

# ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА

методи за изследване и  
клинично приложение

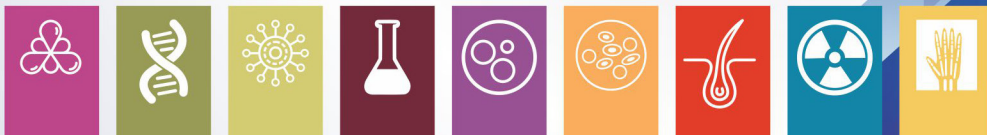


ТОМ II

## ХЕМАТОЛОГИЧНИ НЕОПЛАЗИИ

клинично ръководство, основано на доказателства

Варна, 2017



# НАЦИОНАЛЕН ЕКСПЕРТЕН БОРД 2017

**проф. Алексей САВОВ**

ЦГЛ – София

**проф. д-р Асен ДУДОВ**

Аджибадем Сити Клиник – София

**д-р Борис ПЕТРОВ**

Трансхеликс – София

**д-р Веселина КОЛЕВА**

Аджибадем Сити Клиник Болница Токуда – София

**проф. д-р Галина КИРОВА**

Аджибадем Сити Клиник, Болница Токуда – София

**проф. д-р Георги БАЛАЦЕНКО**

СБАЛХЗ – София

**доц. д-р Димитър КАЛЕВ**

СБАЛОЗ Д-р М. Марков – Варна

**чл. кор. проф. д-р Драга ТОНЧЕВА**

Медицински университет – София

**доц. д-р Иван ИВАНОВ**

УМБАЛ Г. Странски – Плевен

**проф. д-р Ирена КОСТАДИНОВА**

Аджибадем Сити Клиник – София

**доц. д-р Красимир КИРОВ**

СБАЛО – София

**проф. д-р Маргарита ГЕНОВА**

СБАЛХЗ – София

**доц. Милка ГЕОРГИЕВА**

Българско дружество по патология

**проф. д-р Милчо МИНЧЕВ**

СБАЛХЗ – София

**д-р Мариела ВАСИЛЕВА**

УМБАЛ Александровска – София

**доц. д-р Павел БОЧЕВ**

Българско дружество по нуклеарна медицина

**доц. д-р Павел СТАНИМИРОВ**

УМБАЛ Александровска – София

**доц. Радка КЪНЕВА**

Медицински университет – София

**проф. д-р Савелина ПОПОВСКА**

УМБАЛ Г. Странски – Плевен

**проф. д-р Соня СЕРГИЕВА**

СБАЛОЗ – София

**д-р Тихомир ДИКОВ**

УМБАЛ Александровска – София

**проф. д-р Светлана ХРИСТОВА**

УМБАЛ Александровска – София

**проф. д-р Татяна ХАДЖИЕВА**

УМБАЛ Св. Иван Рилски – София

**доц. д-р Яна БОЧЕВА**

Българско научно дружество  
по клинична лаборатория

## СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ .....	5
ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ОСТРИ ЛЕВКЕМИИ.....	11
1.1. Предикивни биомаркери при остра миелоидна левкемия .....	11
1.1.1. Цитогенетика .....	11
1.1.2. <i>NPM1</i> -мутация.....	16
1.1.3. Биалелна <i>CEBPA</i> -мутация.....	20
1.1.4. <i>FLT3</i> -вътрешна тандемна дупликация .....	23
1.1.5. Биомаркери за мерима (минимална) резидуална болест ( <i>PML-RARA</i> -фузионни транскрипти) .....	27
1.1.6. <i>TP53</i> -мутация при миелодиспластичен синдром .....	34
1.2. Предикивни биомаркери при остра лимфобластна левкемия .....	39
1.2.1. Цитогенетика .....	39
1.2.2. <i>IKZF1</i> -делеция .....	43

