемоглобин и релативно по-нисък тромбоцитен брой в сравнение с JAK2V617F отрицателните пациенти. (Campbell 2005)

Клиничната характеристика на пациентите, носители на JAK2 мутациите е различна при различните „класически“ ФХ(-)ХМПН. Различията в клиничната картина между присъствието и отсъствието на мутациите се проявяват в детайлите, но не и в генералния ход на заболяванията. Например при ЕТ присъствието на JAK2V617F се асоциира с увеличен риск от артериални тромбози и с по-малка вероятност за трансформация в пост-ЕТ миелофиброза. При ПВ по-високият мутационен товар на JAK2V617F определя наличието на по-изразен пруритус и вероятност за фибротична трансформация в костния мозък. (Passamonti 2010) Най-общо, носителството на JAK2V617F се свързва с по-напреднала възраст на пациентите, по-високи нива на хемоглобина, по-изразена левкоцитоза и по-нисък тромбоцитен брой. (Vannichi 2008)

Соматичните мутации *на JAK2 exon 12* представляват друг вариант на свръхактивация на JAK2 зависимата тирозин-киназа. Те се срещат по-рядко от „класическия“ вариант JAK2V617F. Exon 12 в JAK2 е първият кодиращ екзон на автоинхибиращият JH2 псевдокиназен домейн. За разлика от единичната нуклеотидна мутация, явяваща се в exon 14 при JAK2V617F, при exon 12 са идентифицирани 37 мутации: 11 точкови замествания, 20 варианти на делеции и 6 дубликации. (Scott 2011) Мутациите на exon 12 водят до загуба на нормалната автоинхибираща функция на JH2 домейна, до цитокин-независима активация на JAK2 протеина и до активация на задвижващите се от него вътреклетъчни сигнални пътища. Мутацията на exon 12 е описана предимно при пациентите с ПВ и при идиопатична еритроцитоза. (Scott 2007)

Пациентите с JAK2 exon 12 мутации се представят с изолирана еритроцитоза и характерна костномозъчна морфология. При някои нивото на серумния еритропоетин е редуцирано, но може да има такива с нормални еритропоетинови стойности. Кръвните проби на тези пациенти могат да образуват еритроидни колонии, без да са третирани с екзогенен еритропоетин, а при ВаF3 миши линии – без стимулация с interleukin-3. Характерно е, че всички тези колонии са хетерозиготни за JAK2 exon 12 мутации, за разлика от хомозиготните колонии, установими при повечето пациенти с JAK2V617F-позитивна ПВ. Тези колонии проявяват активирана фосфорилация на JAK2 и на екстрацелуларно регулируемите кинази 1 и 2, в сравнение с клетъчни колонии, носещи див („wild-type“) JAK2 или JAK2V617F.

Нови проучвания показват, че при ПВ класическата мутация JAK2V617F се среща в над 95% от случаите, а в останалите JAK2V617F отрицателни случаи (около 5%) е налице мутация на JAK2 exon 12. (Pardarani 2009) За разлика от JAK2V617F, JAK2 exon 12 мутацията е регистрирана рядко при ЕТ и ПМФ. (Dudler 2013)

Мутациите на тромбопоетиновия рецептор, който в литературата се среща още като „myeloproliferative leukemia protein“ (MPL) или CD110 (Cluster of Differentiation 110) са описани при ЕТ и ПМФ. Протеинът MPL се кодира от MPL онкоген. Генът MPL представлява промотор за синтез на тромбопоетин-рецепторен протеин, упражняващ стимулиращо действие върху делението и пролиферацията на хемопоетичните клетки, най-вече на мегакариоцитите. Някои проучвания установяват, че тромбопоетиновият рецептор играе роля и в поддържането на хемопоетичните стволови клетки в състояние на „готовност“ за активация, пролиферация и частична диференциация. Мутациите на MPL (1p34) се откриват в около 4% от пациентите с ЕТ, в 8% при ПМФ и много рядко при ПВ. (Vannuchi 2009)

При ЕТ MPL мутациите се откриват на позиции 505 или 515. Мутациите в exon 10 са най-често MPLW515L/K. (Boyd 2010) Другият вариант - MPLS505N се среща както при херeditарната тромбоцитоза, така и при придобитата (соматична) ЕТ. При ПМФ мутацията на MPL засяга позиция 515 (W515 mutation). Независимо от варианта им MPL мутациите предизвикват постоянна активация на тромбопоетиновия рецептор и свръхчувствителност към цитокинови стимули, в резултат на което в костния мозък се натрупват плеада от тромбоцити-произвеждащи мегакариоцитни клъстери. (Tefferi 2010)

Особен интерес представляват **CALR мутациите** (19p13.2). Calreticulin е протеин с мултифункционално действие, който се свързва с Ca²⁺ йони (втория носител на сигналната трансдукция) и по този начин инактивира тяхното действие. CALR протеинът е локализиран основно в ендоплазматичния ретикулум на клетките от хемопоезата. Наличието на инсерция или делеция в CALR гена, конкретно в exon9 води до цитокин-независим растеж „in vitro“, дължащ се на активация на сигналните проводници (трансдусери), както и на стимулиране на активатора на транскрипцията 5 (STAT5). Мутацията е установена едновременно в две проучвания, използващи различни методи за молекуларен анализ, но показали еднакви резултати. (Klampfl 2013, Nangalia 2013) И двете доказват, че CALR мутацията изпълнява важна роля в патогенезата на ФХ(-)ХМПН. Тези генетични данни определят CALR мутациите като нов, движещ механизъм в патогенезата на ФХ(-)ХМПН, който се явява рано и има патофизиологична роля, подобна на JAK2 и MPL мутациите. Приема се, че CALR регулира STAT сигналния път, а експресията на мутирал CALR може да активира патологично STAT сигналите в хемопоетичните клетки. (Klampfl 2013) CALR мутациите при ФХ(-)ХМПН водят до експресия на протеин, който е загубил свойствата си да се свързва с ендоплазматичния ретикулум. Остава неясно дали това е причина за усилване на STAT сигналите или този протеин има директно потенциращ ефект за нарастването на патологичния клон. Във всички случаи, обаче, при ФХ(-)ХМПН се приема изключително важната роля на CALR мутациите за промяната на JAK-STAT сигнализацията.

Досега са установени някои специфични характеристики на CALR мутациите:

- CALR мутацията се среща изключително и само при пациентите с ЕТ (15-24%) или ПМФ (25-35%) (Nangalia 2013), които са отрицателни за мутациите на JAK2 и MP. Доскоро се считаше, че мутацията не се проявява при ПВ, но публикация на Broseus J et al, 2014 оспори това становище. Авторите описват два случая на ПВ, отрицателни за JAK2V617F и JAK2 exon12, при които CALR мутацията е установена в гранулоцитите на периферната кръв. И в двата случая мутацията се състои от 52-bp делеция.
- Мутациите се явяват винаги в специфичния С-терминален регион на CALR. Установени са 36 типа на инсерции или делеции, променящи С-терминалния регион. (Klampfl 2013)
- CALR мутациите се установяват в пречистени стволови или прогениторни клетки, придобити от пациенти с ФХ(-)ХМПН и остават стабилни по време на еволюцията на заболяването.

Клинични наблюдения установиха, че пациентите с мутирал CALR имат по-нисък риск от тромбози и по-дълга преживяемост в сравнение с тези, при които са установени мутации на JAK2. При пациентите с ЕТ, CALR мутациите, за разлика от JAK2, са асоциирани с по-млада възраст, мъжки пол, по-висок тромбоцитен брой, по-ниско ниво на хемоглобин, по-нисък левкоцитен брой и по-нисък процент на тромбоцитни усложнения. (Klampfl 2013) При ПМФ CALR мутиралите пациенти се характеризират с по-млада възраст, диагностицират се с по-висок тромбоцитен брой, имат по-добър риск и при по-малък процент от тях се установява анемия, левкоцитоза и сплайсеозомни мутации. (Tefferi 2014)

При новодиагностицирани пациенти количественото определяне на мутационното CALR ниво може да се използва за мониториране на ефикасността от лечението и за прогнозиране на развитието на заболяването. (Nangalia 2013; Klampfl 2013; Rumi 2014; Rotunno 2014)

Мутациите TET2 (ten eleven translocation) се срещат както при ХМПН, така и при други хематологични неоплазми. TET2 е активен тумор-супресорен ген, локализиран върху хромозома 4q24. Експерименти с NOD-SCID мишки показват, че TET2 се включва във възстановителните пътища, свързани с хемопоетичната трансформация. (Delhommeau 2009) При ФХ(-)ХМПН мутациите TET2 обичайно се появяват преди или след придобиването на JAK2 мутация, но могат да се проявят и като самостоятелно явление. В голямо проучване

Schaub et al. през 2010 г. установяват TET2 мутации в 16% от пациентите с ПВ, в 5% при ЕТ, в 17% при ПМФ; в по 14% при пост-ПВ миелофиброза и пост-ЕТ миелофиброза и в 17% при пациенти с ФХ(-)ХМПН в бластна трансформация. (Ortmann 2015)

Последни данни доказват, че молекулярния и генетичен анализи имат важна роля в диагностичното и прогностично позициониране при ФХ(-)ХМПН, при определянето на риска от тромбози, поведението на стволовите и прогениторните клетки, както и клоналната еволюция на отделните заболявания. В проучване, публикувано през 2015 г. СА Ortmann и сътр. използват генотипни хемопоеични колонии като чрез метода „next generation sequencing“ скринират 246 пациента, носители на мутацията JAK2V617F, измежду които търсят наличие на TET2 мутации. Доказват, че за клиничното представяне на различните видове ФХ(-)ХМПН, както и за ефикасността от провежданото лечение значение има последователността на поява на мутациите. Мутациите, както на TET2 така и на JAK2 могат да се появят като първо явление при всички три „класически“ ФХ(-)ХМПН. Установява се, че при пациентите, при които TET2 мутацията се явява първа и предшества JAK2V617F (т.нар. „TET2 first patients“) е по вероятно да се развие ЕТ. Обратно, при пациенти, при които JAK2 мутацията се явява първа („JAK2 first patients“) е по вероятно да се развие ПВ. Доказва се още, че появата на TET2 мутацията може да се случи с еднаква вероятност както при хомозиготно, така и при хетерозиготно предшествашо носителство на JAK2V617F. Също така, последователността на появата на JAK2 и TET2 мутациите може да окаже въздействие върху протичането, прогнозата на заболяването и да определи очаквания отговор към лечението. (Ortmann 2015)

В популацията „TET2 first“ се установяват следните зависимости: пациентите са по-възрастни при поставяне на диагнозата, мутационният товар е по нисък (по-малък брой хомозиготи), наблюдава се по-нисък риск от тромбози. Обратно при „JAK2 first“ популацията възрастта на пациентите при поставяне на диагнозата е по-млада, установяват се много хомозиготни субклонове и е налице повишен риск от тромбози.

Измежду новооткритите генетични мутации при ФХ(-)ХМПН с най-голямо клинично значение са ASXL1, SRSF2 и EZH2, всички доказано асоциирани с по-лоша прогноза. (Brecqueville 2014; Brecqueville 2012; Guglielmelli 2011) В проучване на 879 пациента с ПМФ ясно се демонстрира прогностичното значение на тези 3 мутации спрямо вероятността за трансформация към остра миелоидна левкемия (ОМЛ) и преждевременна смърт. (Vannucchi 2013) Мутациите на епигенетичния модулатор ASXL1 (additional sex combs like transcriptional regulator 1) се установява в 2 - 5% от пациентите с ПВ, в 5 – 8% от тези с ЕТ и в 7 – 17% при ПМФ. ASXL1 се явява критичен фактор за функцията на миелоидните хемопоеични прогенитори. Генът е локализиран върху дългото рамо на хромозома 20 (20q11). Делецията на ASXL1 довежда до промени в костния мозък в насока към панцитопения или дисплазия. (Abdel-Wahab 2011) Мутациите ASXL1 имат доказан негативен ефект върху преживяемостта на пациентите и голямо значение при стратификация на риска. (Nangalia 2013) Те се оказват независим прогностичен рисков фактор за ранна смъртност и трансформация в ОМЛ. Предложена е международна молекулярна прогностична скала, основана на комбинирането на клиничните симптоми и наличните мутации при пациенти с ФХ(-)ХМПН. (Vannucchi 2013) Счита се, че голяма част от новооткритите генетични мутации при ФХ(-)ХМПН в най-близко бъдеще ще бъдат включени в ревизирана класификация на СЗО.

Мутациите на EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) също имат прогностично значение при ФХ(-)ХМПН. Enhancer of zeste homolog 2 е локализиран върху 7q36.1 и кодира каталитична субединица от polycomb repressive complex 2 (PRC2), който представлява хистон H3 лизин 27 метилтрансфераза. Последната във физиологична среда подпомага поддържането и възстановяването на стволовите клетки. Тази си функция изпълнява чрез епигенетично потискане на гените, включени в апоптотичните процеси. Счита се, че при МПН мутацията EZH2 представлява „loss-of-function“ тип мутация. (Ernst 2010) Подозира се, че EZH2 притежава онкогенна активност. Установена е различна честота на мутациите на EZH2 при ХМПН и миелодиспластичните синдроми (МДС), като те са най-чести ПМФ – в 13% от случаите. (Ernst 2010)

Мутациите IDH1 и IDH2 са т.нар. „gain-of-function“ мутации. Те засягат гените, кодиращи isocitrate dehydrogenase 1 и 2. Събраните досега данни за ролята на тези мутации показват, че те са по-характерни за фазите на трансформация на ФХ(-)ХМПН, отколкото за хроничните фази. Голямо проучване на 1473 пациента с МПН установява IDH1 и IDH2 мутации само в 1.9% при ПВ, 0.8% при ЕТ и в 4.2% при ПМФ. В бластната фаза на ХМПН, обаче, честотата им нараства до 21.6%. Нещо повече, при бластна трансформация присъствието на IDH1 и IDH2 мутации бележи лоша прогноза относно преживяемостта на пациентите. (Tefferi 2012)

Честотата на разпространение на различните генетични мутации при отделните нозологични единици в групата на ФХ(-)ХМПН се движи в широки граници. Различна е и тяхната значимост като прогностични фактори за прогресия и изход на заболяванията. Мутациите TET2, IDH, ASXL1 и DNMT3A се срещат рядко при пациентите с ПВ и ЕТ. (Lundberg 2014)

Молекулярният анализ на повтарящи се, мутирани гени, включващ JAK2, MPL и CALR е от изключителна важност при съвременното класифициране на ФХ(-)ХМПН, за определянето на прогнозата, риска и начина на лечението им. На този етап най-добре са проучени генните мутации, които променят физиологичното развитие на хемопоезата чрез активиране на STAT 3/5 клетъчните пътища.

Понастоящем се разработват различни таргетни молекули с терапевтично значение спрямо някои от тези придобити мутации, с оглед предклинични, ранни и напреднали клинични изпитвания за оценяване на ефективността им като лечебни средства и безопасността при прилагането им. Ноооткритите генетичните мутации при ХМПН нарастват с всяка изминала година тъй като съвременните методи за генетичен анализ позволяват откриването на все повече нови аномалии, с различно прогностично значение и различна честота.

От събраните досега данни за различните мутации, въввлечени в патогенезата и патофизиологията на ФХ(-)ХМПН, и тяхното клинично значение може да се оформи следният модел за развитие на ХМПН:

- Пусков фактор, предизвикващ мутация (неизвестен???)
- Генетични промени, водещи до клоналност (del20q, del13q, TET2 мутации)
- Мутации, предизвикващи заболяване (JAK2, MPL, CALR)
- Мутации, предизвикващи прогресия (TP53/MDM4, PRC2, DNMT3A, ASXL1, CUX1, IKZ1). (Kralovics 2015)

3. Сигнални пътища, въввлечени в патогенезата на ХМПН

Благодарение на усъвършенстваните базисни научни изследвания се установяват все повече сигнални пътища, въввлечени в патогенезата на ХМПН. При свързване с хомодимерните цитокинови рецептори, JAK2V617F индуцира постоянни сигнали чрез STAT5, STAT3, RAS-MAPK и PI-3'K-Akt вътреклетъчните пътища. Всички те регулират генната експресия и спомагат за преживяването, пролиферацията и диференциацията на комитираните миелоидни прогенитори. Пусковите STAT5 и STAT3 сигнали са много характерни за миелоидните клетки при ХМПН.

Активирането на JAK2 индуцира транскрипцията също и на негативни регулатори на вътреклетъчните пътища като CIS (cytokine-inducible SH2) и SOCS протеини, напр. SOCS3. Последните, обаче, не могат да блокират пусковия сигнал от мутирания JAK2. От друга страна LNK упражнява негативен ефект върху JAK2V617F сигнализацията и допринася за експресията на различните фенотипи при ФХ(-)ХМПН. LNK мутациите се срещат рядко и са установени само при единични пациенти.

Активацията на RAS сигналния път се противодейства от NF1 (neurofibromatosis 1), протеин, който стимулира активността на GTPase на RAS и който липсва при малък процент от пациентите с ФХ(-)МПН.

4. Роля на ангиогенезата за развитието и прогресията на ХМПН

Веднъж появил се, туморният клон при ФХ(-)ХМПН се нуждае от стимули за развитие и разрастване. Тези стимули от една страна, са инкорпорирани в потенциалната енергия на моноклоналната клетъчна линия, която определя вида на неоплазията. От друга страна в туморогенезата се намесват сложни молекулярно-клетъчни взаимодействия, задвижвани от цитокини, които се секретират от околната среда (стромалните елементи в костния мозък и костномозъчната ниша), чиято единствена цел е да спомогне за оцеляването и развитието на клоналния процес. Един от основните фактори за поддържането на клоналната туморогенеза, за развитието ѝ, ускорената, агресивна пролиферация и разширяване на нейния обхват в костния мозък, е **ангиогенезата**.

Ангиогенезата е процес на формиране на нови кръвоносни съдове от вече съществуващи такива, който зависи от баланса между ангиогенните стимулатори и ангиогенните инхибитори. Ако действието на проангиогенните фактори преодолее стопиращите ефекти на ендогенните ангиогенни инхибитори, започва процес на неоваскуларизация. Ангиогенезата е съвкупност от биохимични и биосинтетични последователности, без които

животът е невъзможен. Тя упражнява физиологична роля по време на ембриогенезата, а постнатално участва в процесите на женския репродуктивен цикъл и в раневото заздравяване.

Ролята на ангиогенезата като задължително патофизиологично звено е доказана при развитието и метастазирането на солидните тумори. След придобиване на ангиогенен фенотип, туморните клетки претърпяват ангиогенно “превключване”, което се медира от свръхекспресия на проангиогенни фактори, пролиферация на клетки (макрофаги, ендотелни) и мобилизация на ангиогенни протеини (матриксни металопротеинази) от екстрацелуларния матрикс. Сред най-мощните стимулатори на ангиогенезата са хипоксията, активацията на онкогени (напр. *gas*-онкогена) и/или инактивацията на тумор-супресиращите гени *p53*. Установено е, че туморната ангиогенеза се стимулира от *JAK2/STAT3* сигналния път, като активацията на *STAT3* се счита за критична. (Zhaо 2011)

Основният промотор на ангиогенезата е vascular endothelial growth factor (VEGF). Той притежава съдово-пермеабилитетни и ендотелно-клетъчни митогенни свойства, които упражнява чрез основните си рецептори: *VEGFR-1* и *VEGFR-2/KDR*. Той е в състояние да стимулира митогенната активност и пролиферацията на ендотелни клетки, да повишава съдовия пермеабилитет и да индуцира вазодилатация на малките кръвоносни съдове. (Giles 2001)

Hepatocyte growth factor (HGF) е първоначално идентифициран като хепатоцитен растежен фактор, но впоследствие са установени и други негови свойства: регулатор на органната реконструкция на много тъкани, участие в канцерогенезата и индуктор на ангиогенезата. В хемопоетичната каскадна система той стимулира растежа на хемопоетичните прогнатори. В наши предишни проучвания (А.Желязкова 2006) установихме увеличени плазмени нива на HGF при всички ХМПН. От една страна се доказва висока междуфакторна зависимост между плазмените нива на VEGF и HGF, което обогати определянето на ангиогенния профил и ангиогенния потенциал при пациентите с ХМПН. От друга страна беше установена висока клетъчна експресия на HGF и неговия MET рецептор, със значим потенциращ ефект върху костно-мозъчния ангиогенен потенциал. Открихме големи вариации в междугруповия анализ, като с най-високи плазмени и клетъчни нива на HGF бяха пациентите с ХМЛ.

По-високи плазмени концентрации на HGF спрямо контролната група, бяха доказани при 76% от пациентите с ПМФ, при това във всички фази на заболяването. Освен намерената висока степен на корелация на HGF с броя на левкоцитите в периферната кръв, беше установена висока степен на експресия на HGF и MET от гранулоцитните прекурсори, и от мегакариоцитите. Значимата степен на корелация между плазмен HGF↔клетъчен HGF↔MET рецептора ни даде основание да заподозрем наличие на взаимовръзка и автокринна стимулация на тази ос на ниво миелоидни клетъчни линии, в частност в гранулоцитните прекурсори и в мегакариоцитите. Увеличени плазмени нива на HGF бяха установени също при пациентите с ПВ и ЕТ. Аналогично на ХМЛ и ПМФ, и тук бе налице взаимовръзка между плазмените и клетъчните му нива. Тези данни са в подкрепа на тезата за участието на HGF и рецептора му MET, както и за HGF↔MET връзката в общия ангиогенен механизъм при ФХ(-)ХМПН. Високата степен на корелация на HGF↔MET веригата с другите ангиогенни параметри: микросъдова гъстота, клетъчни и плазмени VEGF нива, я определя като един от централно действащите механизми в патогенезата на ХМПН. Регистрираната висока степен на експресия на клетъчния MET рецептор корелира в значима степен с процента на бласти в периферната кръв, а както установихме от междуфакторния анализ, и с плазмените нива на HGF. Този факт колаборира добре със заложената теза за наличие на активна автокринна примка HGF↔MET, експресирана на ниво клонално-клетъчна популация. За първи път в нашето проучване беше демонстрирано на имунохистохимично и на плазмено равнище наличието на тази взаимозависимост и значимостта ѝ при новодиагностицирани пациенти с хронични миелопролиферативни неоплазии. (Желязкова, Герчева 2003)

Общите пътища за сигнална трансдукция, която споделят множество ангиогенни молекули, въздействието им върху киназните клетъчни пътища и намесата на други фактори с патофизиологично значение за ХМПН подкрепят тезата, че ангиогенезата е процес, който се активира патологично след първоначалната мутация на един или повече гени и който допринася за нарушаване на цялостния контрол върху миелоидната прогениторна клетка. Активирането на процеса на свръхстимулирана ангиогенеза допринася за комплексния характер на патогенетичните механизми при ХМПН.

В същата серия от наши проучвания установихме висока степен на корелационна зависимост между клинично-лабораторните характеристики при пациентите с ХМПН и степента на ангиогенеза в костния мозък. Въз основа

на получените резултати считаме, че плазмените нива на HGF и VEGF отразяват не само ангиогенния потенциал при ХМПН, но също така и клиничната активност на отделната нозологична единица.

Роля в развитието на ангиогенезата имат и **микро РНК-и** (micro RNAs), които са установени в микроваскуларни ендотелни клетки, съществуващи в обща култура с туморни клетки. Повечето микро РНК-и са разположени в туморните клетки, пакетирани в малки мехурчета. От там те директно се насочват към заобикалящите ги ендотелни клетки. Най-голямо въздействие върху ендотелните клетки е оказала miR-9, предизвикваща значими морфологични промени в тяхна клетъчна култура. Zhuang и сътр. през 2012 г. установяват, че екзогенната miR-9 ефективно редуцира нивото на SOCS5, което води до активация на JAK2-STAT клетъчния път. Така получената сигнална каскада стимулира миграцията на ендотелните клетки и туморната ангиогенеза. (Zhuang 2012)

Имунохистохимичен показател за активирана ангиогенеза в костния мозък е изследването на микросъдовата гъстота (МСГ) в проби от трепанобиопсии при ХМПН. В проучване на 115 пациента с ФХ(-)ХМПН е доказано, че МСГ при пациентите с ПМФ в префибротична фаза е значимо по-висока в сравнение с тази при ПВ и ЕТ. При пациентите с пост-ПВ и пост-ЕТ миелофиброза МСГ е сигнификантно по-голяма от тази при ПВ и ЕТ. В същото време и в същото проучване е установено, че JAK2V617F мутационният товар, серумната лактатдехидрогеназа (ЛДХ) и степента на анемичния синдром корелират независимо с МСГ в костния мозък. (Boveri 2007) Имунохистохимични проучвания на МСГ в костния мозък при пациенти с ФХ(-)ХМПН чрез експресията на VEGF са провели Medinger и сътр. през 2009 г. Получените данни авторите са сравнявали с биологичната изява на заболяванията, клиничната картина и JAK2V617F мутационния статус на пациентите. Установили са значимо повишена МСГ и увеличена експресия на VEGF при пациентите с ХМПН в сравнение с контролите. Степента на описаните промени в нивата на МСГ и VEGF са различни при различните нозологични единици, като най-висока са установени при ПМФ (ПМФ > ПВ > МДС/МПН > ЕТ). (М.Цанева, 2012)

5. Роля на променените цитокинови взаимодействия при ФХ(-)ХМПН

Съществуват данни за нарушени взаимодействия между цитокините в костния мозък при пациентите с ФХ(-)ХМПН (**нарушена цитокинова мрежа**). Тези промени се наблюдават както в хемопоеична паренхимна част, така и в костномозъчното микроокръжение: костномозъчна строма и костномозъчните ниши. Счита се, че онкогенните сигнали довеждат до повишена секреция на цитокини и променят взаимодействията между неопластичните клетки и костномозъчната строма. (Tefferi 2011)

При всички „класически“ ФХ(-)ХМПН са установени **повишени нива на инфламаторни цитокини**. (Panteli 2005, Hasselbalch 2013). Това важи най-силно за ПМФ, при която пациентите имат най-интензивни конституционални симптоми, дължащи се на свръхсекреция на инфламаторни цитокини и нарушено равновесие вътре в цитокиновата мрежа. Tefferi et al. 2011 г. са изследвали прогностичното значение на цитокините при ПМФ чрез определяне на серумните нива на цитокинов панел, включващ IL-1 β , IL-1RA, IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, TNF- α , granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), interferon α (IFN- α), macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , HGF, IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10), monokine induced by IFN- γ (MIG), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) и VEGF. Доказва се повишаване нивата на тези цитокини, изразено най-вече при пациентите с ПМФ. Допълнително се установява, че нивата на IL-8, IL-2R, IL-12 и IL-15 представляват **независим прогностичен фактор** за преживяемост при болните от ПМФ (Tefferi 2011). Това показва, че тежестта на протичане при ФХ(-)ХМПН не се определя само от големината на мутиралния миелоиден клон, но и от вторичните инфламаторни процеси, дължащи се на аберантната цитокинова секреция в костния мозък и промените в костномозъчното микроокръжение. Доказано е, че най-голямо значение за промяната на костномозъчното микроокръжение при ХМПН имат FGF-b, IL-8, VEGF, HGF, PDGFR, TGF- β , TNF- α и OSM. (Raimondo 2001)

Нивото на **фибробластния растежен фактор (FGF-b)** в серума на пациентите с ХМПН е значително повишено при всички „класически“ ФХ(-)ХМПН. (Musolino 2002) Най-голяма серумна концентрация има при пациенти с изразена костномозъчна фиброза. Установено е още, че FGF-b промотира фибробластна пролиферация чрез активиране на MAPK сигналния път. (Lev 2005)

Повишените серумни нива на IL-8, регистрирани при пациентите с ФХ(-)ХМПН са отговорни за доказаното in vitro усилване на формирането на еритроцитни колонии. (Corre-Buscail 2005)

Увеличеното ниво на TNF- α довежда до потискане на активното действие на ЕРО и G-CSF, което обяснява възможния и доказан супресивен ефект на TNF- α върху нормалната хемопоеза. (Raimondo 2001)

Проучена е *JAK2V617F*-медираната генетична експресия и връзката ѝ с IL-6 и с IL-6 фамилните молекули, поспециално с фактора Oncostatin M (OSM) и инхибиращия левкемията фактор (leukemia inhibitory factor-LIF). Установен е стимулиращ ефект на *JAK2V617F* мутацията върху производството на IL-6, IL-8 и VEGF. (Hoermann 2012)
Имуно-хистохимичен анализ на костен мозък при пациенти с ПМФ, ЕТ и ПВ показва положително оцветяване на мегакариоцитите, ендотелиалните клетки и миелоидните прогенитори за OSM, докато еритроидните клетки са били отрицателни. Тази находка корелира с повишената експресия на фосфорилиран STAT5, молекула, идентифицирана като основен сигнален път при онкоген зависимата експресия на OSM. (Hoermann 2012)

6. Костномозъчна фиброза

Костномозъчната фиброза е един от основните патоморфологични белези при ХМПН. Процесът на фиброзиране включва активното участие на локалните фибробласти и инфилтриралите костния мозък левкоцити, които поддържат постоянни механизми на възпаление. В патоморфологичния фибротичен процес се включва също активираната пролиферация на клетки, притежаващи миофибробластен фенотип. Патологичните механизми, предизвикващи и подпомагащи развитието на костномозъчна фиброза при ХМПН все още задълбочено се изучават и детайлно изследват. Включените във фибротичната генеза клетки секретират различни растежни фактори, протеолитични ензими, проангиогенни молекули и фиброгенни цитокини, които водят до увеличено натрупване на съединително-тъканни елементи в костния мозък. Това довежда до прогресивното **ремоделиране**, както на костномозъчния паренхим, така и на неговото микрообкръжение, като на финала се достига до различна по степен деструкция на архитектурата на физиологичната костномозъчна тъкан. (Le Bousse-Kerdiles 2008)

Нови данни показват, че интензитета на ретикулиновото оцветяване в костния мозък по-често не показва корелация с тежестта на протичането на ФХ(-)ХМПН. В същото време наличието на **тип 1 колаген**, което се установява чрез оцветяване с trichrome е най-често асоциирано с по-тежко протичане и с по-лоша прогноза. Доскоро се приемаше, че увеличаването на костномозъчните стромални фибри довежда до абнормна хемопоеза, но скорошни проучвания внушават точно обратното, т.е., че нарастването на стромалните фибри е в резултат на подлежащи паренхимни клетъчни нарушения. Установено е, че увеличената депозиция на костномозъчни стромални фибри се медира от transforming growth factor-beta (TGF-β) и други цитокини, отделяни от мегакариоцитите. В сложния процес на постепенно развиващата се костномозъчна фиброза при ФХ(-)ХМПН се включват още редица молекули и цитокини, отделяни също и от други клетки на костномозъчния паренхим и строма. (Kuter 2007) В тази връзка костномозъчна фиброза при пациентите с ФХ(-)ХМПН е многофакторен процес, който протича с различна тежест и различна скорост.

При пациентите с ПВ и ЕТ е доказано, че наличието на ретикулиновата фиброза по време на поставяне на диагнозата се асоциира с повишен риск от трансформация към пост-ПВ или пост ЕТ миелофиброза. (Pozdnyakova 2015)

7. Роля на нарушенията в хемостазата

Нарушенията в хемостазата при ФХ(-)ХМПН са един от основните патогенетични механизми, довеждащи до тежки усложнения в клиничното протичане и до смъртен изход. Хемостазните процеси се влияят както от тромбоцитния, левкоцитния и еритроцитен брой, така и от **качествените промени** в клетките, съпътстващи всяка нозологична единица и дължащи се на нейната клонална същност и небалансирана пролиферация.

Клиничната манифестация на коагулационните нарушения е хетерогенна и се представя в **3 насоки**: хеморагии, тромбози и нарушения в микроциркулацията. Възможни са различни комбинации между тези патологични процеса, включително и едновременната им изява.

Критичен праг за поява на едно или на няколко от тези нарушения е **величината на тромбоцитния брой**. Парадоксално, но доказано е, че свръхвисокият тромбоцитен брой предопределя склонност към хеморагии и не показва почти никакво отношение към тромбозите и микроциркулационните нарушения. (Falanga 2007)

Тромбоцитен брой ($\times 10^9/l$)	Тромбози	Хеморагии	Нарушения в микроциркулацията
<1000	++	-	+++
1000 - 2000	+++	+++	+++
>2000	-	++++	-

Патогенезата на тромбозите при ФХ(-)ХМПН е комплексна и включва редица клинични фактори: възраст, анамнеза за предшествващи тромбози, наднормено тегло, хипертония, захарен диабет, хиперхолестеролемия и др. Самостоятелна роля играят тромбоцитният брой, величината на левкоцитите, еритроцитите и функционалното състояние на ендотелните клетки на кръвоносните съдове.

7.1. Роля на тромбоцитния брой и тромбоцитния статус

Доскоро тромботичните инциденти при ХМПН се свързваха с три вида патологични промени, настъпващи в тромбоцитите: нарушено качество на мембранните адхезионни молекули, придобити промени в тромбоцитните гранули („празен“ тромбоцитен пул) и дефектен тромбоцитен метаболизъм. По-нови проучвания показват, че при пациенти с ФХ(-)ХМПН тромбоцитите циркулират в постоянен статус на активация, който се свързва със свръхекспресията на повърхностен P-selectin и тъканен фактор (tissue factor).^(Falanga 2007) Усилената тромбоцитна активация in vivo се доказва чрез повишените нива на продукти, отделяни в плазмата (b-thromboglobulin и platelet factor 4) и в урината (thromboxaneA2, метаболитите: 11-dehydro-TxB2 и 2,3-dinor-TxB2).^(Jensen 2000)

Активираният тромбоцит осигурява необходимата каталитична повърхност за генериране на тромбин, който по-нататък автономно стимулира тяхната собствена активация и агрегация. При пациентите с ЕТ и ПВ, индуцираната от тромбоцитите тромбинова генерация е силно увеличена и е продукт на тромбоцитната активация. Това се установява най-вече при носителите на мутацията *JAK2V617F*. Доказано е, че в тези случаи по-висока от обичайната хемостатична активност проявяват дори новообразуваните тромбоцити (т.нар. „reticulated platelets“).^(Panova-Noeva 2011)

7.2. Роля на еритроцитите

При пациентите с ПВ увеличените нива на хематокрита (НСТ) играят значима роля за перманентното състояние на хиперкоагулация. Повишеният NST може да увеличи тромботичния риск по няколко възможни патофизиологични пътя. Най-значимо е въздействието на хипервискозитета, затрудняващ предимно венозния кръвоток. Хипервискозитетът и в резултат на него забавеният кръвоток, притискат и „преместват“ тромбоцитите към съдовата стена. По този начин се усилват взаимовръзките тромбоцит-тромбоцит и тромбоцит-ендотел, вследствие на което се потенцира тромбоцитната активация. Нещо повече, при ЕТ и ПВ са доказани промени в клетъчната мембрана и във вътреклетъчното съдържание на еритроцитите, довеждащи до поява на еритроцитни агрегати и нарушен кръвен ток. Еритроцитите при ПВ проявяват ненормална, патологично усилена склонност за адхезия към субендотелния протеин laminin, дължаща се на фосфорилация на Lu/VCAM, която е пряко свързана и предизвикана от *JAK2V617F* сигналните пътища.^(De Grandis 2013) Бавният кръвоток в малките съдове осигурява тесен допир на еритроцитите със съдовия ендотел, провокира развитието на биохимични промени по мембраната на еритроцитите и потенцира взаимодействието на еритроцитите с тромбоцитите. Еритроцитните агрегати стимулират междуклетъчните реакции и в резултат се създават условия за хиперкоагулация.^(Barbui 2013)

7.3. Роля на повишения левкоцитния брой

Неутрофилите, основните представители на белия кръвен ред, играят съществена роля в процесите на активация на хемостазата. Освобождаването от тях на редица протеолитични ензими (еластаза, cathepsin G), реактивните оксигеназни процеси, които гранулоцитите предизвикват и увеличената експресия на CD11C върху тяхната повърхност, могат да активират или увредят както тромбоцитите, така и ендотелните клетки на кръвоносните съдове.

При пациентите с ПВ и ЕТ неутрофилната активация се демонстрира чрез поява на различни специфични фенотипни промени: повишаване на мембрано-асоциирания CD11C и повишаване на плазмената концентрация на отделени от гранулите им протеази (еластаза и миелопероксидаза). Възникват агрегати между левкоцити и тромбоцити, с включване в някои случаи и на моноцитите.^(Marchetti M 2008) Това значимо променя съдовата реология, която, особено при ПВ е силно комплицирана от високия хематокрит. Новосформираните левкоцитно-тромбоцитни агрегати (nethosis) могат да бъдат пусков механизъм за тромботични усложнения.

7.4. Роля на ендотелните клетки

Ендотелните клетки при ФХ(-)ХМПН могат да добият про-адхезивна и прокоагулантна повърхност. Това се дължи най-вече на свободното наличие в циркулацията на отделени от неутрофилите вътреклетъчни протеази, които увреждат съдовия ендотел и нарушават неговата функция, особено тази, свързана с тромборегулацията. Значение се отдава още на реактивния оксидативен стрес, продукт на клетъчната свръхактивация (най-вече на неутрофилите). В кръвта на пациентите с ПВ и ЕТ са установени високи нива на циркулиращи ендотелни клетки

в различно състояние: в покой, активирани, апоптотични, както и циркулиращи прекурсори на ендотелите. Успоредно с това са открити повишени циркулиращи и активирани ендотелна молекули, като тромбомодулин, селектини и фактора на vonWillebrandt, всички до един потенциращи формирането на клетъчни агрегати. (Belotti 2012)

Промените в хемостазата при ФХ(-)ХМПН се развиват най-вече в посока към прокоагулантен фенотип. Миелопролиферираният клон е в състояние да секретира инфламаторни цитокини и да предизвика протромботични промени в съдовия ендотел. (Barbui 2013)

Въпреки значимия риск от тромбози при ФХ(-)ХМПН, използването на традиционните коагулационни тестове не е достатъчно информативно. Не е възможно да се прецени баланса между про- и антикоагулантните фактори, нито пък ефекта, който упражняват тромбоцитите и останалите представители на миелопоезата. Прокоагулантния дисбаланс при всяка нозологична единица може да се даже чрез глобални тестове, като тромбинова генерация в обогатена на тромбоцити плазма (thrombin generation in platelet-rich plasma - PRP) или тромбоеластометрия в цялостна кръв. Ендогенният тромбинов потенциал (endogenous thrombin potential - ETP) е проучен при 111 пациенти и 89 контроли в PRP. Тестването е извършено със и без thrombomodulin (физиологичен активатор на протеин С). Резултатите са представени като ETP съотношение (със/без тромбомодулин). Високият ETP води до резистентност към физиологичното действие на thrombomodulin и се приема като показател за прокоагулантна активност/дисбаланс. Тромбоеластометрията в същото проучване е показала промени във времето за формиране на съсирек (clot formation time - CFT) и при определяне на максималната устойчивост на тромба (maximal clot firmness - MCF). Краткото CFT или високата MCF доказват категорично прокоагулантните нарушения, съпътстващи ФХ(-)ХМПН. Установен е значимо повишен ETP в цялата група пациенти с ХМПН в сравнение с контролите. Доказана е директна корелация на ETP с тромбоцитния брой и обратна корелация с плазменото ниво на свободния протеин S, протеин С и антитромбин. Пациентите, лекувани с hydroxycoumarin са били с по-нисък ETP в сравнение с тези, провеждащи друго лечение. CFT е било по-кратко, а MCF – по-голямо при пациентите спрямо контролите. CFT и MCF са корелирали значимо с тромбоцитния брой. Всичко това доказва, че пациентите с ФХ(-)ХМПН показват прокоагулантен дисбаланс. (Tripodi 2013)

Наличието на хиперкоагулация може да се докаже още чрез изследване на циркулиращите прокоагуланти, придобитата резистентност към протеин С, наличие на активирани тромбоцити или потенциал за ендогенна тромбинова продукция. (Tripodi 2013) Интересен е фактът, че индуцираното от тромбоцитите тромбиново образуване е силно завишено при ПВ и ЕТ, което вероятно се свързва с повишеното ниво на незрели, с голям прокоагулантен потенциал тромбоцити в циркулиращата кръв. (Panove-Noeva 2011)

7.5. ФХ(-)ХМПН и роля на вродената и придобитата тромбофилия за повишената прокоагулантна активност при пациентите

Важен елемент в диагностиката и оценката на прогнозата при ФХ(-)ХМПН е **наличието на тромбофилия**, определяща индивидуалният риск от тромбози при отделните пациенти. Все още не е добре проучена комбинацията на специфичните за тромботичната нагласа JAK2 мутации и другите рискови фактори, с които те могат да се съчетаят. Чешката група, изучаваща ФХ(-)ХМПН стига до извода, че всички тромбофилни фактори, срещащи се в общата популация население, могат да играят значима роля за появата на тромботични усложнения при ФХ(-)ХМПН.