1.2.3. Субтип на Rh-подобна/ <i>BCR-ABL1</i> -подобна В-лимфобластна левкемия/лимфом .....	47
1.2.4. ЕТР-имунофенотип .....	55
<b>ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ .....</b>	<b>59</b>
2.1. Предикивни биомаркери при хронична миелоидна левкемия .....	59
2.1.1. <i>BCR-ABL</i> -фузионен ген .....	59
2.1.2. <i>ABL</i> -точкови мутации .....	64
2.2. Предикивни биомаркери при първична миелофиброза .....	68
2.2.1. <i>JAK2</i> -, <i>CALR</i> - и <i>MPL</i> -мутации .....	68
<b>ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ЛИМФОИДНИ НЕОПЛАЗИИ .....</b>	<b>73</b>
3.1. Предикивни биомаркери при хронична лимфоцитна левкемия .....	73
3.1.1. <i>del(17p)/TP53</i> -мутация .....	73
3.1.2. <i>del(11q)/ATM</i> -мутация .....	79
3.1.3. CD20-експресия .....	84

3.2. Предиктивни биомаркери при неходжкинови лимфоми.....	89
3.2.1. CD20-експресия при дифузен В-едроклетъчен лимфом.....	89
3.2.2. Клетъчен произход при дифузен В-едроклетъчен лимфом.....	94
3.2.3. <i>ALK1</i> -аберации при едроклетъчни лимфоми .....	100
3.3. Предиктивни биомаркери при плазмоклетъчен миелом.....	107
3.3.1. Цитогенетика [t(4;14)-, t(14;16)- и del17p-статус] .....	107
3.4. Предиктивни биомаркери при лимфом на <i>Hodgkin</i> .....	112
3.4.1. CD30-експресия .....	112
3.4.2. PD-L1/PD-1-експресия .....	116
3.4.3. Междинна ПЕТ-2 (iPET-2) .....	120



## ВЪВЕДЕНИЕ

Настоящото ръководство е консенсусно становище на мултидисциплинарен екип, включващ експерти в областта на онкологичните предиктивни биомаркери от осем медицински специалности и техни национални браншови организации: Българско дружество по патология, Българско дружество по генетика на човека, Българско медицинско сдружение по хематология, Българска асоциация по персонализирана медицина, Българско онкологично научно дружество, Българско дружество по нуклеарна медицина, Българска асоциация по радиология, Гилдия на лъчетерапевтите в България и Българско дружество по клинична лаборатория.

Нуждата от национално ръководство за молекулярно тестване и клинична интерпретация на предиктивни биомаркери е обусловена от актуалността на фармакогеномиката, фармакопротеомиката и радиомиката като основи за терапевтични решения в прецизираната (персонализирана) медицина – медицинска онкология, онкохематология и онкологична радиология.<sup>1</sup> Проблемът допълнително е свързан с регулацията, фондовете и реимбурсирането на молекулярната таргетна и цитотоксичната терапии и с критериите за техния избор и провеждане.<sup>2</sup>

Цел на ръководството е да представи съвременни алгоритми за молекулярно диагностично тестване и клинично приложение на валидирани предиктивни биомаркери при лечение на малигнени солидни тумори и хематологични неоплазии според локализацията им при възрастни, включително и при тумори с агностици тъкан/място. Съдържанието включва

биомаркери, които детерминират избор на определен лекарствен продукт или лечебна стратегия въз основа на доказателства за терапевтичните им резултати в условията на определена биологична констелация. Изборът на биомаркер за включване в съдържанието отразява моментната конюнктура в клиничната онкология с всякакви възможности за обновление и бъдещи промени. Всички термини са приведени в съответствие с номенклатурата на Осма редакция на Наръчника за стадиране на тумори на AJCC, 2017.<sup>3</sup>

Ръководството е предназначено за всички медицински специалности в България, свързани с различните терапевтични модалности при малигнени солидни тумори и хематологични неоплазии: патолози, молекулярни биолози, медицински генетици, медицински онколози, хематолози, нуклеарни медици, лъчетерапевти, клинични лаборанти, радиолози, фармацевти, общопрактикуващи лекари и медицински сестри.

## МЕТОДИ

Ръководството за предиктивни биомаркери в онкологията е основано на доказателства и е структурирано в три главни раздела. Всеки подраздел е съставен най-малко от двама експерти, съдържа резюмиран литературен обзор върху съответен биомаркер и техниките за неговото тестване, позовавайки се изцяло на медицина, основана на доказателства. В края на всеки раздел са дефинирани препоръки, описани с четири степени на препоръчителност (A, B, C и D) според Оксфордския център за медицина, основана на доказателства (CEBM)<sup>4</sup>, и към тях са добавени акценти за добра практика.