Тромботичната рискова скала комбинира вродените и придобити фактори за тромбофилия. Вродените фактори включват: дефицит на протеините С и S, на антитромбин, мутация на гена за протромбин G20210A и на гена G1691A за factor V ‘Leiden’. Придобитата тромбофилия може да се развие при всички състояния, протичащи с хиперкоагулация като тежки инфекции, автоимунни заболявания, различни видове солиден рак, изгаряния и рани, както и при някои физиологични условия – напр. бременност. Досега само в ръководството на Италианската група от 2004 г. е взето под внимание възможното въздействие на вродените тромбофилни маркери върху тромботичния риск при ФХ(-)ХМПН. За съжаление в по-късните (вкл. настоящи) ръководства тромбофилните показатели не се използват за определянето на риска и терапевтичния подход при пациентите с ФХ(-)ХМПН. (Barbui 2012)

8. Патогенеза на хеморагичните усложнения при ФХ(-)ХМПН

Хеморагичните усложнения при ФХ(-)ХМПН са другата страна на нарушените хемостазни механизми. Те се срещат по-рядко от тромбозите, но имат значима клинична тежест. Хеморагичните инциденти са най-чести при пациентите с ПВ (2,9%) и ЕТ (0,3%). Счита се, че етиологично и патофизиологично те са мултифакторни. (Elliott 2005)

Освен високият тромбоцитен брой ($>1,000 \times 10^9/l$) съществено значение има и придобитият синдром на von Willebrandt. Той се изразява в загуба на молекулното тегло на фактора на von Willebrandt (VWF), което при физиологични условия е високо. Развива се дефицит на фактора, поради разпад на неговите мултимери. Разграждането на мултимерите може да се дължи на спонтанното му свързване с увеличения брой тромбоцити, които го „очистват“ от плазмата. В тези случаи протеолизата на VWF е увеличена многократно и се модулира от протеазата ADAMTS13.

Патофизиологично значение за появата на придобит синдром на von Willebrandt могат да имат още специфични антитела към него или потиснатата му синтеза. Придобитият синдром на von Willebrandt не може да се диагностицира с конвенционални, скриниращи хемостазата лабораторни тестове. При измерване на VWF:Ag и FVIII самостоятелно, този придобит дефект не се открива. В такива случаи са необходими методи, уточняващи функцията на VWF. Недостигът му се доказва чрез ниските активности на ристоцитин кофактора и активността на свързване на колагена. (Federici 2000)

Други причини за нарушена функция на тромбоцитите, водеща до хеморагични усложнения са:

- придобития дефицит на тромбоцитните гранули („синдром на празния пул“)
- понижена експресия на тромбоцитните рецептори (адренергичните)
- нарушен отговор към въздействието на епинефрин
- намалена експресия на мембрания гликопротеинов рецептор. (Elliott 2005)

Особено тежки кръвоизливи се наблюдават при силно нарастнал тромбоцитен брой, най-вече след спленектомия. Такива случаи са описани при пациенти в клетъчна фаза на миелофиброза, които са претърпяли хирургическа спленектомия.

Клинични особености и диагностични методи при ФХ(-)ХМПН

Основните клинични симптоми при ФХ(-)ХМПН са: спленомегалия, конституционални симптоми (немотивиран фебрилитет, загуба на тегло, обилни нощни изпотявания) и различна по тежест анемия, загуба на апетит и ранно насищане след хранене, дискомфорт в корема, намалена трудоспособност, сърбеж (особено след къпане), болки в костите и др. (Geyer 2014) Пенетрантността им е различна при отделните нозологични единици, а комбинациите от тях могат да насочат с голяма вероятност клинициста към правилната диагноза.

В редица случаи клиничната картина не е достатъчно различима, поради припокриване на характерните за цялата група общи особености: свръхпролиферация на белия кръвен ред, проявена с левкоцитоза, тромбоцитоза, тромбоцитични, хеморагични усложнения, конституционални симптоми, еритромегалгия и пр.

Установено е, че тромбоцитичните усложнения са значително по-чести при ПВ (35-39%) в сравнение с ЕТ (10-25%) или ПМФ (7-13%). Хеморагиите също са по-чести при ПВ (2,9%), отколкото при ЕТ (0,3%). Вторична миелофиброза се развива по-често при ПВ (20%), отколкото при ЕТ (6,5%). Левкемична трансформация се регистрира нерядко при ПВ (5-15% за период от 10 години след диагностициране на заболяването), по-често при ПМФ (8-23% също за период от 10 години след диагностициране), и значително по-рядко при ЕТ (2% през първите 15 години след диагностицирането). (Rumi2014)

Наличието на *JAK2* муация има най-голяма диагностична тежест при ПВ (установява се в 93-95% от случаите), докато при ЕТ и ПМФ се среща по-рядко, респективно в 53-64% и в 58-65%. Мутациите на калретикулин се срещат в единични случаи при ПВ, но са твърде характерни за ЕТ (16-33%) и ПМФ (21-25%). При ЕТ *JAK2* и *CALR* муациите са взаимно изключващи се и определят коренно различен ход на заболяването. (Rumi2014)

След откриването на *JAK2V617F* започнаха проучвания на въздействието ѝ върху клиничното протичане при различните ФХ(-)ХМПН. Намериха се позитивни корелации между *JAK2* мутационния товар с демографските белези и клиничните симптоми. Установи се, че пациентите с ЕТ и носителство на *JAK2V617F* са значимо по-възрастни от тези, при които мутацията не се доказва, имат по-висок левкоцитен брой, по-често тромбоцитични усложнения и по-честа еволюция към МФ. (Ha 2012)

В наше проучване, базирано върху данни от 163 пациента установихме по-високо носителство на *JAK2V617F* при първична миелофиброза (70%), в сравнение с повечето литературните данни. (Герчева 2014) При всички „класически“ ФХ(-)ХМПН намерихме права корелационна зависимост между *JAK2V617F* мутационния товар и степента на риск при пациентите. Доказа се стабилна корелация между нивото на мутационния товар и конституционалните

симптоми при всички нозологични групи, като връзката беше най-значима при пациентите с ПВ и хомозиготно носителство, и при пациентите с ПМФ. Значими корелационни зависимости се откриха между нивото на туморния товар от *JAK2V617F*, спленомегалията, нивото на ЛДХ, конституционалната симптоматика и рисковата скала при пациентите с ПВ. Пациентите с ПМФ и носителство на *JAK2V617F* бяха с по-изразена конституционална симптоматика, като разликата е най-значителна при хомозиготите ($p < 0.001$) спрямо „дивия“ тип. Освен това при ПМФ и ЕТ носителите на *JAK2V617F* се оказаха с подчертана левкоцитоза. Изразената конституционална симптоматика при *JAK2V617F* носителите във всички диагностични групи поставя въпроса за разширяване на индикациите за лечение с JAK2 инхибитори.

Досега са осъществявани само ретроспективни проучвания на тромботичния риск при ФХ(-)ХМПН. Най-нов анализ на 1179 пациента с ПВ, ЕТ и ПМФ показва, че броят на тромбоцитите е сигнификантно свързан с по-висок процент на тромботични явления. В същото проучване е доказано, че мутацията *JAK2V617F* е предиктивна както за артериални, така и за венозни тромбози. Възрастта над 65 г., наличието на хипертония, диабет, тютюнопушене, повишени триглицериди и високото ниво на хомоцистеин са условия за възникване предимно на артериалните тромбози. Венозните тромбози при ФХ(-)ХМПН се обвързват със специфични фактори за тромбофилия: вродени – фактор V Leiden и други вродени състояния на тромбофилия; придобити – антифосфолипидни антитела, както и повишени нива на ф. VIII. ^(Schwarz 2015) Редица проучвания доведоха до постулиране на задължителни за всяка една нозология диагностични критерии. Тези критерии не винаги клинично са абсолютно адекватни, но са основа на съвременната диагностика и класификация на тази група заболявания.

В наш материал, включващ периода 2002–2011 г. в клиниката по хематология са диагностицирани 260 пациента с ФХ(-)ХМПН, от които 120 са с ПМФ (на възраст 62.5 ± 10.4 ; жени 42 и 78 мъже), 77 - с ЕТ (възраст 63.0 ± 12.8 ; 40 жени и 37 мъже) и 63 - с ПВ (възраст 59.4 ± 12.9 ; 32 жени и 31 мъже). Честотата на клиничните симптоми при тях е посочена по-долу.

<i>Симптом</i>	<i>ПВ N=63</i>	<i>ЕТ N=77</i>	<i>ПМФ N=120</i>	<i>Общо за групата</i>
Астено-адинамия	72%	64%	97%	77.6%
Нощни изпотявания	48%	42%	58%	49.3%
Кореман дискомфорт	39%	46%	82%	55.7%
Загуба на тегло	22%	28%	64%	38%
Сърбеж	72%	50%	28%	50%
Костни болки	26%	36%	46%	36%
Немотивирано повишена температура	12%	18%	18%	16%
Лесно насищане при хранене	24%	24%	78%	42%

В клиничната практика през последните години все по-съществен принос има молекулярното профилиране с цел отграничаване на отделните неоплазии, по-точно класифициране, по-точна оценка на риска от тромбози, преценка на прогнозата, качеството на отговора към лечение и генериране на нови терапевтични методи. ^(Verger 2014; Savona 2014; Hobbs 2015) Изключителният интерес към ролята и значението на доказаните до този момент генетични мутации при ФХ(-)МППН, налага да се направи опит за онагледяване на зависимостта между позитивирането им и различията в протичането на отделните нозологични единици.

<i>Вид мутация</i>	<i>Общо за групата ФХ(-)МППН</i>	<i>ПВ</i>	<i>ЕТ</i>	<i>ПМФ</i>

JAK2V617F	По-възрастни пациенти По-висок Hb По-висок Leu брой По-нисък Tg брой	По-висок мутационен товар: -по изразен пруритус; -по-голяма вероятност от фибозна трансформация	По-висок риск от артериални тромбози По-малка вероятност от трансформаци в МФ	Липсват доказани корелации
Jak2 exon12	Характерна предимно за ПВ	Изолирана еритроцитоза - еритроцитна миелопоеза Млади пациенти Нивото на EPO може да е в норма	Среща се рядко	Среща се рядко
CALR	Най-честа при ПМФ, следвана от ET По-нисък риск от тромбози По-дълга преживяемост в сравнение с Jak2 мутации	Единични случаи	По-млада възраст Мъжки пол По-висок Tg брой По-ниско ниво на Hb По-нисък Leu брой По-рядко тромбози	По-млади пациенти По-висок Tg брой По-добър риск По-рядко: анемия и левкоцитоза
TET2 first	По-възрастни пациенти По-нисък мутационен товар По-нисък риск от тромбози	Няма данни	По-голяма вероятност да се развие ET	Няма данни
JAK2 first	По-млади пациенти Много хомозиготни субклонове По-висок риск от тромбози По-чувствителни към JAK2 инхибитори	По-голяма вероятност да се развие ПВ	Няма данни	Няма данни
ASXL1 SRSF2	По-голяма вероятност от трансформация	Няма данни	Няма данни	Най-висока честота Ранна

EZH2	Лош риск			трансформация в ОМЛ Най-кратка преживяемост
IDH1/IDH2	Честотата им нараства в бластна криза Лоша прогноза	Няма данни	Няма данни	Няма данни

Общи принципи на лечение при ФХ(-)ХМПН

Изборът на лечение за всеки отделен пациент с ФХ(-)ХМПН е комплексен и се базира на възрастта, прогностичния риск, симптоматиката и съпътстващите заболявания. През 2011г. Европейската група за изучаване и лечение на левкемиите (European Leukemia Network - ELN) създаде първия, базиран на данни от международни клинични изпитвания, алгоритъм за терапевтично поведение при ФХ(-)ХМПН.^(Barbui 2011) Считайки, че в едни случаи продължителността на живота при пациентите с ЕТ и ПВ може да бъде значителна, доближаваща се до обичайната за възрастовата популация, а в други - редуцирана, алгоритъмът при тези две заболявания определя основната цел на лечението им, а именно превенция на тромботични усложнения и кръвоизливи, и минимизиране на риска от прогресия към пост-ПВ/ЕТ миелофиброза или ОМЛ. В контраст с това, терапевтичната стратегия при ПМФ се базира върху оценката на разпространението на заболяването (симптоми, цитопении, спленомегалия) и въздействието им върху преживяемостта на пациентите. При различните ФХ(-)ХМПН изборът на правилното лечение и последователността на прилаганите лекарствени средства е от особена важност както за потискане на миелопролиферативния процес, така и за удължаване на периода до прогресия или трансформация.

Терапевтичните възможности при ФХ(-)ХМПН включват медикаментозно лечение, съобразено с вида и стадия на заболяването (рядко довеждащо до пълно излекуване) и аlogenна трансплантация на хемопоеични стволови клетки (allo-SCT), която при правилен подбор на пациентите може да бъде единствения курабилен метод.

Медикаментите, използвани за лечение на ФХ(-)ХМПН се подразделят на няколко групи:

- циторедуктивни лекарства (най-широко използвани)
- JAK инхибитори (таргетно лечение)
- комбинации на JAK инхибитори с други таргетни молекули
- симптоматични медикаменти с второстепенно значение

При ПВ и ЕТ, двете ФХ(-)ХМПН с най-висок тромбогенен риск задълбочено е проучвана профилактичната роля на ниски дози аспирин по отношение на съдовите усложнения. При пациенти с ПВ клиничното проучване ECLAP убедително демонстрира редуциран риск от съдови усложнения, без при това да се увеличава сигнификантно рискът от хеморагии.^(Landolfi 2004) Ето защо ниските дози аспирин остават първа линия терапия при всички пациенти с ПВ, независимо от индивидуалната рискова скала. При пациентите с нисък риск ЕТ ролята на аспирин като профилактично средство все още не е напълно изяснена, особено в случаите, когато отсъстват симптоми от микроваскуларен тип.

Най-старият метод за редуция на симптомите при пациентите с ПВ е флеботомията. Наскоро отново се потвърдиха стари данни за нейната ефективност и значимост относно бързото облекчаване на симптоматиката в началото на лечебния процес. Счита се, че осъществяването ѝ е показано при ниво на хематокрита >45%, факт, доказан в клиничното проучване CYTO-PV, което установява, че пациентите с контролирен хематокрит имат сигнификантно редуциран риск от кардиоваскуларна смъртност или големи тромбози.^(Marchioli 2013)

При всички симптоматични пациенти с ФХ(-)ХМПН водещо значение има циторедуктивната терапия. Тя включва три възможни медикаментозни групи: hydroxiurea, anagrelide и interferon-alpha.

Hydroxiurea е индицирана при пациенти с ПВ и ЕТ с висок риск, anagrelide при пациенти с интермедиерен и висок риск ЕТ, а interferon-alpha е показан при млади пациенти с трите „класически“ ФХ(-)ХМПН. Целта на циторедуктивната терапия е да намали клетъчният брой на миелопролиферирания клон и по този начин да

редуцира тромбо-хемарогичните усложнения. Решението кога и с какъв медикамент ще се извърши циторедукцията се базира на препоръките на ELN.

Както за ЕТ така и за ПВ първата линия циторедуктивна терапия включва *hydroxyurea (HU)*, за която е доказано, че намалява значимо тромботичните усложнения. *Anagrelide* се препоръчва като втора линия лечение при ЕТ, но в някои национални ръководства фигурира като първа линия при пациенти с висок риск. Съществуват две проучвания, които сравняват ефекта на HU и Anagrelide. Едното - РТ-1, проведено върху популация от 809 пациента с ЕТ и висок риск от съдови нарушения, отчита по-добри резултати при лечение с HU отколкото с Anagrelide, както по отношение на редуцирането на тромбоцитния брой, така и спрямо тромботичните усложнения.^(Harrison 2005) Недостатък на това проучване е, че голяма част от пациентите са били на базисна профилактика с аспирин.

Различни резултати са получени от проучването ANAHYDRET. То е проведено върху 259 пациента с ЕТ във висок риск и сравнява anagrelide с HU в две „чисти“ рандомизирани групи (при премахване на профилактичното прилагане на aspirin!). Не се установяват сигнификантни различия между двете групи пациенти, както по отношение честотата на артериални, венозни тромбози и тежки хеморагични усложнения, така и спрямо честотата на трансформация на заболяването в ОМЛ или миелофиброза.^(Gisslinger 2013)

Понастоящем циторедуктивната терапия при пациентите с ЕТ, които имат най-дълга преживяемост сред всички ФХ(-)ХМПН, се осъществява с хидроксиурея, интерферон или анагрелид. Същото лечение се отнася и за болните с ПВ, въпреки че наскоро беше одобрено прилагане и на guxolitinib при пациенти „с неадекватен отговор или непоносимост към хидроксиурея“. Vannuci и сътр. (2015) сравняват guxolitinib, приложен самостоятелно с най-добрата налична терапия при пациенти с ПВ, при които вече е провеждано първа линия лечение. Те установяват, че guxolitinib упражнява следните ефекти: по-добър контрол върху нивото на хематокрита, по-изразена редукция на спленомегалията, по-сполучливо потискане на конституционалните и свързани с ПВ симптоми и не на последно място – тенденция към по-рядко настъпващи тромботични прояви.^(Vannuci 2015)

Хидроксиуреята е най-старото, изпитано лекарство с циторедуктивен ефект, широко използвано при лечението на различни МПН. Понастоящем се появиха данни за негативно влияние на HU върху хемопоезата, особено при продължителното ѝ с години прилагане при дългоживеещи пациенти с ЕТ и ПВ. Установено е, че ниските дози hydroxyurea индуцират грешки в репликацията на ДНК, модифицират структурата ѝ и водят до делеция на късото рамо на хромозома 17.^(Arit 2011, Kiladjian 2011) Продължителното лечение с hydroxyurea е свързано с поява на макромегалоцити в костния мозък и периферната кръв. Тези белези се дължат на доказани диспластични нарушения в еритропоезата.

В нашата практика от 263 пациента с ХМПН, лекувани с HU през последните 10 години, изразена макроцитоза, а в някои случаи истинска мегалоцитоза с частична, липсваща или преобладаваща хиперхромия на еритроцитите наблюдавахме в 78% от случаите.

Рекомбинантният interferon-alpha (rIFN α) и пегилираният interferon-alpha (Peg IFN- α) са доказали своята ефективност при ЕТ, ПВ и в началните стадии на ПМФ.^(Rank 2014) При пациентите с ПВ и ЕТ, нелевкемогенният пегилиран (PEG) IFN-2 α е алтернатива на HU, особено за по-младите индивиди. Установено е, че лечението с IFN α индуцира хематологичен отговор в 76% и 77% от пациентите, съответно с ПВ и ЕТ. Приложението на Peg IFN- α води до намаляване на JAK2 мутационния товар в 15-20% от пациентите с ПВ/ЕТ.^(Quintas-Cardama 2013)

Клиничният и молекуларен отговори зависят от генотипния фон при отделните пациенти. Рандомизирано, контролирано във фаза 3 проучване, сравняващо ефикасността и безопасността на нов, монопегилиран (monopegylated IFN) срещу HU при пациенти с ПВ във високо рискова група (PROUD-PV trial; www.ClinicalTrials.gov/identifier#NCT01949805) е в напреднала фаза на събиране и обработване на данните. Вече е доказано, че rIFN α статистически значимо редуцира броя на клетъчните клонове с JAK2 мутации и води до намаляване на съдовите инциденти, особено при пациентите с ПВ и ЕТ. В проучване на ефективността на интерфероните в група от 34 пациенти с ПВ, ЕТ и ПМФ, предварително лекувани с хидроксиурея, анагрелид, бусулфан, както и новодиагностицирани, rIFN α е прилаган в средна доза 9 MIU (6-15MIU) в продължение на 81 месеца, а Peg IFN- α - в средна доза 45-95 μ g за време от 8 месеца. Пълнен отговор е постигнат в 42% от пациентите с ПВ, при 60% при пациентите с ЕТ и при 30% от пациентите с ПМФ. Пълният отговор при пациентите с ПВ включва молекулярен отговор.^(Hatalova 2015)

Интересна е публикацията на Verger et al. (2014), която проучва ефекта от лечение с rIFN α при пациенти с ЕТ и CALR мутация. Установява се, че клоновете, носещи само CALR мутация са чувствителни към лечението, но

наличието на повече от една мутация определя по-лош молекулярен отговор. Клоновете, съчетаващи други мутации имат по-лош отговор към терапията с rIFN α . (Vergier 2014)

Молекулярният и хематологичен отговор при лечение на ПВ с rIFN α е проучен от Them и сътр. (2015), които достигат до следните изводи: 1) отговорилите с хематологична и/или молекулярна ремисия не се влияят от наличието или липсата на хромозомни аберации; 2) лечението е довело до значим хематологичен и молекулярен отговор при повечето от пациентите; 3) при пълния хематологичен отговор процентът на молекулярна ремисия е по-висок; 4) клиничният и молекулярен отговори са независими от JAK2 мутационния товар. (Them 2015)

Седемгодишно проследяване на ефикасността и безопасността от лечението с PegIFN2a при пациенти с ЕТ и ПВ, приложен в различни дози (от 90 до 450 мкг.) при средна продължителност на лечението 87 м. беше съобщена на годишната среща на Американската хематологична асоциация – Декември 2015 г. Пълен хематологичен отговор е постигнат в 76% от случаите, молекулярна ремисия - в 63%, с продължителност 53 месеца. Странични явления, наложили преустановяване на лечението са наблюдавани при 35% от пациентите (предимно съдови усложнения или прогресия на заболяването). (Masarova L, 2015)

Anagrelide, медикамент, известен с повече от 15 годишна история, проявява редица ефекти, които засягат единствено мегакариоцитната кръвна редица, т.е. той е **селективен инхибитор на мегакарицитопоезата**. Тези ефекти се осъществяват чрез потискане на мегакариоцитната диференциация и пролиферация, намаляване на размера, повърхността и плоидността на мегакарицитите. Доказано е, че той не проявява левкемогенен потенциал и се явява алтернатива на лечението с хидроксиурея при пациенти с тромбоцитоза. Ефектът му е реверзибилен и продължава между 4 и 8 дни след преустановяване на приема.

Ruxolitinib е нов, перорално приложим инхибитор на Janus-associated kinase (JAK) (JAK 1 и 2), с потенциални антинеопластични и имуномодулиращи действия. Той се свързва специфично с тирозин киназния протеин и го инхибира. Това води до редуциране на процесите на вътреклетъчна активация и инхибиране на клетъчната пролиферация. Средната максимална инхибиторна концентрация на Ruxolitinib (IC50) за JAK1 и JAK2 е съответно 2.8 pmol/L и 3.3 pmol/L. След приема му нивото на фосфорилирания STAT значително намалява, което е маркер за потиснатата JAK активност и това се осъществява по доза зависим механизъм. Не е регистрирана фармакодинамична рефрактерност.

Ruxolitinib има няколко особено значими за качеството на живот на пациентите с ПМФ ефекти: редуцира спленомегалията и облекчава системните симптоми. Проучванията COMPHORT-I и COMPHORT-II доказаха, че в 52% от пациентите с ПМФ, третирани с Ruxolitinib, се установява намаляване на смъртния изход, в сравнение с тези, получили най-доброто възможно лечение. (Cervantes 2013)

Датската група по изучаване на ХМПН е провела проучване на комбинацията ruxolitinib плюс IFN- α 2 (Danish COMBI trial) при пациенти с ПВ, хиперпролиферативна фаза на ПМФ и пост-ПВ МФ. Пълен клинично-хематологичен отговор е регистриран в 63% от цялата група, като ефектът е най-добър при ПВ (67%). Режимът е добре толериран и се препоръчва, особено при пациенти с изразени конституционални симптоми. (Mikkelsen SU, 2015)

Понастоящем протичат клинични изпитвания в напреднал стадий (фаза III) за ефективността и безопасността на нови молекули, инхибиращи JAK тирозин киназите и възможностите за синергична терапия, целяща засилване и потенциране на активността на JAK инхибиторите. Проучва се също комбинирано лечение, включващо JAK инхибитори и инхибитори на други биохимични клетъчни пътища, епигенетични модулатори и инхибитори на теломеразата. (Harrison 2015)

Досега не е открито медикаментозно лечение, което да възстанови напълно състоянието на пациентите с ПМФ, както и да върне процесите на костномозъчна фиброза. Единствено аlogenната трансплантация на стволови клетки би могла да доведе до пълно излекуване. Групата „кандидати“ за Allo-SCT включва интермедиерен-2 и висок риск по DIPSS и наличие на неблагоприятни цитогенетични аномалии. (Tefferi 2011)

Пациентите се подбират според възрастови критерии и наличие на коморбидности, тъй като пост-трансплантационната смъртност е твърде висока. (Barbui 2011)

Досега липсват проспективни, рандомизирани проучвания, които да изследват условията и факторите за сполучлив изход от allo-SCT. Рисковете от отхвърляне на трансплантанта, GVHD и свързаната с кондициониращия режим токсичност, могат значимо да влошат изхода от тази процедура и дори да съкратят очакваната преживяемост на пациента. Решението за осъществяване на allo-SCT се базира на още много фактори: брой еритроцитни и тромбоцитни трансфузии (алоимунизация), възраст (граничната възраст не е уточнена напълно), наличие на донор и неговия HLA статус и пр. Преди да се вземе решение за allo-SCT пациентът трябва да се категоризира в три възможни групи: „спешен,“ „отложен,“ или „неподходящ“. Едно от проучванията върху

трансплантирани болни с ПМФ показва 47% обща преживяемост в рамките на 5 години и регресивно развитие на фиброзата в 40% от случаите. ^(Tefferi 2011)

Понастоящем нараства използването на немиелоаблативните кондициониращи режими и това разширява възможностите за прилагането на allo-SCT дори при по-възрастните пациенти. Пациентите под 45 г. са подходящи за интензивен кондициониращ режим, докато за тези между 45 и 65 г. се препоръчва немиелоаблативен режим. Пациентите над 65 г. са най-подходящи за експериментално лечение с нови молекули, целящи забавяне на прогресията на заболяването.

В заключение, въпреки, че силно се препоръчва при интермедиерен риск-2 и висок риск, allo-SCT е с ограничено приложение, само в групата по-млади пациенти; свързана е със значими увреждания и висока смъртност. ^(Ballen 2010; Gupta 2011)

В монографията подробно са описани съвременните представи за етиологията, патогенезата, патофизиологията, клиничната картина и лечението на всички „класически“ ФХ(-)ХМРН: ПВ, ЕТ и ПМФл

Резюмета на публикации в българска периодика

№7. А. Желязкова и Д. Герчева. АНГИОГЕНЕЗА ПРИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ

Ангиогенезата е установена като задължителен процес в развитието на солидните тумори, а VEGF (Vascular endothelial growth factor) като най-потентният индусер сред факторите, участващи в този процес. Значението на ангиогенезата в прогресията на хематологичните малигнитети понастоящем е в етап на изясняване. Увеличена ангиогенна активност е демонстрирана при острите левкемии, миелодиспластичните синдроми (MDS) и нехочкиновите лимфоми (NHL). Увеличава се и базата данни от проучвания на ангиогенезата и при миелопролиферативните заболявания. Подоброто разбиране на сложните взаимоотношения между ендотелни, хемопоеични и стромни клетки в костният мозък, както и създаването на надеждни методи за оценка на ангиогенезата, насочиха интересът на хематолозите и към системното проучване на този процес в развитието на тази група хемопатии. Предстои да бъдат оценени корелационните връзки между степента на ангиогенеза и клиничния ход и прогнозата при миелопролиферативните заболявания. Досега голям брой ангиогенни инхибитори са в клинични фази на проучвания, с което възниква и въпросът за адекватен подбор на групите пациенти, които биха били подходящи за ангиосупресивна терапия.

№8. А. Желязкова и Д. Герчева. Туморна ангиогенеза и възможности за антитуморна терапия.

Ангиогенезата е процес на формиране на нови капиляри от вече съществуващи кръвоносни съдове. В развитието и взимат участие голям брой растежни и инхибиторни фактори, цитокини, адхезионни молекули и ензими. Фундаментален регулатор в неоваскуларизацията е VEGF/VEGF receptor системата, кооперираща се с ангиопоетините. Патологична ангиогенеза се развива при нарушаване на баланса между ангиогенните промотори и инхибитори. Тя може да се развие в две насоки: 1. Неадекватна и/или компенсаторна неоваскуларизация, наблюдавана при диабетната пролиферативна ретинопатия, коронарната и периферна съдова недостатъчност, ревматоиден артрит, псориазис; 2. Екссивна неоваскуларизация, която е патофизиологично звено в развитието и метастазирането на солидните тумори. Интересът към туморната ангиогенеза нараства през осемдесетте години с изолирането на първата проангиогенна молекула bFGF, а впоследствие и на главния промотър на ангиогенезата VEGF и тирозинкиназните му рецептори. По-късно са открити други проангиогенни

молекули, техните рецептори и пътищата на сигналната трансдукция. Това дава основание за разработване на синтетични ангиогенни инхибитори и въвеждането им в лечение на неоплазиите.

№9. Д. Герчева: МАВСАМПАТН – таргетна терапия при хроничната лимфоцитна левкемия и неходжкинови лимфоми с ниска степен на малигненост

Alemtuzumab (Mabscampath) е рекомбинантно хуманизирано моноклонално антитяло, насочено срещу CD52 антигена. CD52 антигенът е разположен върху клетъчната повърхност протеин, който се експресира с висока честота върху всички лимфоцити, намиращи се в различни фази на развитие, върху клетките „убийци“, върху моноцитите, макрофагите, дендритните клетки и еозинофилите. Малигнените лимфоцити на пациенти с В/Т хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) и на тези с Т-клетъчна пролимфоцитна левкемия (ПЛЛ) експресират антигена във висока степен. При не-Хочкиновите лимфоми (НХЛ) експресията е различна по степен, като е най-изразена при тези с ниска степен на малигненост, анапластичните и Т-клетъчни лимфоми. До сега са проведени редица клинични проучвания, анализиращи ефективността, безопасността и клиничното значение на Mabscampath. Установено е, че той води до значим клиничен отговор при рефрактерни или рецидивирали пациенти с В- или Т клетъчна ХЛЛ и НХЛ. Има индикации, че поддържащото лечение с Mabscampath удължава времето до прогресия и преживяемостта на болните без да добавя значима хематологична токсичност или инфекциозни нарушения.

№10. Ц. Никова и Д. Герчева. АНГИОГЕНЕЗА ПРИ МУЛТИПЛЕН МИЕЛОМ

Ролята на редица цитокини, отделяни от миеломната клетка е добре проучена и се свързва с развитието и прогресията на миеломната болест. Все още липсват достатъчно познания за поведението на костно-мозъчната строма и съдовото микрообкръжение в патогенезата на заболяването. Миеломната болест е първата хематологична неоплазия, при която е доказано прогностичното значение на костномозъчната ангиогенеза. Ключова роля в този сложен процес играе съдово-ендотелния растежен фактор (VEGF – vascular...), който се продуцира както от стромните елементи така и директно от миеломните клетки. Задвижва се автономна паракринна връзка между VEGF секрецията и продукция на IL-6, един от основните стимулатори на миеломния туморен растеж. Паракринна бримка се реализира и между bFGF и IL-6. Миеломните клетки са с висока експресия на HGF(...) и неговият рецептор, пряко свързани с активността на остеокластите и степента на костна резорбция. VEGF, bFGF и HGF потенцират пролиферацията на ендотелни клетки, отключвайки и стимулирайки неоангиогенеза. В процеса се намесват ангиопоетините (ангиопоетини 1 и 2), които са регулатори на съдовото ремоделиране и стимулатори на вече индуцираната ангиогенеза. Миеломните клетки освобождават също металопротеази, най-вече MMP-2 и MMP-9, които увеличават пермеабилитета на съдовата базална мембрана и потикват инвазия на ендотелни клетки, процеси, необходими за съдово новообразуване. Костно-мозъчните ендотелни клетки при миеломната болест се характеризират с повишена експресия на специфични ангиогенни рецептори, което ги прави силно податливи на проангиогенни сигнали. В резултат на всички тези процеси нараства микросъдовата гъстота в костния мозък на болните. Тя се доказва чрез имунохимично оцветяване най-често със CD34 и vWF. Установена е значима корелация между ангиогенезата в костния мозък, прогнозата и общата преживяемост на болните. Ангиогенните цитокини (VEGF, bFGF, HGF и синдекан-1) се повишават в кръвта при прогресия на заболяването и могат да служат като независими прогностични фактори за обща преживяемост.

№11. Д. Герчева: МИЕЛОДИСПЛАСТИЧНИ СИНДРОМИ: НОВОСТИ В КЛАСИФИКАЦИЯТА И ЛЕЧЕНИЕТО

Миелодиспластичните синдроми (МДС) са група трудно лечими заболявания, познанието ни, за които се обогати през последните години. Френско-американско-британската класификация (FAB) беше

постепенно изместена от тази на СЗО, последно обновена в края на 2008 г. Вече задължително при поставянето на диагнозата се ползва международната прогностична скала (IPSS), чрез която се определя вероятността за и очакваното време до прогресия в остра миелоидна левкемия. Откриват се нови молекулярно-биологични промени, разкриващи интимната патогенеза и патофизиология при МДС. Успех в лечението се постигна с въвеждането на 5-azacitidine, decitabine и lenalidomide, които подобряват цитопенията и удължават живота на пациентите.

№12. Л. Герчева ХРОНИЧНА НЕУТРОФИЛНА ЛЕВКЕМИЯ: КЛИНИЧНИ ПЕРСПЕКТИВИ

Хроничната неутрофилна левкемия (ХНЛ) е агресивна миелопролиферативна неоплазма (МПН), чието диагностициране изисква покриване на критериите на СЗО-2016, включващи: наличие на левкоцитоза $\geq 25 \times 10^9/L$, абсолютна неутрофилия $> 80\%$, циркулиращи млади неутрофили $< 10\%$ и бласти в периферната кръв $< 1\%$. Задължително условие за поставяне на прецизна диагноза е липсата на миелодиспластични морфологични нарушения или молекулярни промени, характерни за други миелопролиферативни неоплазми. Заболяването е последица от соматични мутации, активиращи гена на рецептора на колони-ситулиращия фактор 3, който физиологично изпълнява ролята на основен стимулиращ фактор за неутрофилите. Най-честата мутация е CSF3R T618 и тя се счита за типичен клонален маркер на болестта. ХНЛ протича с различна по тежест клинична картина, със склонност към бърза прогресия и висок летелитет. Счита се, че появата на допълнителните мутации SETBP1 и ASXL1 в хода на заболяването предопределя по-тежко протичане, значимо неблагоприятни еволюция и краткотрайна преживяемост. Напредъкът в разбирането на молекулярната база на ХНЛ все още не е довел до поява на задоволителни терапевтични успехи при заболяването. Ключови думи: Хронична неутрофилна левкемия, мутация CSF3R, абсолютна неутрофилия

№13. Л. Герчева, Г. Момова, К. Кудева, Д. Симеонова PSYCHOLOGICAL AND SOCIAL PROBLEMS OF PATIENTS WITH MALIGNANT HAEMATOLOGICAL DISEASES

Different psychological and social problems deteriorating patients' quality of life appear together with the prolongation of the duration of life. The aim of this study was their investigation and systematization. An inquiry proposed by the authors was used. It consisted of 5 groups of questions, referring to the type of behaviour at the time of information about the diagnosis as well as to patient's everyday functioning. Lack of realistic "internal picture of the disease change in the hierarchy of values with loss of some and appearance of other new values, condensing the life events were found out. A change in the balance model before and after the disease towards increasing the interest for the body and the cares for it, as well as reduction of contacts outside the family were observed. A deterioration of social status was found out in 90 % of the patients. Important ways for overcoming the psychological and social problems in the patients with onco-haematological diseases were discussed.

№14. Св. Ангелова, Л. Герчева, М. Симеонова, А. Захариев, Р. Рачев и Г. Балаценко. Необичаен цитогенетичен вариант на хронична миелоидна левкемия – 8p11 миелопролиферативен синдром

Представяме 59 годишна жена с шийна лимфаденомегалия и левкоцитоза ($42 \times 10^9/l$). Миелограмата показва миелоидна хиперплазия с еозинофилия. Цитогенетичният анализ не установява Филадельфийска хромозома, а RT-PCR е отрицателен за BCR-ABL фузионни гени. В преобладаващата част от изследваните клетки се установява комплексно хромозомно преустройство (1;7;8)(q25;q42; p22;11). Това е първият, регистриран в България 8p11 миелопролиферативен синдром, съпроводен с необичайно

хромозомно преустройство. Пациентката се изявява с типичните за синдрома клинични особености: наличие на нехочкинов лимфом с висока степен на малигненост, ексцесивна еозинофилия, висок процент на миелобласти в костния мозък и миелоидна инфилтрация възли. Провежданото лечение с хидроксиурея и интерферон е с краткотраен ефект и 8 месеца след поставяне на диагнозата пациентката еволюира в М5 вариант на остра левкемия, завършила фатално.

№15. А. Желязкова, Д. Герчева, Л. Иванова, Н. Цветков, А. Антонов* **Повишени плазмени концентрации на Vascular Endothelial Growth Factor Hepatocyte Growth Factor при пациенти с хронични миелопролиферативни заболявания*

Ангиогенезата е задължително патофизиологично звено в развитието на солидните тумори. През последните години активно се проучва нейното значение за развитието и прогресията на хематологичните заболявания. Нараства базата данни за участие на ангиогенезата в патофизиологията на миелопролиферативните заболявания (МПЗ). Сред най-потентните ангиогенни промотори са vascular endothelial growth factor (VEGF) и hepatocyte growth factor (HGF), чиито нива в кръвта служат като индиректни маркери за повишена ангиогенна активност. Целите на настоящото проучване са: 1) Съставяне на ангиогенен профил на VEGF и HGF при пациенти с МПЗ и 2) Анализирание на зависимостта между плазмените им нива и някои показатели за туморен обем. Чрез ELISA метод са изследвани плазмени проби от 41 новодиагностицирани болни с МПЗ и 21 здрави доброволци. Всички пациенти показват значимо по-високи средни нива на VEGF и HGF в сравнение с контролната група (с ниво на значимост p между 0,01 и 0,001). Установява се значима зависимост между HGF и левкоцитния брой, ЛДХ, спленомегалията и процента бласти в периферната кръв. Значима корелация е намерена и между VEGF, тромбоцитния брой и левкоцитния брой. Данните от проучването показват, че МПЗ са асоциирани със значимо завишени плазмени нива на ангиогенните промотори VEGF и HGF, което подкрепя тезата, че това са ангиогенно зависими заболявания. Според нашите резултати HGF може да служи като маркер, отразяващ туморния обем. С въвеждането на ангиогенни инхибитори в клинична фаза на проучвания нивото на VEGF и HGF би служило за проследяване ефективността им. Състоянието на ангиогенния профил може да е от полза като диагностичен и прогностичен подход при проследяване на пациенти с МПЗ, както и да хвърли светлина за разбирането на биологията на тези заболявания. тичен подход

№16. С. Ангелова, К. Добрев, Д. Герчева, А. Желязкова, А. Антонов, Г. Балаценко, К. Ковачева, Н. Цветков и М. Симеонова.* **Хронична миелоидна левкемия: динамика на цитогенетичните промени в зависимост от прилаганото лечение*

Цитогенетичният маркер t(9;21)(q34,q11) е един от основните диагностични критерии при болни с хронична миелоидна левкемия (ХМЛ). Цитогенетичните промени имат освен дигностично и прогностично значение при тези пациенти. Използваната у нас стандартна химиотерапия не довежда до постигане на цитогенетична ремисия. По тази причина повечето болни от ХМЛ не се проследяват редовно чрез цитогенетични изследвания. Въвеждането на принципно нови терапевтични средства като интерферони и гливек налага нов подход за проследяване на промените в кариотипа на болните. В статията са представени резултатите от цитогенетично проследяване на две групи болни: едната, лекувана със стандартна химиотерапия, а другата – с интерферон. Изследвана е и една болна, лекувана последователно с интерферон и гливек, при която са осъществени и молекулярно-генетични изследвания. За пациентите, лекувани с интерферон по-малко от една година отсъствието на очаквана цитогенетична ремисия е сигнал за преосмисляне на терапевтичния подход. Появата на допълнителни цитогенетични аберации в групата, лекувана с интерферон е белег за престояща прогресия на заболяването.

№17. D. Ivanova, D. Gerova, V. Gerov, L. Gercheva, T. Yankova CONVENTIONAL POLYCHEMOTHERAPY OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS DEPLETION

The aim of this study was to investigate whether conventional polychemotherapy of acute lymphoblastic leukemia patients contributed to the development of oxidative stress and antioxidants depletion. Plasma levels of thiobarbituric acid-reactive substances assessed by malondialdehyde (MDA) content were measured as products of lipid peroxidation. Pretreatment MDA values and MDA values during therapy course were estimated to be above the normal range, indicating the occurrence of oxidative stress. Serum iron levels were monitored as a potential source of non-transferrin bound iron with a role in initiation of oxidative burst. Increased serum iron levels were measured during the whole course of chemotherapy. To analyze the effects of cytostatic therapy on the pro-oxidant/antioxidant parameters in plasma we measured the total antioxidant status (TAS) and a single plasma antioxidant - uric acid (UA). A significant reduction of TAS levels was found at the end of the therapy course, strongly correlating with UA content ($r=0,9$; $p<0,05$). Our data suggest that uric acid as a routine laboratory indicator could also serve as a marker of blood antioxidant capacity.

№18. A. Zhelyazkova, L. Gercheva, L. Ivanova. Elevated plasma levels of Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor: clinical significance and correlation with tumor burden in patients with chronic myeloid leukemia

Angiogenesis is an established indispensable process in the development and metastasis of solid tumour. Data have been recently accumulated about its role in Chronic Myeloid Leukemia (CML). The aims of our study were 1) to assess vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) plasma level in newly diagnosed patients with CML; 2) to analyse differences of their levels in varying phases of the disease; 3) to analyse VEGF and HGF correlation with some markers, reflecting the tumour burden as well as the progression of the disease. Plasma levels of VEGF and HGF were determined by ELISA in 16 patients with CML and 21 healthy individuals. VEGF and HGF levels were followed-up in 6 patients according to the progression of the disease or the treatment regimen. All the patients with CML showed significantly higher levels of VEGF and HGF when compare to the control group. WE found a significant correlation between HGF and Leucocytes, LDH, splenomegaly and blasts percentage in the peripheral blood. Significant correlation was found between VEGF and platelets, LDH and leukocytes count. Our data indicates that CML are highly associated with elevated plasma levels of VEGF and HGFq which corroborates the thesis of its angiogenic dependency. Likewise the present study suggest that measurements of VEGF and HGF may be usefull for assessing disease activity and progression as well.

№19. К. Александрова, А. Станчев, М. Станева, Дж. Ходжажик, А. Желязкова и Л. Герчева Българският опит в прилагането на тирозин-киназния инхибитор Imatinib mesylate (Glivec) като втора линия терапия при пациенти с хронична миелогенна левкемия. Резултати от 18-месечно лечение.

Хроничната миелогенна левкемия (ХМЛ) се характеризира със специфична хромозомна аномалия т.нар. Филадельфийска хромозома (Ph)-t(9;22)(q34;q11), водеща до образуване на фузионен протеин Bcr-Abl с тирозин-киназна активност. Imatinib mesylate (Glivec) е първият въведен в клиничната практика тирозинкиназен инхибитор, който селективно блокира клетъчната пролиферация и индуцира апоптоза в Ph+ клетки. За 18-месечен период в хематологичните клиники на страната са проследени и лекувани с Glivec като втора линия терапия 34 пациента с ХМЛ. Отчетени са честотата на хематологичния отговор и времето до постигането му, честотата и вида на цитогенетичните отговори, както и лекарствената поносимост и токсичност. Резултатите са съпоставими с цитираното в

литературата. Не са наблюдавани високостепенни прояви на хематологична и/или нехематологична токсичност, налагащи спиране на лечението.

№21. Л. Герчева, А. Желязкова, Вл. Геров, Х. Върбанов, Р. Рачев, И. Мичева и Н. Ставрев: Ретроспективен анализ на терапевтичните резултати при пациенти с остра миелоидна левкемия в клиниката по хематология – Варна;

Цел на настоящата работа е проучване ефективността на използваните терапевтични режими при пациенти с остри миелоидни левкемии (ОМЛ). Анализирани са общо 227 болни с ОМЛ, диагностицирани и лекувани в Хематологична клиника – Варна, за 10-годишен период. Пациентите са разпределени в две възрастови групи: ≤ 60 и ≥ 61 години, класифицирани според FAB и/или СЗО (2008) За статистическия анализ е използван SPSS software v.15 за Windows. От общо 147 пациенти, преминали индукционен режим, ранна смъртност е регистрирана при 30.6%. Постигната е ремисия при 52% (60.3% в първата възрастова група и 35% във втората). Общата преживяемост (OS) е 25.5 ± 4 месеца за всички пациенти. Средната продължителност на първата ремисия при пациенти < 60 г. (N = 41) е 21.7 ± 5.3 месеца, а при болни > 61 г. (N = 12) 12.7 ± 4.5 месеца. Получените резултати по отношение на постигане на пълна ремисия при пациенти под 61 години са съпоставими с тези в достъпната литература, но ремисията е с двойно по-кратка продължителност. Данните от настоящия анализ налагат два важни извода: необходимост от ранно включване на интензифицирани терапевтични режими и осъществяване на стволовоклетъчна трансплантация при предварително определен висок риск още при първата постигната ремисия.

№22. П. Ганева, Г. Арнаудов, Ж. Жечев, М. Минчев, И. Тонев, М. Генова, Г. Балаценко, Л. Герчева, С. Ангелова и др. Има ли терапевтичен потенциал автоложната стволовоклетъчна трансплантация при мултиплен миелом – роля на индукционната терапия.

Резюме. Автоложната стволовоклетъчна трансплантация (АСКТ) е стандарт в лечението на мултиплен миелом (ММ) при пациенти на възраст < 65 г., като се постигат по-добри общ отговор (OR), обща преживяемост (OS) и свободна от заболяване преживяемост (DFS). През последните години индукционната терапия (ИТ) по протокол VAD се измества от нови режими с таргетни медикаменти. За да се оцени ролята на ИТ, беше направен ретроспективен анализ на пациенти с ММ, след бротезомид съдържащи режими (Vel/Dex) (n = 37) и след VAD (n = 29). В двете групи не бяха установени различия в добива от стволови клетки (СК) (Vel/Dex 3.75×10^6 /kg тегло; VAD 3.23×10^6 /kg тегло), както и в броя на инфузираните СК (съответно 2.7×10^6 /kg тегло срещу 2.5×10^6 /kg тегло). Липсваха значими различия и във времето на възстановяване след миелоаблативната терапия както по отношение на неутрофиците (Vel/Dex + 11.1 срещу VAD ден + 11.2) така и на тромбоцитите (съответно ден + 12.5 срещу ден + 12.0). OR преди АСКТ при 2-те групи беше почти еднакъв (92% vs 92.8%), но постигането на пълна ремисия и OS бяха значително по-добри при Vel/Dex спрямо VAD [съответно 3.4 срещу 21.6%; 98.4% срещу 76.5% (p < 0.001)], докато по отношение на DFS разлика беше намерена при 73% срещу 59.3%. За целия период на наблюдение след АСКТ летален изход беше регистриран при 5 болни, от които при 2-ма поради ранна смъртност в хода на АСКТ, а при останалите поради прогресия на заболяването. Въз основа на тези резултати може да се препоръча смяна на ИТ и включване на бротезомид в новите режими поради по-добрия терапевтичен отговор и липсата на токсичност към стволовата клетка.

№23. И. Мичева, В. Геров, Р. Рачев, Х. Върбанов, Н. Ставрев, Л. Герчева КЛИНИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРЕЖИВЯЕМОСТ НА ПАЦИЕНТИ С МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕН СИНДРОМ. ПРЕОЦЕНКА СПОРЕД WHO КЛАСИФИКАЦИЯТ, IPSS И WPSS

Целта на проучването е да се представят FAB, WHO и IPSS разпределението, честотата на цитогенетичните аномалии, еволюцията в остра левкемия и преживяемостта на пациентите с миелодиспластичен синдром (МДС), диагностицирани и лекувани в клиниката в периода 2005-2010.

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

№24. Iliana Micheva, Hinko Varbanov, Liana Gercheva DECREASED PERIPHERAL BLOOD DENDRITIC CELLS IN MULTIPLE MYELOMA: THE POTENTIAL ROLE OF IL-6 AND BETA-2-MICROGLOBULIN

Several studies demonstrate the presence of quantitative and functional abnormalities in the dendritic cell (DC) subsets in patients with multiple myeloma (MM). The inhibitory effect of IL-6, TGF- β , IL-10 and beta-2-microglobuline (beta-2-MG) is highly suspected.

The aim of the study was to evaluate the myeloid and plasmacytoid dendritic cells (MDC and PDC) in newly diagnosed patients with MM in correlation with various biological markers.

Thirty patients with newly diagnosed MM were included in the study. All the laboratory parameters were obtained at the time of diagnosis. Three colour flowcytometry with ILT3/ lin/CD11c was used for the detection of the two peripheral blood dendritic cell (PBDC) subsets. The plasma level of IL6 was detected by ELISA (Standard Curve Range: 2-200pg/ml); the beta-2-MG- by the immunoturbidimetric test.

The median age of patients was 61.5 years (36-89). The mean M-protein concentration was 46.5 \pm 16.2 g/l. IgG kappa was detected in 15 patients, IgG lambda-in 4, IgA kappa-in 7, IgA lambda-in 3. The mean level of beta-2-MG was 7.0 \pm 5.7mg/l (1.82–22.49 mg/l); beta-2-MG was used to determine the stage according to the ISS. The mean level of IL6 was 27.73 \pm 21.47pg/ml (4.6–72.5 pg/ml). The percentage of MDC and PDC was significantly lower in the peripheral blood of patients with MM in comparison to healthy subjects (0.08% \pm 0.09% vs 0.21% \pm 0.02% and 0.04% \pm 0.03% vs 0.16% \pm 0.01%, respectively). A statistically significant difference was found between the percentage of MDC and PDC in the different stages. There was a negative correlation between MDC and PDC and the levels of beta-2-MG (p=0.02 and p=0.02), as well as between MDC and the IL6 levels (p=0.04). No correlation was found between MDC, PDC, levels of M-protein and the type of paraprotein.

Our results demonstrate the relationship between peripheral blood DC, IL6 and beta2-MG and confirm the published data for the inhibitory effect of the two factors on DC differentiation and maturation in vitro. The monitoring of beta-2-MG and IL6 may have clinical implication as a predictor of the immune system status as well as for the yield of harvested DCs for vaccination.

№25. М. Ефраим, А. Антонов, И. Мичева, Вл. Геров и Л. Герчева: Случай на екстрамедуларен плазмоцитом на ЦНС при жена на 29 г., прогресирал до множествен миелом с фатален изход

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

№26. Iliana Micheva, Hinko Varbanov, Liana Gercheva DECREASED PERIPHERAL BLOOD DENDRITIC CELLS IN MULTIPLE MYELOMA: THE POTENTIAL ROLE OF IL-6 AND BETA-2-MICROGLOBULIN

INTRODUCTION: Several studies demonstrate the presence of quantitative and functional abnormalities in the dendritic cell (DC) subsets in patients with multiple myeloma (MM). The inhibitory effect of IL-6, TGF- β , IL-10 and beta-2-microglobuline (beta-2-MG) is highly suspected.

PURPOSE: The aim of the study was to evaluate the myeloid and plasmacytoid dendritic cells (MDC and PDC) in newly diagnosed patients with MM in correlation with various biological markers.

MATERIALS AND METHODS: Thirty patients with newly diagnosed MM were included in the study. All the laboratory parameters were obtained at the time of diagnosis. Three colour flowcytometry with ILT3/lin/CD11c was used for the detection of the two peripheral blood dendritic cell (PBDC) subsets. The plasma level of IL6 was detected by ELISA (Standard Curve Range: 2-200pg/ml); the beta-2-MG- by the immunoturbidimetric test.

RESULTS: The median age of patients was 61.5 years (36-89). The mean M-protein concentration was 46.5 \pm 16.2 g/l. IgG kappa was detected in 15 patients, IgG lambda-in 4, IgA kappa-in 7, IgA lambda-in 3. The mean level of beta-2-MG was 7.0 \pm 5.7mg/l (1.82-22.49 mg/l); beta-2-MG was used to determine the stage according to the ISS. The mean level of IL6 was 27.73 \pm 21.47pg/ml (4.6-72.5 pg/ml). The percentage of MDC and PDC was significantly lower in the periferal blood of patients with MM in comparison to healthy subjects (0.08% \pm 0.09% vs 0.21% \pm 0.02% and 0.04% \pm 0.03% vs 0.16% \pm 0.01%, respectively). A statistically significant difference was found between the percentage of MDC and PDC in the different stages. There was a negative correlation between MDC and PDC and the levels of beta-2-MG (p=0.02 and p=0.02), as well as between MDC and the IL6 levels (p=0.04). No correlation was found between MDC, PDC, levels of M-protein and the type of paraprotein.

CONCLUSION: Our results demonstrate the relationship between peripheral blood DC, IL6 and beta2-MG and confirm the published data for the inhibitory effect of the two factors on DC differentiation and maturation

in vitro. The monitoring of beta-2-MG and IL6 may have clinical implication as a predictor of the immune system status as well as for the yield of harvested DCs for vaccination.

№27. Iliana Micheva¹, Rosen Rachev, Hincó Varbanov, Vladimir Gerov, Liana Gercheva NOVEL APPROACHES IN THE CLASSIFICATION AND RISK ASSESSMENT OF PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROMES-CLINICAL IMPLICATION

INTRODUCTION: New prognostic systems have been proposed, aimed at improving the ability to predict survival and progression in myelodysplastic syndrome (MDS) patients, as well as to select the accurate therapy.

PURPOSE: The aim of this study was to determine the prognostic score for patients with MDS, diagnosed in the Hematology Clinic, University hospital, Varna, comparing different prognostic scoring systems.

MATERIALS AND METHODS: 92 patients with MDS, diagnosed between 2004 and 2012 were included in the study. The median age was 72 (20-91 years), 87% >60 years of age, 52 men and 41 women. The prognostic score was determined according to IPSS, WPSS, MDACSS. The parameters assessed were WHO type, karyotype, cytopenias, percentage of marrow blasts, age, performing status and transfusion dependence.

RESULTS: Cytogenetic studies were performed in 100% of patients. Abnormalities were found in 34.8%, the most common-del-5q (14.6%), -Y (4.5%), complex karyotype (8%), +8 (2.2%). Patients were distributed according to the cytogenetic risk -low-87.2%, intermediate-7.7%, high-5.1%. According to IPSS 41% of the patients were with low risk, 34%-Int-1, 16%-Int-2, high-9%. WPSS distributed the patients in 5 groups: very low-11%, low risk-43%, int-21%, high-20%, very high-5%. According to MDACSS 14% of the patients were with low, 54%-Int-1, 18%-Int2, 13% with high risk.

CONCLUSION: Significant correlation was found between the risk groups and AML transformation and survival. However, the comparison between the different scoring systems demonstrated the advantage of prognostic systems, based on a broader range of clinical parameters in better distribution of intermediate risk patients and the precise determination of high and very high risk.

№28. Iliana Micheva, Liana Gercheva, Panos Ziros, Nicholas ZoumbosERK, p38 AND NF-kappaB SIGNALING IN MONOCYTE DERIVED DENDRITIC CELLS IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME

We have previously demonstrated that in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) monocyte-derived DCs (MoDC) exhibit some phenotypic and functional abnormalities. However, the mechanisms underlying the defective response have not yet been clarified. Aim: In the present study three different signaling pathways, ERK, p38K and NF-κB, were studied on MoDC from patients with MDS. Materials and methods: 7 patients with MDS and 5 healthy controls were included in the study. MACS separated CD14 cells were cultured for DC generation and further stimulated with TNF-α and LPS. A migration assay and ELISA were performed for the analysis of migration and IL12p70 secretion. Western blot analysis was used for the detection of the phosphorylated forms of ERK and p38K. NFκB binding activity was evaluated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Results: In 6/7 patients the NF-κB binding activity in TNF-α and LPS stimulated MoDCs was lower compared to controls. This was accompanied by lower migratory capacity and IL-12p70 secretion. TNF-α and LPS induced phosphorylation of p38 and ERK at similar levels in control MoDC, whereas in MDS MoDC the pattern was heterogeneous with predominant activation of ERK over p38K. Conclusion: Our results provide strong evidence that defective signaling through NF-κB and MAPK underlies the functional abnormalities of MoDC in patients with MDS.

№29. Д. Герчева, А. Желязкова, Г. Балаценко. JAK2 МУТАЦИЯ И КЛИНИЧЕН ФЕНОТИП ПРИ BCR-ABL1 НЕГАТИВНИ ХРОНИЧНИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ „КЛАСИЧЕСКИ ТИП“

Мутацията JAK2V617F е най-често срещаното генетично събитие при BCR-ABL отрицателните хронични миелопролиферативни неоплазии (ХМН). Осъществени са много проучвания, целящи установяване на връзка между мутационния товар и клиничната картина при различните нозологични единици с твърде противоречиви резултати. Цел на настоящата работа е да се анализира зависимостта между JAK2V617F носителството от една страна и клиничната симптоматика, степента на риск и лабораторните отклонения – от друга. Проспективно са изследвани 131 пациенти на клиниката по хематология при УМБАЛ „Св. Марина“ Варна. Корелациите между мутационния товар и клиничните параметри са проследени при всяка една нозологична единица поотделно. Ние установихме по-високо носителство на JAK2V617F мутацията при пациентите с първична миелофиброза (в 70%), в сравнение с литературните данни. При всички нозологични единици се намери права корелационна зависимост между JAK2V617F мутационния товар и степента на риск при пациентите. Нивото на мутационния товар корелира стабилно с конституционалните симптоми при всички диагностични групи, като връзката е най-значима при хомозиготните носители с полицитемия вера (ПВ) и при първичната миелофиброза (ПМФ). При ПМФ и есенциалната тромбоцитемия (ЕТ) носителите на JAK2V617F са с подчертана левкоцитоза. Изразената симптоматика при JAK2V617F носителите във всички диагностични групи поставя въпроса за разширяване на индикациите за лечение с JAK2 инхибитори.

№30. И. Мичева, Вл. Геров, Р. Рачев, М. Мехмед, Л. Ангелова, Ц. Русева, Д. Герчева ЦИТОГЕНЕТИЧЕН ПРОФИЛ И ИЗХОД ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВТОРИЧНИ СВЪРЗАНИ С ТЕРАПИЯ МИЕЛОДИСПЛАЗИЯ И ОСТРА ЛЕВКЕМИЯ CYTOGENETIC

Вторичният, свързан с терапия миелодиспластичен синдром/остра миелоидна левкемия (т-МДС/ОМЛ) е състояние, което се появява след лечение на някои първични неоплазии като Болест на Хочкин, Нехочкинови лимфоми, саркоми, рак на гърдата, яйчников и тестикуларен карцином. Често изходът при т-МДС/ОМЛ е неблагоприятен в сравнение с de novo ОМЛ. Т-МДС/ОМЛ се характеризира с определени хромозомни аберации, често комплексен кариотип. В настоящото проучване анализирахме пациенти с МДС и ОМЛ, развили се след химио- и/или лъчетерапия по повод първична неоплазия. Включени са 13 пациента, диагностицирани и лекувани в Клиниката по Хематология, МБАЛ „Св. Марина“ в периода 2005-2013 година; 12 жени и 1 мъж с медиана на възрастта 67 години; 7 след рак на гърдата, 2 след овариален карцином, 1 след Болест на Хочкин, 1 след тиреоиден карцином, 1 след рак на ендометриум, 1 след спиноцелуларен карцином на устна. Медианата на латентния период от конвенционалната терапия до развитие на т-МДС/ОМЛ е 10 години (от 2 до 25 години). Пет от случаите са диагностицирани като МДС, а 8 като ОМЛ. Цитогенетичното изследване показва нормален кариотип при 4 от случаите, комплексен кариотип при 7 и del5q при един. Най-често повтарящите се аберации са del 5q, аномалии на 22 хромозома, монозомия 7. Пациентите са лекувани с ниски дози цитозар, хидроксиурея, 7+3, EMA, FLAG, Ida FLAG, GMALL. В нито един от случаите не е постигната ремисия. Медианата на преживяемостта е 4,5 месеца (0,5-8 месеца). Нашите резултати показват, че пациентите с т-МДС/ОМЛ имат неблагоприятен цитогенетичен профил, който определя и крайно неблагоприятния изход при тази група болни.

№31. Liana Gercheva, Antonina Zhelyazkova, Iliana Micheva, Neli Zgurova, Maria Tzaneva, Georgi Balatzenko CORRELATION BETWEEN JAK2V617F MUTATIONAL BURDEN AND THE DEGREE OF ANGIOGENESIS IN THE BONE MARROW OF BCR-ABL NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS.

JAK2V617F mutation is a well-recognized feature in most Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs). An activated bone marrow (BM) angiogenesis has been established in these disorders as well. Consequently, the rational question is to ascertain a possible relation among JAK2 mutation, morphological features and angiogenesis in MPNs bone marrow. Aim: To assess bone marrow microvessel density (MVD), bone marrow cellularity and fibrosis in newly diagnosed patients with BCR-ABL-negative MPNs, and define a correlation between the degree of angiogenesis in the bone marrow and JAK2V617F mutant allele burden. Methods: JAK2 mutational burden was determined by RT-PCR, BM angiogenesis was defined by MVD assessment using anti-CD34 for BM endothelium staining. The BM fibrosis was evaluated according to the Hanover system. The statistical analysis was performed with SPSS 17.0 software. 52 patients with newly diagnosed MPN were included in the study. Results: The distribution of the mutational burden was as follows: 26 patients with polycythaemia vera (PV), 16 patients with primary myelofibrosis (PMF) and 10 patients with essential thrombocythaemia (ET). In patients with PV the homozygosity was found prevalent in frequency whereas in PMF and ET the heterozygous variants were dominant. In all patients a significant positive correlations between JAK2V617F and BM MVD ($r=0.306$, $p<0.002$) and between MVD and fibrosis, ($r=0.523$, $p<0.0001$), was found. JAK2 correlated positively but borderline with fibrosis. The MVD and JAK2 burden were found in significant negative correlation with the BM cellularity ($r=-0.405$; $p<0.002$ and $r=-0.431$, $p<0.0001$, resp.). Conclusions: The significant correlation between JAK2V617F, BM angiogenic activity and the fibrosis marks out the JAK2 allele burden as a feasible parameter with prognostic significance for evolution and progression of MPN.

№32. И. Мичева, М. Пламенова, В. Геров, П. Колова и Л. Герчева. СЪЧЕТАНИЕ НА ПЪРВИЧНА МИЕЛОФИБРОЗА, МАРГИНАЛНО-ЗОНОВ НЕХОЧКИНОВ ЛИМФОМ И АМИЛОИДОЗА НА СЛЕЗКАТА – ДИАГНОСТИЧНО ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВО.

Резюме. Представяме случай на жена на 54 години с рядкото съчетание на първична миелофиброза (ПМФ) и нехочкинов лимфом (НХЛ). През 2011 година по повод астено-адинамия и прогресираща тежест в ляво подребрие е поставена диагноза ПМФ. Ехоскопията установява ексцесивна спленомегалия, костномозъчната биопсия-хиперцелуларен костен мозък с фиброза II степен, JAK2V617F мутацията е позитивна в периферна кръв. Три години по-късно е осъществена спленектомия като хистологичното изследване доказва наличие на маргинално-зонав НХЛ, амилоидоза и екстрамедуларна хематопоеза. Установено е едновременно протичане на ПМФ и НХЛ. Този случай е от интерес не само поради рядкото съчетание на тези две заболявания, но и поради неясното диагностично и прогностично значение на този феномен.

№33. Л. Герчева, И. Мичева, Вл. Геров, А. Желязкова, Х. Върбанов, Р. Рачев, Н. Ставрев КЛИНИЧНИ ПАРАМЕТРИ ЗА ОЦЕНКАТА НА ИЗХОДА ОТ ЛЕЧЕНИЕ НА ВЪЗРАСТНИ ПАЦИЕНТИ С ОСТРА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕВКЕМИЯ

Цел на проучването е да се установят достъпни в практическата ни дейност клинични прогностични показатели за изхода от лечение при възрастни пациенти с остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ). Анализирани са 50 пациента на възраст 18 – 72 г., диагностицирани и лекувани в Клиника по хематология при УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Възрастово разпределение: 42% под 35 г., 36% между 35 и 60 г. и 22% над 60 г. Значимо повисок процент ремисия се установява при изходен левкоцитен брой $<30 \times 10^9/\text{л}$. и при липсваща коморбидност ($p<0,001$). Найвисока средна преживяемост (съответно 17,5 и 15,7 месеца) се регистрира при преТ и преВ ОЛЛ. Найефективен индукционен протокол е LALA94, следван от VFM. Пълна ремисия е постигната в 81,8% от лекуваните пациенти, а неуспех от лечението се установява в 18,2%. Свободната от заболяемост преживяемост е найпродължителна при протокол GMALL 04/09 – 11,7 месеца ($p<0.05$). Честотата на ранната смъртност е по висока в групата

до 35 г., факт който остава необясним. Високият процент ранна смъртност в групата под 35 години се свързва с инфекции, кървене, късно поставяне на диагнозата и недостатъчна поддържаща терапия.

№34. Liana Gercheva, Stela Dimitrova, Iliana Micheva IMPACT OF THE IMPAIRED IRON HOMEOSTASIS ON THE PATHOGENESIS OF ANEMIA IN PRIMARY MYELOFIBROSIS

Anemia is a well established prognostic factor in primary myelofibrosis (PMF). Recent data suggests that markers of abnormal iron homeostasis, which are known to be affected by both iron overload and inflammation, may be involved in the pathogenesis of anemia in PMF. Aim: To evaluate the relation between anemia, bone marrow fibrosis, prognostic score, survival and parameters of iron metabolism. Materials and methods: We studied 72 patients with PMF. The following parameters were analyzed: degree of bone marrow fibrosis, hemoglobin level, MCV, components of iron homeostasis (total iron binding capacity (TIBC), ferritin, serum iron). The prognostic score was determined according to IPSS and DIPSS. Statistical analysis was performed by SPSS version 19. Results: We found significant correlation between the level of hemoglobin and degree of bone marrow fibrosis and prognostic score. The MCV was analyzed in 56 of the patients and was found low in 9,5 % of them. However, there was no significant correlation between degree of fibrosis and the lower MCV. We found significant straight correlation between degree of fibrosis, serum ferritin level ($p=0.006$) and TIBC ($p=0.018$). In univariate analysis, significant feedback correlation was established between hemoglobin and serum ferritin level. Conclusion: Our results reveal the possible role of the impaired iron metabolism in the pathogenesis of anemia in PMF. Further studies are needed in order to elucidate the precise mechanisms of this process.

№35. I Micheva, T Chervenkov, C Ruseva, L Gercheva CHRONIC MYELOMONOCYTIC LEUKEMIA REVIEW AND CLINICAL EXPERIENCE OF THE HEMATOLOGY DEPARTMENT UMHAT “ST. MARINA” VARNA.

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a rare de novo myeloid neoplasm that exhibits dysplastic and proliferative features at presentation. The diagnosis is problematic with several specific controversial issues. Aim: To analyze the cases with CMML diagnosed in the Hematology clinic, UMHAT “St. Marina”, Varna with assessment of risk, prognosis and survival. Materials and methods: The results from cytology, flow cytometry, histology, and genetics are re-estimated. For the risk stratification the CPSS was used. The statistical analysis is performed using SPSS 19. Results: Fifteen patients with CMML, 12 men and 3 women, with median age of 69,8 years were included in the study. According to the leukocyte count 12 were myeloproliferative (CMML/MP) and 3 myelodysplastic CMML (CMML/MD). The flow cytometry of peripheral blood and bone marrow was characterized by CD14, CD64, CD16 and CD56 expression. According to the histology of the bone marrow 2 cases were described as MDS, 1 as MDS/MPN, the rest as MPN with fibrosis in two of the cases. The cytogenetic risk was high in 5 patients and low in 10. According to CPSS one patient was with low risk, 3 with intermediate 1, 9 with intermediate 2 and 2 with high risk. Acute myeloid leukemia transformation occurred in 9 patients within median period of 13.1 months. The median survival after transformation was 2,5 months. The median survival in the whole group was 21.4 months. Conclusion: CMML is an aggressive disease. The prognosis of patients with CMML is poor, with low survival and high risk of transformation. The therapeutic options are limited.

№36. Горанова-Маринова В., Игнатова К., Ганева П., Спасов Е, Мичева И, Радинов А., Петрова Р, Цветкова Г., Хаджиев Е., Горанов Ст. и Герчева Л. РЕЗУЛТАТИ ОТ ЛЕЧЕНИЕТО С BRENTUXIMAB VEDOTIN ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХОДЖКИНОВ ЛИМФОМ – БЪЛГАРСКИЯТ ОПИТ

Въведение: Пациентите с Ходжкинов лимфом (ХЛ), при които болестта рецидивира след трансплантация на хемопоеитични стволови клетки (ТХСК) и тези с рефрактерно заболяване, имат лоша прогноза и кратка преживяемост. Въвеждането в клиничната практика на Brentuximab Vedotin (BV) подобри терапевтичния отговор, удължи времето до прогресия и увеличи общата преживяемост на тези високорискови болни. Цел: Да се анализират честотата, видът и продължителността на терапевтичния отговор (EFS), и прогностичните фактори за тях, при пациенти с Ходжкинов лимфом, лекувани с Brentuximab Vedotin (BV). Материал и методи: Проучени са 44 пациенти с Ходжкинов лимфом, лекувани с BV в 5 хематологични клиники в страната. Съотношението мъже / жени е 1.1/1,0, средната възраст – 39.98 ± 12.48 г. Най-честият хистологичен вариант е нодуларна склероза 31(70.5%). Във II клиничен стадий са 13 пациента (29.5%), в III-16 (36.4%), в IV-15 (34.1%). С В-симптоми са 36 пациента (81.8%), с екстранодално ангажиране – 17 (15.9%) и с голяма медиастинална туморна маса – 14 (31.8%). Всички болни преди лечението с BV са преминали 2 линии терапия, 50.0% 3 линии, 27.3% 4 линии, а 9.1% – ≥ 5 линии. Стволовоклетъчна трансплантация е осъществена при 33 пациента (75.0%), като при двама от тях са проведени две автоложни СКТ, а при един – авто/ало СКТ. Резултати: При 24 от болните (60.0%) е постигнат терапевтичен отговор: пълен отговор при 10 (25.0%) и частичен при 14 (35.0%). От пациентите без постигнат терапевтичен отговор стабилна болест се регистрира при 7 (17.5%) и прогресия при 9 (22,5%). Пациентите, постигнали поне частичен терапевтичен отговор преди започване на лечението с BV значимо по-често задълбочават или задържат този отговор в края на лечението: 15 (62.5%) спрямо 9 (37.5%), които са с предшестваща прогресия и стабилна болест ($P < 0.05$, $R = +0.496$). PFS за цялата група е 10 мес. Медиана на преживяемост (MS) не е достигната до края на проучването. Възрастта, полът, хистологичният вариант, клиничният стадий, броят линии лечение и видът на предшестващите терапевтични режими не повлияват продължителността на PFS. Единственият, значим прогностичен фактор, който определя достоверно по-дълга ремисия е качественият терапевтичен отговор: в групата с CR+PR до момента на анализа PFS не е достигната, докато при пациентите със стабилна болест или прогресия тя е 7 мес ($P < 0.001$). Заключение: BV е ефективен медикамент с управляема токсичност. Резултатите от лечението на нашите пациенти потвърждават натрупания международен опит. Допълнителният терапевтичен отговор и удължената преживяемост без прогресия дават шанс на доскоро обречените пациенти с Ходжкинов лимфом.

№37. Antonio Antonov, Liana Gercheva, Nadezhda Stefanova, Maria Tzaneva, Trifon Chervenkov
Evaluation of the correlation between JAK2V617F, leucocytosis and thrombogenic risk in patients with Polycythemia vera and Essential thrombocythemia.

Thrombotic events (TE) are the most common, debilitating and fatal complications in Polycythemia Vera (PV) and Essential Thrombocythemia (ET). Approximately 20% of patients have experienced TE at the time of diagnosis. The subsequent cumulative incidence of non-fatal thrombosis is 3.8 incidents/100 patients / year [1, 2]. The risk stratification divides patients by age and a history of thrombosis. There is controversy in the literature about the impact of JAK2 V617F allele burden and changes in peripheral blood counts on the TE frequency. Aim: The aim of this study is to evaluate the influence of JAK2 V617F allele burden and changes in leukocyte count on the development of thrombotic events in patients with PV and ET. Methods: We performed a retrospective analysis of the data of 96 patients with PV and 43 patients with ET diagnosed according to the WHO criteria. JAK2 mutational burden was determined by RealTime-PCR. The statistical analysis was performed with SPSS 19.0 software. Results: In the group of PV patients, thrombotic events were recorded in 46 patients. We did not find a correlation between higher levels of allelic JAK2 V617F burden and frequency of TE. Clinically, patients with a higher mutational burden had more pronounced splenomegaly. There was no correlation between leukocytosis at the diagnosis and the number of TE, but there was a significant correlation between leukocytosis and the presence of splenomegaly. In the group of ET patients (43) we established TE in 13 of them, and 54% were carriers of JAK2 V617F. There was no relationship between the frequency of TE and the increased leukocyte count. Unlike PV patients, the presence of JAK2

V617F \geq 50% was associated with pronounced leukocytosis in the group with ET patients. Conclusions: The allelic burden of JAK2 V617F and the leukocytosis level are prothrombogenic, but are not a predetermining factor for thrombosis. The current risk stratification criteria for PV and ET, although common, reflect the complexity of thrombotic complications. Clotting mechanisms are different not only in both diseases but also in different parts of the vascular system within each disease. More studies are needed involving the functional state of the vascular system to help differentiate individual arterial and venous thrombotic index for each disease.

**№38. *Ilina Micheva, Vladimir Gerov, Stela Dimitrova, Merlin Efraim, Liana Gercheva*
**OUTCOME AFTER AZACITIDINE TREATMENT IN PATIENTS WITH HIGH-RISK
MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN THE CLINIC OF
HEMATOLOGY AT ST. MARINA UNIVERSITY HOSPITAL,****

INTRODUCTION: Hypomethylating agents have become a standard therapy for high-risk myelodysplastic syndromes (MDS) and elderly patients with acute myeloid leukemia (AML). AIM: The aim of the study was to assess the efficacy of azacitidine treatment in patients with MDS and AML followed for 18 months. MATERIALS AND METHODS: Twenty-seven patients with MDS and AML treated in the Clinic of Hematology at St. Marina University Hospital, Varna were included in the study. Azacitidine was administered subcutaneously at a dose of 75 mg/m² for 7 days. Disease assessment was performed on the 3rd month, 6th month, and at progression. RESULTS: Twenty-seven patients were analyzed. Their median age was 71.5 years. Nine had refractory anemia with excess of blasts II (RAEB II), 5 had chronic myelomonocytic leukemia II (CMML II), 1 was with unclassifiable MDS (MDS-U), and 12 with AML. The median number of administered cycles was 6 (1-19). Eleven patients completed 6 cycles of azacitidine. Partial response was achieved in 9 patients (33%) (7 MDS and 2 AML), stable disease in 8 (29%) (5 MDS and 3 AML). Progressive disease was observed in 10 patients (37%). The response correlated with the type of the disease (p=0.03), cytogenetic risk (p=0.01), and survival (p=0.000). At 18 months, 60% of MDS patients were alive compared to 41.7% in the AML group. The median time to death in the AML patient group was 2.5 months. The mean overall survival was 10.4 months (12.6 months for MDS patients and 5.4 months for AML patients). CONCLUSION: The therapy with azacitidine is an option for elderly patients with high-risk MDS. In patients with AML a rapid progression is observed during the first two cycles with mortality rate of 58.

**Резюмена на публикации в международни периодични издания с импакт
фактор**

**№39. *Daniela I. Gerova, Vladimir T. Gerov, Tatyana M. Yankova, Liana T. Gercheva, Diana G. Ivanova*
**Cytostatic therapy and blood antioxidants/prooxidants balance in acute myeloblastic
leukemia patients****

To analyze the effects of conventional polychemotherapy of acute myeloblastic leukemia (AML) patients on the prooxidants/antioxidants balance in plasma total antioxidant status (TAS) and asingleplasmaantioxidant-uricacid (UA)were measured. Lipidperoxidation was assessed by malonedialdehyde (MDA) content. Total serum iron was monitored as a potential source of nontransferrin-bound iron with a role in initiation of oxidative burst. A group of patients in the acute phase of AML (group A) and a group of patients in complete remission of AML (group B) were studied. A strong correlation between UA values and TAS (r = 0.8 for group A, r = 0.9 for group B) was revealed in the course of the treatment. Strong negative correlation (r = -0.9) between TAS and MDA was shown for both groups. Total iron significantly increased in the course of chemotherapy. We have established that polychemotherapy leads to the consumption of antioxidants and

increased lipid peroxidation in AML patients. An appropriate supplementation with antioxidants at the end of the polychemotherapy treatment could be considered.

№40. A. G. Zhelyazkova, A. B. Tonchev, P. Kolova, L. Ivanova and L. Gercheva Prognostic significance of hepatocyte growth factor and microvessel bone marrow density in patients with chronic myeloid leukaemia

The aims of the study were: (1) to perform a complex angiogenic assessment in chronic myeloid leukaemia (CML) patients using multiple parameters: bone marrow microvessel density (MVD), bone marrow immunohistochemical cellular expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor KDR, as well as hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor MET, and the plasma VEGF and HGF; and (2) to determine the clinical significance of these factors for patients with CML. Material and methods. The VEGF and HGF plasma levels were analysed by ELISA in 38 newly diagnosed CML patients. Immunohistochemical methods were used to visualize the MVD as well as the cellular VEGF/KDR and HGF/MET expression. Results. We found an increased MVD, cellular VEGF/KDR and HGF/MET expression and elevated plasma VEGF and HGF in CML patients. The plasma HGF, cellular HGF and MET expression correlated with the CML phase. The plasma HGF correlated with all markers reflecting the tumour burden (leucocytes, blast percentage, splenomegaly and LDH) as well as with the phase of CML and overall survival of the patients. Cox regression analysis determined the prognostic relevance of HGF and MVD parameters, but not for the plasma VEGF and cellular VEGF and KDR. Conclusions. Using a complex angiogenic assessment we determined an increased angiogenesis in CML patients. No prognostic relevance was found for VEGF plasma levels or VEGF/KDR cellular bone marrow expression. The increased cellular HGF and MET expressions could be considered highrisk factors for these patients. Plasma HGF and MVD were shown to be independent prognostic parameters for patients' survival.

№41. Paula Lazarova, Gunnar Kvalheim, Liana Gercheva, Krassimir Metodiev Experimental attempt to produce mRNA transfected dendritic cells derived from enriched CD34+ blood progenitor cells

Peripheral blood progenitor enriched CD34+ cells (PBPC) are rather often used as stem cell background in cancer patients following high dose therapy. Keeping in mind that precursor dendritic cells (DCs) originate from haematopoietic progenitor cells, purified CD34+ cells might also serve as starting cells for ex- vivo production of DC. The aim of the present study is to develop a clinical grade procedure for ex- vivo production of DC derived from enriched CD34+ cells. Various concentrations of CD34+ cells were grown in gas-permeable Teflon bags with different serum-free and serum-containing media supplemented with GM-CSF, IL-4, TNF- α , SCF, Flt-3L and INF- α . Serum-free CellGroSCGM medium for 7 days followed by CellGroDC medium in 7 days gave equal results as serum-containing medium. Following incubation, the cultured cells containing immature DCs were concentrated and transfected with tumour mRNA from human prostate cancer cell lines employing a highly efficient electroporation procedure. Thawed transfected DCs were able to elicit primary T-cell responses in vitro against antigens encoded by the prostate cancer mRNA as shown by ELISPOT assay using mock-transfected DCs as control. The results of our study show that frozen enriched CD34+ cells can be an alternative and efficient source for production of DCs for therapeutic purpose.

№42. Wolfgang U. Knauf, Toshko Lissichkov, Ali Aldaoud, Anna Liberati, Javier Loscertales, Raoul Herbrecht, Gunnar Juliusson, Gerhard Postner, Liana Gercheva, Stefan Goranov, Martin Becker, Hans-Joerg Fricke, Françoise Hugué, Ilaria Del Giudice, Peter Klein, Lothar Tremmel, Karlheinz Merkle, and Marco Montillo Phase III Randomized Study of Bendamustine Compared With Chlorambucil in Previously Untreated Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia

This randomized, open-label, parallel-group, multicenter study was designed to compare the efficacy and safety of bendamustine and chlorambucil in previously untreated patients with advanced (Binet stage B or C) chronic lymphocytic leukemia (CLL). Patients and Methods Patients (≤ 75 years of age) were randomly assigned to receive bendamustine 100 mg/m²/d intravenously on days 1 to 2, or chlorambucil 0.8 mg/kg (Broca's normal weight) orally on days 1 and 15; treatment cycles were repeated every 4 weeks for a maximum of six cycles. The response to treatment was assessed according to National Cancer Institute Working Group criteria, and the final determination of response was made by a blinded independent review committee. Results A total of 319 patients were randomly assigned (162 bendamustine, 157 chlorambucil). Complete or partial response were achieved in 110 (68%) of 162 bendamustine-treated and 48 (31%) of 157 chlorambucil-treated patients ($P < 0.0001$). More patients showed complete responses with bendamustine than with chlorambucil (31% v 2%). Median progression-free survival was 21.6 months with bendamustine and 8.3 months with chlorambucil ($P < 0.0001$). Bendamustine was also associated with an improvement in duration of remission, compared with chlorambucil (median, 21.8 v 8.0 months). Hematologic National Cancer Institute Common Toxicity Criteria grade 3 to 4 adverse events were more common with bendamustine than with chlorambucil (occurring in 40% v 19% of patients). Severe infections (grade 3 to 4) occurred in 8% of bendamustine-treated patients and 3% of chlorambucil-treated patients. Conclusion Bendamustine offers significantly greater efficacy than chlorambucil, and a manageable toxicity profile, when used as first-line therapy in patients with advanced CLL.

№43. J. A. AZNAR, N. CABRERA, M. MATYSIAK, K. ZAWILSKA, L. GERCHEVA, A. ANTONOV, M. MONTAN E ' S, A. M. PA ' EZ and T. LISSITCHKOV Pharmacokinetic study of a high-purity factor IX concentrate (Factor IX Grifols) with a 6-month follow up in previously treated patients with severe haemophilia B

Optimal replacement treatment in haemophilia B patients requires a good understanding of the pharmacokinetics of factor IX (FIX). The aim of this study was to compare the pharmacokinetic profile of Factor IX Grifols, a highly purified human FIX concentrate with two specific pathogen inactivation/removal steps, to that of available FIX preparations. The study was an open, non-randomized trial including 25 male subjects older than 12 years of age with severe haemophilia B. Pharmacokinetic profile of the FIX preparation regularly used by the subjects was determined as control. Pharmacokinetic profile of Factor IX Grifols was determined twice, one 7–15 days after control assessment and second after a 6 months period had elapsed. Results showed that all products had peak plasma levels of FIX:C within 30 min. Mean recovery was 1.3 ± 0.3 IU dL⁻¹ per IU kg⁻¹ for Factor IX Grifols and 1.0 ± 0.3 IU dL⁻¹ per IU kg⁻¹ for control products ($P < 0.001$). The mean terminal half-life ($t_{1/2}$) for Factor IX Grifols was 26.7 h and 26.8 h for control product. Pharmacokinetic parameters after 6 months of treatment with Factor IX Grifols did not statistically differ from the parameters obtained with the first infusion. There were no adverse events related to Factor IX Grifols for the duration of the study. In conclusion, Factor IX Grifols has adequate pharmacokinetic properties comparable to the control plasma-derived FIX and these parameters remain stable after 6 months of treatment. Factor IX Grifols can be an effective and safe plasma-derived FIX concentrate for replacement therapy in haemophilia B patients.

№44. T. LISSITCHKOV, M. MATYSIAK, K. ZAWILSKA, L. GERCHEVA, A. ANTONOV, M. MONTAN ES and A. PAEZ An open clinical study assessing the efficacy and safety of Factor IX Grifols, a high-purity Factor IX concentrate, in patients with severe haemophilia B

Factor IX Grifols is a new high-purity plasma-derived FIX concentrate with two specific pathogen elimination steps. Until this study was performed, there were no detailed reports with an adequate number of patients on the clinical evaluation of this product. To determine the efficacy and safety of Factor IX Grifols for replacement therapy in previously treated patients with severe haemophilia B. This open, multicentre and non-

randomized study included 25 male subjects over the age of 12 with severe haemophilia B. Patients underwent prophylaxis and treatment of bleeding episodes with Factor IX Grifols for 1 year. The clinical efficacy and safety of this product were assessed. Forty percentage of the patients were children and adolescents (12–17 years old). During the 12 months follow-up, 1 446 000 IU of Factor IX Grifols were administered in 961 infusions (range 12–83 infusions per patient): 31% for prophylaxis and 69% for bleeding episodes. Only five major bleeding events were reported in two patients. These haemorrhages were successfully treated with a mean of 2900 IU per bleed (range 1500–4000 IU), and 1–3 infusions per bleed. The average time elapsed from the first infusion to resolution of bleeding was 43 h (median). Overall, haemostasis was rated as excellent or good by the investigator in 96% of the infusions. No product-related adverse events were reported. Factor IX Grifols is an effective and safe Factor IX concentrate and can be considered as a first line option for replacement therapy in haemophilia B patients.

№45. *Andreas L. Petzer, Dominik Wolf, Dominic Fong Thomas Lion, Irina Dyagil,4 Zvenyslava Masliak Andrija Bogdanovic, Laimonas Griskevicius, Sandra Lejniece, Stefan Goranov, Liana Gercheva, Aleksandar Stojanovic, Dontcho Peytchev, Nikolay Tzvetkov, Rasa Griniute, Radka Oucheveva, Hanno Ulmer,16 Marthin Kwakkelstein, Francesca Rancati,18 and Guenther Gast Central European Leukemia Study Group (CELSG) High-dose imatinib improves cytogenetic and molecular remissions in patients with pretreated Philadelphia-positive, BCR-ABL-positive chronic phase chronic myeloid leukemia: first results from the randomized CELSG phase III CML 11 “ISTAHIT” study*

Imatinib 400 mg/day is the standard treatment for patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. Recent reports suggested higher and more rapid cytogenetic and molecular responses with higher doses of imatinib.

Design and Methods In this prospective international, multicenter phase III study, 227 patients with pre-treated Philadelphia chromosome-positive, BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia were randomized to a standard-dose imatinib arm (400 mg/day) or a high-dose imatinib arm (800 mg/day for 6 months followed by 400 mg/day as maintenance therapy). In this planned interim analysis hematologic, cytogenetic and molecular responses as well as toxicity were evaluated.

Results Compared to the standard-dose, high-dose imatinib led to higher rates of major and complete cytogenetic responses at both 3 months (major: 21% versus 37%, $P=0.01$; complete: 6% versus 25%, $P<0.001$) and 6 months (major: 34% versus 54%, $P=0.009$; complete: 20% versus 44%, $P<0.001$). This was paralleled by a significantly higher major molecular response rate at 6 months in the high-dose imatinib arm (11.8% versus 30.4%; $P=0.003$). At 12 months, the rates of major cytogenetic response (the primary end-point) were comparable between the two arms (57% versus 59%). In contrast to non-hematologic toxicities, grade 3/4 hematologic toxicities were more common in the high-dose arm. Cumulative complete cytogenetic response rates were higher in patients without dose reduction in the high-dose arm (61%) than in the patients with no dose reduction in the standard-dose arm (36%) ($P=0.014$).

Conclusions This is the first randomized phase III trial in patients with pre-treated chronic phase chronic myeloid leukemia demonstrating improvements in major cytogenetic response, complete cytogenetic response and major molecular response rates with high-dose imatinib therapy (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00327262).

№46. *T. LISSITCHKOV, M. MATYSIAK, K. ZAVILSKA, P. ŁAGUNA, L. GERCHEVA, A. ANTONOV, N. CABRERA, J. A. AZNAR, M. K. WOODWARD and A. PA EZ. A clinical study*

assessing the pharmacokinetics, efficacy and safety of AlphaNine, a high-purity factor IX concentrate, in patients with severe haemophilia B

Effective treatment with factor IX (FIX) requires a thorough consideration of the properties of the concentrate to be used as replacement therapy, to date, the only available treatment for haemophilia B. The aim of the study was to determine the pharmacokinetics, clinical efficacy and safety in routine clinical use of AlphaNine, a high-purity human FIX concentrate. This open, single-arm, multicentre, non-randomized trial included 25 subjects (age \geq 12) with moderate/severe haemophilia B. Pharmacokinetics was assessed at baseline and after a 6-month follow-up. The degree of haemostasis control achieved was evaluated during a 12-month follow-up. Safety was evaluated in terms of tolerance, thrombogenicity, immunogenicity and viral safety. Mean recovery was 1.01 ± 0.19 IU dL⁻¹ per IU kg⁻¹ at baseline and 1.23 ± 0.34 IU dL⁻¹ per IU kg⁻¹ 6 months later. Terminal half-life was 34.5 ± 6.2 h and 33.7 ± 5.4 h, respectively. Ratios of each parameter between the two pharmacokinetic studies were all close to 1. A total of 1,576,890 IU AlphaNine were administered in 889 infusions (mean dose per infusion: 1774 IU; 3.2 infusions per month per patient). The main reasons for infusion were mild/moderate bleeding (62.3%) and prophylaxis (20.5% continuous, 15.6% intermittent). Overall, 93.0% of the efficacy assessments were rated as excellent/good and 88.8% of bleedings resolved after the first infusion. Twenty-one adverse events were reported in eight patients, none of which was considered related to the study medication. AlphaNine show eda pharmacokinetic profile in agreement with that of other plasma-derived FIX concentrates and provides safe and clinically effective substitution therapy for patients with haemophilia B.

№47. Thomas Elter, Liana Gercheva-Kyuchukova, Halyna Pylypenko, Tadesuz Robak, Branimir Jaksic, Grigoriy Rekhman, Slawomira Kyrz-Krzemień, Mykola Vatutin, Jingyang Wu, Cynthia Sirard, Michael Hallek, Andreas Engert Fludarabine plus alemtuzumab versus fludarabine alone in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia: a randomised phase 3 trial

Background Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is an incurable and chronic disorder, with worsening prognosis for patients as their disease progresses. We compared the efficacy and safety of the combination of fludarabine and alemtuzumab with fludarabine monotherapy in previously treated patients with relapsed or refractory CLL.

Methods Patients (aged \geq 18 years) with CLL Binet stage A, B, or C or Rai stages I–IV were randomly assigned in a 1:1 ratio according to a computer-generated allocation schedule to open-label combination treatment (fludarabine 30 mg/m² per day and alemtuzumab 30 mg per day on days 1–3) or monotherapy (fludarabine 25 mg/m² on days 1–5) by use of an interactive voice response system. Both regimens were given intravenously for a maximum of six 28-day cycles. The primary endpoint was progression-free survival (PFS). Analysis was by intention to treat. This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00086580.

Findings Fludarabine plus alemtuzumab (n=168) resulted in better PFS than did fludarabine monotherapy (n=167; median 23.7 months [95% CI 19.2–28.4] vs 16.5 months [12.5–21.2]; hazard ratio 0.61 [95% CI 0.47–0.80]; p=0.0003) and overall survival (median not reached vs 52.9 months [40.9–not reached]; 0.65 [0.45–0.94]; p=0.021) compared with fludarabine alone. All-cause adverse events occurred in 161 (98%) of 164 patients in the combination treatment group and 149 (90%) of 165 in the fludarabine alone group. Patients in the fludarabine plus alemtuzumab group had more cytomegalovirus events (23 [14%] vs one [$<$ 1%]) and grade 1 or 2 potentially alemtuzumab infusion-related adverse reactions (102 [62%] vs 22 [13%]). Grade 3 or 4 toxicities in the combination treatment and monotherapy groups were leucopenia (121 [74%] of 164 vs 55 [34%] of 164), lymphopenia (149 [94%] of 158 vs 53 [33%] of 161), neutropenia (93 [59%] of 157 vs 110 [68%] of 161), thrombocytopenia (18 [11%] of 164 vs 27 [17%] of 163), and anaemia (14 [9%] of 163 vs 28 [17%] of 164). The incidence of serious adverse events was higher in the combination treatment group (54

[33%] of 164 vs 41 [25%] of 165); deaths due to adverse events were similar between the two groups (ten [6%] vs 12 [7%]).

Interpretation The combination of fludarabine and alemtuzumab is another treatment option for patients with previously treated CLL.

№48. Andreas L. Petzer, Dominic Fong, Thomas Lion, Irina Dyagil, Zvenyslava Masliak, Andrija Bogdanovic, Laimonas Giskevicius, Sandra Lejniece, Stefan Goranov, Liana Gercheva, Aleksandar Stojanovic, Dontcho Peytchev, Nikolay Tzvetkov, Rasa Griniute, Atanas Stanchev, Thomas Grubinger, Marthin Kwakkelstein, Peter Schuld, Guenther Gastl, and Dominik Wolf
High-dose imatinib induction followed by standard-dose maintenance in pre-treated chronic phase chronic myeloid leukemia patients – final analysis of a randomized, multicenter, phase III trial

Central European Leukemia Study Group (CELSG)

Background Previous data suggest that the response of chronic myeloid leukemia cells to imatinib is dose-dependent. The potential benefit of initial dose intensification of imatinib in pre-treated patients with chronic phase chronic myeloid leukemia remains unknown.

Design and Methods Two hundred and twenty-seven pre-treated patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase were randomly assigned to continuous treatment with a standard dose of imatinib (400 mg/day; n=113) or to 6 months of high-dose induction with imatinib (800 mg/day) followed by a standard dose of imatinib as maintenance therapy (n=114).

Results The rates of major and complete cytogenetic responses were significantly higher in the high-dose arm than in the standard-dose arm at both 3 and 6 months (major cytogenetic responses: 36.8% versus 21.2%, P=0.01 and 50.0% versus 34.5%, P=0.018; complete cytogenetic responses: 22.8% versus 6.2%, P<0.001 and 40.4% versus 16.8%, P<0.001) on the basis of an intention-to-treat analysis. At 12 months, the difference between treatment arms remained statistically significant for complete cytogenetic responses (40.4% versus 24.8%, P=0.012) but not for major cytogenetic responses (49.1% versus 44.2%, P=0.462). The rate of major molecular responses was also significantly better at 3 and 6 months in the high-dose arm (month 3: 14.9% versus 3.5%, P=0.003; month 6: 32.5% versus 8.8%, P<0.001). Overall and progression-free survival rates were comparable between arms, but event-free survival was significantly worse in the high-dose arm (P=0.014).

Conclusions Standard-dose imatinib remains the standard of care for pre-treated patients with chronic phase chronic myeloid leukemia (Clinicaltrials.gov identifier: NCT00327262).

№49. Wolfgang U. Knauf, Toshko Lissitchkov, Ali Aldaoud, Anna M. Liberati, Javier Loscertales, Raoul Herbrecht, Gunnar Juliusson, Gerhard Postner, Liana Gercheva, Stefan Goranov, I Martin Becker, Hans-Joerg Fricke, Françoise Hugué, Ilaria Del Giudice, Peter Klein, Karlheinz Merkle and Marco Montillo.
Bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia: updated results of a randomized phase III trial

The efficacy of bendamustine versus chlorambucil in a phase III trial of previously untreated patients with Binet stage B/C chronic lymphocytic leukaemia (CLL) was re-evaluated after a median observation time of 54 months in May 2010. Overall survival (OS) was analysed for the first time. At follow-up, investigator-assessed complete response (CR) rate (21.0% vs 10.8%), median progression-free survival (21.2 vs 8.8 months; P <

0.0001; hazard ratio 2.83) and time to next treatment (31.7 vs 10.1 months; $P < 0.0001$) were improved for bendamustine over chlorambucil. OS was not different between groups for all patients or those 65 years, >65 years, responders and non-responders. However, patients with objective response or a CR experienced a significantly longer OS than non-responders or those without a CR. Significantly more patients on chlorambucil progressed to second/further lines of treatment compared with those on bendamustine (78.3% vs 63.6%; $P = 0.004$). The benefits of bendamustine over chlorambucil were achieved without reducing quality of life. In conclusion, bendamustine is significantly more effective than chlorambucil in previously untreated CLL patients, with the achievement of a CR or objective response appearing to prolong OS. Bendamustine should be considered as a preferred first-line option over chlorambucil for CLL patients ineligible for fludarabine, cyclophosphamide and rituximab.

№50. M. J. MANCO-JOHNSON, C. L. KEMPTON, M. T. REDING, T. LISSITCHKOV, S. GORANOV, L. GERCHEVA, L. RUSEN, M. GHINEA, V. USCATESCU, V. RESCIA and W. HONG Randomized, controlled, parallel-group trial of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII in adults with severe hemophilia A (SPINART)

Background: The benefits of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with factor VIII products have not been evaluated in controlled clinical trials in older patients with hemophilia A. Objectives: To report results from a preplanned analysis of data from the first year of the 3-year SPINART study, which compares routine prophylaxis with on-demand treatment with sucroseformulated recombinant FVIII (rFVIII-FS). Patients/Methods: SPINART is an open-label, randomized, controlled, parallel-group, multinational trial. Males aged 12–50 years with severe hemophilia A, 150 days of exposure to FVIII, no FVIII inhibitors, no prophylaxis for > 12 consecutive months in the past 5 years and 6–24 bleeding episodes in the preceding 6 months were randomized 1 : 1 to rFVIII-FS prophylaxis (25 IU kg⁻¹, three times weekly) or on-demand treatment. The primary efficacy endpoint, number of total bleeding episodes in the intent-to-treat population, was analyzed after the last patient had completed 1 year of follow-up. A negative binomial model was used for the primary endpoint analysis; analysis of variance was used for confirmatory analysis of annualized bleeding rates. Results: Eighty-four patients were enrolled and analyzed ($n = 42$ per group; mean age, 30.6 years; median treatment duration, 1.7 years). The median number of total bleeding episodes and total bleeding episodes per year were significantly lower with prophylaxis than with on-demand treatment (total, 0 vs. 54.5; total per year, 0 vs. 27.9; both $P < 0.0001$). No treatment-related adverse events occurred, and no patients developed FVIII inhibitors. Conclusions: Routine prophylaxis with rFVIII-FS leads to a significant reduction in bleeding as compared with on-demand treatment. Adverse events were consistent with the established rFVIII-FS safety profile.

№51. T. LISSITCHKOV, M. MATYSIAK, K. ZAVILSKA, P. LAGUNA, L. GERCHEVA, A. ANTONOV, A. MORET, P. CAUNEDO, J. A. AZNAR, M. K. WOODWARD and A. P. AEZ Head-to-head comparison of the pharmacokinetic profiles of a high-purity factor IX concentrate (AlphaNine) and a recombinant factor IX (BeneFIX) in patients with severe haemophilia B

Head-on comparative studies of factor IX (FIX) concentrates performed under standardized conditions are rarely conducted regardless of being a valuable instrument guiding health care providers towards better informed and cost-effective decisions. This study is an extension of a multicentre study that assessed the efficacy, safety and pharmacokinetics (PK) of AlphaNine in 25 previously treated patients with severe haemophilia B (FIX:C < 2%). After a washout period >7 days following the last PK performed with AlphaNine after a dose of 65–75 IU kg⁻¹, an identical PK study was performed with BeneFIX on 22 of the same patients. Venous blood samples for analysis were taken at baseline and at 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72

and 74 h post infusion. The outcomes of the comparison of the PK parameters were as follows: Mean (SD) in vivo recovery (IVR) was 1.3 - 0.4 IU dL¹ per IU kg¹ for AlphaNine and 1.0 - 0.3 IU dL¹ per IU kg¹ for BeneFIX (P < 0.01). Mean terminal half-life, mean residence time, area under the curve, clearance and volume of distribution of BeneFIX were 36.0 - 12.8 h, 39.3 - 13.9 h, 1631 - 467 IU h dL¹, 0.046 - 0.01 dL kg¹ min⁻¹ and 1.75 - 0.52 mL kg⁻¹ respectively. These values were not significantly different to those observed in AlphaNine, although BeneFIX displayed higher than expected IVR values and lower than expected clearance values. In conclusion, AlphaNine showed a comparable half-life, but an IVR significantly higher than that of BeneFIX. This dissimilarity may have implications on dosing requirements for on-demand treatment regimes affecting optimal resource allocation.

№52. Manco-Johnson MJ, CL. Kempton, MT. Reding, S. Goranov, L. Gercheva, L. Rusen, V. Uscatescu, M. Pierdominici, D. Walter, H. Walter. 3-year results from SPINART: prophylaxis vs on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII. Haemophilia. 2014 May;20(Suppl 3):96-101. <https://insights.ovid.com/haemophilia/hemop/2014/05/003/year-results-spinart-prophylaxis-vs-demand/381/> <https://insights.ovid.com/crossref?>

Background: Limited data exist on the impact of prophylaxis on adults with severe hemophilia A and pre-existing joint disease.

Objectives: To report 3-year bleeding, joint, health-related quality-of-life (HRQoL), and other outcomes from the open-label, randomized, parallel-group, multinational SPINART study

Patients/Methods: Males aged 12–50 years with severe hemophilia A, ≥150 FVIII exposure days, no inhibitors, and no prophylaxis for >12 consecutive months in the past 5 years were randomized to sucrose-formulated recombinant FVIII (rFVIII-FS) prophylaxis or on-demand therapy (OD). Data collected included total and joint bleeding events (BEs), joint structure (magnetic resonance imaging [MRI]), joint health (Colorado Adult Joint Assessment Scale [CAJAS]), HRQoL, pain, healthcare resource utilization (HRU), activity, and treatment satisfaction.

Results: Following 3 years of prophylaxis, adults maintained excellent adherence with 94% reduction in BEs despite severe pre-existing arthropathy; 35.7% and 76.2% of prophylaxis participants were bleed-free or had <2 BEs/year, respectively. Compared with OD, prophylaxis was associated with improved CAJAS (least squares [LS] mean, -0.31 [n=42] vs +0.63 [n=42]) and HAEMO-QoL-A scores (LS mean, +3.98 [n=41] vs -6.00 [n=42]), less chronic pain (50% decrease), and ~2-fold less HRU; activity, EQ-5D-3L, and satisfaction scores also favored prophylaxis. However, MRI score changes were not different for prophylaxis versus OD (LS mean, +0.79 [n=41] vs +0.96 [n=38]).

Conclusions: Over 3 years, rFVIII-FS prophylaxis versus OD in adults with severe hemophilia A and arthropathy led to decreased bleeding, pain, and HRU, better joint health, activity, satisfaction, and HRQoL, but no reduction in structural arthropathy progression, suggesting pre-existing joint arthropathy may be irreversible.

№53. Manco-Johnson, CL Kempton, MT Reding, T Lissitchkov, S Goranov, L Gercheva... Corrigendum: Randomized, controlled, parallel-group trial of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII in adults with severe hemophilia A (SPINART).

The benefits of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with factor VIII products have not been evaluated in controlled clinical trials in older patients with hemophilia A. Objectives: To report results from a preplanned analysis of data from the first year of the 3-year SPINART study, which compares routine prophylaxis with on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant FVIII (rFVIII-FS). Patients/ Methods: SPINART is an open-label, randomized, controlled, parallel-group, multinational trial. Males aged 12–50 years with severe hemophilia A, >150 days of exposure to FVIII, no FVIII inhibitors, no prophylaxis for >12 consecutive months in the past 5 years and 6–24 bleeding episodes in the preceding 6 months were randomized 1 : 1 to rFVIII-FS prophylaxis (25 IU kg⁻¹, three times weekly) or on-demand treatment. The primary efficacy endpoint, number of total bleeding episodes in the intent-to-treat population, was analyzed after the last patient had completed 1 year of follow-up. A negative binomial model was used for the primary endpoint analysis; analysis of variance was used for confirmatory analysis of annualized bleeding rates. Results: Eighty-four

patients were enrolled and analyzed (n = 42 per group; mean age, 30.6 years; median treatment duration, 1.7 years). The median number of total bleeding episodes and total bleeding episodes per year were significantly lower with prophylaxis than with on-demand treatment (total, 0 vs. 54.5; total per year, 0 vs. 27.9; both P < 0.0001). No treatment-related adverse events occurred, and no patients developed FVIII inhibitors. Conclusions: Routine prophylaxis with rFVIII-FS leads to a significant reduction in bleeding as compared with on-demand treatment. Adverse events were consistent with the established rFVIII-FS safety profile.

№54. Robert Z. Orlowski, Liana Gercheva, Cathy Williams, Heather Sutherland, Tadeusz Robak, Tamas Masszi, Vesselina Goranova-Marinova, Meletios A. Dimopoulos James D. Cavenagh, Ivan Spicka, Angelo Maiolino, Alexander Suvorov, Joan Blae, Olga Samoylova Thomas A. Puchalski, Manjula Reddy, Rajesh Bandekar, Helgi van de Velde, Hong Xie, and Jean-Francois Rossi A phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study of siltuximab (anti-IL-6 mAb) and bortezomib versus bortezomib alone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma

We compared the safety and efficacy of siltuximab (S), an anti-interleukin-6 chimeric monoclonal antibody, plus bortezomib (B) with placebo (plc) 1 B in patients with relapsed/refractory multiple myeloma in a randomized phase 2 study. Siltuximab was given by 6 mg/kg IV every 2 weeks. On progression, B was discontinued and high-dose dexamethasone could be added to S/plc. Response and progression-free survival (PFS) were analyzed pre-dexamethasone by European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) criteria. For the 281 randomized patients, median PFS for S 1 B and plc 1 B was 8.0 and 7.6 months (HR 0.869, P 5 0.345), overall response rate was 55 versus 47% (P 5 0.213), complete response rate was 11 versus 7%, and median overall survival (OS) was 30.8 versus 36.8 months (HR 1.353, P 5 0.103). Sustained suppression of C-reactive protein, a marker reflective of inhibition of interleukin-6 activity, was seen with S 1 B. Siltuximab did not affect B pharmacokinetics. Siltuximab/placebo discontinuation (75 versus 66%), grade ≥ 3 neutropenia (49 versus 29%), thrombocytopenia (48 versus 34%), and all-grade infections (62 versus 49%) occurred more frequently with S 1 B. The addition of siltuximab to bortezomib did not appear to improve PFS or OS despite a numerical increase in response rate in patients with relapsed or refractory multiple myeloma.

№55. Aleksander Skotnicki, Toshko Lissitchkov, Vasily Mamonov, Evgeny Buevich, Kazimierz Kuliczkowski, Stefcho Goranov, Janusz Kłoczko, Anna Klukowska, Svetlana Stankovic Liana Gercheva, Tatiana Chernova, Andrzej Hellmann, Anna Dmoszy, Krystyna Zawilska, Alex Veldman, Christine Joch, Wilfried Seifert. Efficacy, safety and pharmacokinetic profiles of a plasma-derived VWF/FVIII concentrate (VONCENTO®) in subjects with haemophilia A (SWIFT-HA study).

A B S T R A C T

Introduction: VONCENTO® (CSL Behring) is a plasma-derived, high-concentration, low-volume, high-purity concentrate, which contains a high level of von Willebrand factor (VWF) high-molecular-weight multimers and a VWF/factor VIII (FVIII) ratio of ~2.4:1, similar to Haemate® P (CSL Behring).

Methods: The pharmacokinetic, efficacy and safety profiles of VONCENTO® were investigated in this multicentre, double-blind, randomised study. Subjects aged ≥12 years with haemophilia A who required treatment of non-surgical bleeds, treatment during surgical events or who were receiving prophylaxis were included. Pharmacokinetics were investigated with a single dose of 50 IU FVIII/kg body weight of either VONCENTO® or BIOSTATE® reference product (Biostate-RP) (Day 1; Day 8 [n = 16], repeated on Day 180 [VONCENTO® only; n = 15]). Efficacy and safety analyses were performed either during on-demand treatment (n = 52) or prophylaxis (n = 29) for ≥6 months and ≥50 exposure days, respectively.

Results: Besides the confirmation of bioequivalence between VONCENTO® and Biostate-RP, which displayed comparable PK profiles, haemostatic efficacy was rated by the investigators as either 'excellent' or 'good' in 96.4% of all bleeding events (96.5% spontaneous, 96.6% traumatic, 96.9% joint bleeds) as well as in 80% of major and 100% of minor surgical procedures at discharge. The median number of annualised bleeding events per subject [range] was significantly lower in the prophylaxis group (2.0 [0.0–34.6]) than in the on-demand group (14.0 [0.0–87.8], p = 0.0013). VONCENTO® was well tolerated and no inhibitory antibodies were identified during the study period.

Conclusions: This study demonstrated the bioequivalence of VONCENTO® to Biostate-RP, and its excellent efficacy and safety profile in haemophilia A subjects.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

№56. Richard Greil, Petra Obrtlíková, Lukáš Smolej, Tomáš Kozák, Michael Steurer, Johannes Anđel, Sonja Burgstaller, Eva Mikušková, Liana Gercheva, Thomas Nösslinger, Tomáš Papajík, Miriam Ladická, Michael Girschikofsky, Mikuláš Hrubíško, Ulrich Jäger, Michael Fridrik, Martin Pecherstorfer, Eva Králiková, Cristina Burcoveanu, Emil Spasov, Andreas Petzer, Georgi Mihaylov, Julian Raynov, Horst Oexle, August Zabernigg, Emília Flochová, Stanislav Palášthy, Olga Stehlíková, Michael Doubek, Petra Altenhofer, Lisa Pleyer, Thomas Melchardt, Anton Klingler, Jiří Mayer, Alexander Egle *Rituximab maintenance versus observation alone in patients with chronic lymphocytic leukaemia who respond to first-line or second-line rituximab-containing chemoimmunotherapy: final results of the AGMT CLL-8a Maintenance randomised trial*

Background: In many patients with chronic lymphocytic leukaemia requiring treatment, induction therapy with rituximab plus chemotherapy improves outcomes compared with chemotherapy alone. In this study we aimed to investigate the potential of rituximab maintenance therapy to prolong disease control in patients who respond to rituximab-containing induction regimens.

Methods: In this randomised, international, multicentre, open-label, phase 3 clinical trial, we enrolled patients who had achieved a complete response (CR), CR with incomplete bone marrow recovery (CRi), or partial response (PR) to first-line or second-line rituximab-containing chemoimmunotherapy and randomly assigned them in a 1:1 ratio (central block randomisation in the electronic case report form system) to either intravenous rituximab 375 mg/m² every 3 months, or observation alone, for 2 years. Stratification was by country, line of treatment, type of chemotherapy added to the rituximab backbone, and degree of remission following induction. The primary endpoint was progression-free survival. Efficacy analysis was done in the intention-to-treat population. This is the final, event-triggered analysis. Final analysis was triggered by the occurrence of 92 events. This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT01118234.

Findings: Between April 1, 2010, and Dec 23, 2013, 134 patients were randomised to rituximab and 129 to observation alone. Median observation times were 33.4 months (IQR 25.7–42.8) for the rituximab group and 34.0 months (25.4–41.9) for the observation group. Progression-free survival was significantly longer in the rituximab maintenance group (47.0 months, IQR 28.5–in calculable) than with observation alone (35.5 months, 95% CI 25.7–46.3; hazard ratio [HR] 0.50, 95% CI 0.33–0.75, p=0.00077). The incidence of grade 3–4

haematological toxicities other than neutropenia was similar in the two treatment groups. Grade 3–4 neutropenia occurred in 28 (21%) patients in the rituximab group and 14 (11%) patients in the observation group. Apart from neutropenia, the most common grade 3–4 adverse events were upper (five [4%] patients in the rituximab group vs one [1%] patient in the observation group) and lower (three [2%] vs one [1%]) respiratory tract infection, pneumonia (nine [7%] vs two [2%]), thrombopenia (four [3%] vs four [3%]), neoplasms (five [4%] vs four [3%]), and eye disorders (four [3%] vs two [2%]). The overall incidence of infections of all grades was higher among rituximab recipients (88 [66%] vs 65 [50%]).

Interpretation: Rituximab maintenance therapy prolongs progression-free survival in patients achieving at least a PR to induction with rituximab plus chemotherapy, and the treatment is well tolerated overall. Although it is associated with an increase in infections, there is no excess in infection mortality, suggesting that remission maintenance with rituximab is an effective and safe option in the management of chronic lymphocytic leukaemia in early treatment phases.

№57. T. LISSITCHKOV, L. RUSEN, P. GEORGIEV, J. WINDYGA, R. KLAMROTH, L. GERCHEVA, L. NEMES, A. TIEDE, J. BICHLER, S. KNAUB, L. BELYANSKAYA, O. WALTER and K. J. PASI. PK-guided personalized prophylaxis with Nuwiq (human-cl rhFVIII) in adults with severe haemophilia A

Introduction: Nuwiq (human-cl rhFVIII) is a 4th generation recombinant human FVIII, without chemical modification or protein fusion, produced in a human cell-line. Aims/Methods: This study (NuPreviq) was a prospective, open-label, multicentre, phase IIIb study of the efficacy and safety of personalized prophylaxis with Nuwiq in 66 previously treated adults with severe haemophilia A. NuPreviq had three phases: (i) a 72-h pharmacokinetic (PK) phase; (ii) a 1–3 month standard prophylaxis phase; and (iii) a 6-month personalized prophylaxis phase. The personalized prophylaxis regimen was based on individual PK modelling for each patient according to whether their PK profile most closely fitted a two- or one-compartment model (NuPreviq approach). In cases of uncertainty, a noncompartment model was applied. Results: The median dosing interval during personalized prophylaxis was 3.5 days, with 57% of patients on ≤ 2 weekly dosing. Mean annualized bleeding rates during personalized prophylaxis were 1.45 (median [interquartile range, IQR]: 0 [0, 1.9]) for all bleeds, 0.79 (median [IQR]: 0 [0, 0]) for spontaneous bleeds, and 0.91 (median [IQR]: 0 [0, 0]) for joint bleeds. During personalized prophylaxis, 83.1% of patients were spontaneous bleed-free. Compared with standard prophylaxis, median weekly prophylaxis dose was reduced by 7.2% from 100.0 to 92.8 IU kg⁻¹ during the last 2 months of personalized prophylaxis. There were no FVIII inhibitors or treatment-related serious or severe adverse events. Conclusion: PK-guided personalized prophylaxis with Nuwiq provided bleeding protection and enabled the dosing interval to be extended to twice weekly or less in many patients and an overall dose reduction.

№58. M. J. MANCO-JOHNSON, B. LUNDIN, S. FUNK, C. PETERFY, D. RAUNIG, M. WERK, C. L. KEMPTON, M. T. REDING, S. GORANOV, L. GERCHEVA, L. RUSEN, V. USCATESCU, M. PIERDOMINICI, S. ENGELEN, J. POCOSKI, D. WALKER and W. HONG Effect of late prophylaxis in hemophilia on joint status: a randomized trial

Limited data exist on the impact of prophylaxis on adults with severe hemophilia A and pre-existing joint disease. Objectives: To describe 3-year bleeding, joint health and structure, health-related quality-of-life (HRQoL) and other outcomes from the open-label, randomized, multinational SPINART study. Patients/Methods: Males aged 12–50 years with severe hemophilia A, ≥ 150 factor VIII exposure days, no inhibitors and no prophylaxis for > 12 consecutive months in the past 5 years were randomized to sucrose-formulated recombinant FVIII prophylaxis or on-demand therapy (OD). Data collected included total and joint

bleeding events (BEs), joint structure (magnetic resonance imaging [MRI]), joint health (Colorado Adult Joint Assessment Scale [CAJAS]), HRQoL, pain, healthcare resource utilization (HRU), activity, and treatment satisfaction. Results: Following 3 years of prophylaxis, adults maintained excellent adherence, with a 94% reduction in BEs despite severe pre-existing arthropathy; 35.7% and 76.2% of prophylaxis participants were bleed-free or had fewer than two BEs per year, respectively. As compared with OD, prophylaxis was associated with improved CAJAS scores (least squares [LS] mean, 0.31 [n = 42] versus + 0.63 [n = 42]) and HAEMO-QoL-A scores (LS mean, + 3.98 [n = 41] versus 6.00 [n = 42]), less chronic pain (50% decrease), and approximately two-fold less HRU; activity, Euro QoL5D-3L (EQ-5D-3L) scores and satisfaction scores also favored prophylaxis. However, MRI score changes were not different for prophylaxis versus OD (LS mean, + 0.79 [n = 41] versus + 0.96 [n = 38]). Conclusions: Over a period of 3 years, prophylaxis versus OD in adults with severe hemophilia A and arthropathy led to decreased bleeding, pain, and HRU, better joint health, activity, satisfaction, and HRQoL, but no reduction in structural arthropathy progression, suggesting that preexisting joint arthropathy may be irreversible.

№59. K.J. Pasi, S. Rangarajan, P. Georgiev, T. Mant, M.D. Creagh, T. Lissitchkov, D. Bevan, S. Austin, C.R. Hay, I. Hegemann, R. Kazmi, P. Chowdary, L. Gercheva-Kyuchukova, V. Mamonov, M. Timofeeva, C.-H. Soh, P. Garg, A. Vaishnav, A. Akinc, B. Sørensen, and M.V. Ragni Targeting of Antithrombin in Hemophilia A or B with RNAi Therapy

BACKGROUND Current hemophilia treatment involves frequent intravenous infusions of clotting factors, which is associated with variable hemostatic protection, a high treatment burden, and a risk of the development of inhibitory alloantibodies. Fitusiran, an investigational RNA interference (RNAi) therapy that targets antithrombin (encoded by SERPINC1), is in development to address these and other limitations.

METHODS In this phase 1 dose-escalation study, we enrolled 4 healthy volunteers and 25 participants with moderate or severe hemophilia A or B who did not have inhibitory alloantibodies. Healthy volunteers received a single subcutaneous injection of fitusiran (at a dose of 0.03 mg per kilogram of body weight) or placebo. The participants with hemophilia received three injections of fitusiran administered either once weekly (at a dose of 0.015, 0.045, or 0.075 mg per kilogram) or once monthly (at a dose of 0.225, 0.45, 0.9, or 1.8 mg per kilogram or a fixed dose of 80 mg). The study objectives were to assess the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics and safety of fitusiran.

RESULTS No thromboembolic events were observed during the study. The most common adverse events were mild injection-site reactions. Plasma levels of fitusiran increased in a dose-dependent manner and showed no accumulation with repeated administration. The monthly regimen induced a dose-dependent mean maximum antithrombin reduction of 70 to 89% from baseline. A reduction in the antithrombin level of more than 75% from baseline resulted in median peak thrombin values at the lower end of the range observed in healthy participants.

CONCLUSIONS Once-monthly subcutaneous administration of fitusiran resulted in dose-dependent lowering of the antithrombin level and increased thrombin generation in participants with hemophilia A or B who did not have inhibitory alloantibodies. (Funded by Alnylam Pharmaceuticals; ClinicalTrials.gov number, NCT02035605.) Essential thrombocythemia is a rare myeloproliferative neoplasm characterised by elevated platelet counts, megakaryocyte enlargement and hyperplasia and presence of JAK2, CALR or MPL mutations or lack of evidence for reactive thrombocytosis. First-line treatment for essential thrombocythemia includes low-dose aspirin combined with cytoreductive therapy with platelet-lowering agents such as hydroxyurea and anagrelide. Anagrelide inhibits phosphodiesterase 3 and phospholipase A2, and may be associated with cardiomegaly and congestive heart failure. The current study was designed to investigate the cardiac safety, efficacy and tolerability of first-line treatment with anagrelide or hydroxyurea in high-risk essential

thrombocythemia. Patients with essential thrombocythemia (confirmed by bone marrow biopsy) were randomized 1:1 to receive either anagrelide (n=74) hydrochloride or hydroxyurea (n=75). The primary objective of the study was to compare cardiovascular function (assessed by echocardiogram) and safety of short- and long-term use of anagrelide and hydroxyurea. Anagrelide or hydroxyurea had no effect on the primary endpoint, left ventricular ejection fraction, indicating no alteration in cardiac function. There were no significant differences in treatment-emergent adverse events between the two treatment groups, and no reports of malignant transformation. The incidence of disease-related thrombotic or haemorrhagic events was higher in anagrelide-treated patients, but this was unrelated to study medication. Both anagrelide and hydroxyurea controlled platelet counts at 6 months, with the majority of patients experiencing complete or partial responses. These results suggest that long-term treatment with anagrelide is not associated with adverse effects on cardiac function, and support the use of anagrelide as a first-line treatment for high-risk essential thrombocythemia.

№60. Gotic M, Egyed M, Gercheva L, Warzocha K, Kvasnicka HM, Achenbach H, Wu J. A Phase IIIb, randomised, open-label study to compare the cardiovascular safety of anagrelide hydrochloride versus hydroxyurea in high-risk essential thrombocythemia patients

Essential thrombocythemia is a rare myeloproliferative neoplasm characterised by elevated platelet counts, megakaryocyte enlargement and hyperplasia and presence of JAK2, CALR or MPL mutations or lack of evidence for reactive thrombocytosis. First-line treatment for essential thrombocythemia includes low-dose aspirin combined with cytoreductive therapy with platelet-lowering agents such as hydroxyurea and anagrelide. Anagrelide inhibits phosphodiesterase 3 and phospholipase A2, and may be associated with cardiomegaly and congestive heart failure. The current study was designed to investigate the cardiac safety, efficacy and tolerability of first-line treatment with anagrelide or hydroxyurea in high-risk essential thrombocythemia. Patients with essential thrombocythemia (confirmed by bone marrow biopsy) were randomized 1:1 to receive either anagrelide (n=74) hydrochloride or hydroxyurea (n=75). The primary objective of the study was to compare cardiovascular function (assessed by echocardiogram) and safety of short- and long-term use of anagrelide and hydroxyurea. Anagrelide or hydroxyurea had no effect on the primary endpoint, left ventricular ejection fraction, indicating no alteration in cardiac function. There were no significant differences in treatment-emergent adverse events between the two treatment groups, and no reports of malignant transformation. The incidence of disease-related thrombotic or haemorrhagic events was higher in anagrelide-treated patients, but this was unrelated to study medication. Both anagrelide and hydroxyurea controlled platelet counts at 6 months, with the majority of patients experiencing complete or partial responses. These results suggest that long-term treatment with anagrelide is not associated with adverse effects on cardiac function, and support the use of anagrelide as a first-line treatment for high-risk essential thrombocythemia. (NCT 00202644)

Варна

Изготвила:

24 Април 2018 г.

Доц. д-р Лиана Герчева, д.м.