*Нива на доказателственост*


Ниво	Тип на доказателство
1	Доказателство, получено от системен обзор или рандомизирани проучвания.
2	Доказателство, получено от отделно рандомизирано проучване или наблюдателно проучване с драматичен ефект.
3	Доказателство, получено от нерандомизирани контролирани кохортни проучвания.
4	Доказателство, получено от серии на случаи, контроли на случаи или исторически контролирани проучвания.
5	Аргументи, основани на рутинна практика.

*Степени на препоръчителност*

Степен	Съвместимост с ниво на доказателственост
A	Съвместима с проучвания с ниво на доказателственост 1.
B	Съвместима с проучвания с ниво на доказателственост 2 или 3 <i>или</i> екстраполации* от проучвания с ниво на доказателственост 1.
C	Проучвания с ниво на доказателственост 4 <i>или</i> екстраполации от проучвания с ниво на доказателственост 2 или 3.
D	Ниво на доказателственост 5 <i>или</i> непоследователни или неубедителни проучвания на всяко ниво.

\* *Екстраполация* – използване на данни при възможност за клинично значими разлики в сравнение с оригиналната ситуация на проучването.

*Акценти за добра практика*

	Препоръки за най-добър подход, основани на клиничния опит на експертния борд.
---	---



## ТЕРМИНИ И ДЕФИНИЦИИ

**Биомаркери:** клетъчни, биохимични и/или молекулярни (включително генетични или епигенетични) характеристики, които могат да бъдат обективно измерени и оценени като индикатори за нормални биологични процеси, патогенетични процеси или фармакологични отговори към терапевтични интервенции.<sup>5</sup>

**Туморни биомаркери:** биологични молекули, продуцирани или от туморни клетки, или от човешки тъкани в отговор на тумор, които могат да бъдат обективно измерени и оценени като индикатори на туморния процес в организма.<sup>5</sup>

**Типове туморни биомаркери:** прогностични, предиктивни, фармакодинамични и заместители (сурогатни). Всеки биомаркер може да служи за повече от една цел и да принадлежи към повече от една категория.<sup>5</sup>

**Предиктивни туморни биомаркери:** биологични молекули или клетъчни характеристики, които могат да бъдат обективно измерени и оценени като индикатори за предсказване на отговор към терапевтични интервенции.

**Прогностични туморни биомаркери:** състояния или характеристики на пациента, които може да бъдат използвани за оценка на шанса за възстановяване от болестта или риска от рецидив и за които е доказана сигнификантна връзка с показател или резултат, независим от приложеното лечение.

**Предиктивни спрямо прогностични биомаркери:** (i) за да се приеме, че даден биомаркер е предиктивен, е необходимо да бъде доказан в клиничното проучване (за предпочитана

не рандомизирано); статусът на биомаркера трябва да бъде определен за всички пациенти – както в подгрупата, лекувана с изследвания агент, така и в контролното рамо; официалният статистически тест за взаимодействие *лечение според биомаркер* трябва да бъде сигнификантен; (ii) за да се установи, че даден биомаркер е чисто прогностичен, трябва да се докаже, че има сигнификантна връзка между биомаркер и резултат, независимо от лечението, както и че терапевтичните ефекти не зависят от биомаркера; (iii) даден биомаркер може да демонстрира както предиктивни, така и прогностични корелации.<sup>11</sup>

**In vitro диагностични продукти (IVD):** (i) реагенти, инструменти, системи или продукти за диагностика на болест или състояние (с цел превенция, облекчаване или лечение) чрез изследване на материали, добити от човешкото тяло; (ii) обект са на контрол и мерки за подобряване (Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA'88) и според регулаторния контрол за безопасност и ефективност се класифицират в три степени: *клас I* (нисък до умерен риск) – основен контрол; *клас II* (умерен към висок) – основен и специален контрол; *клас III* (висок риск) – основен контрол и предмаркетингово одобрение (PMA); (iii) лабораторно развит тест се дефинира като IVD-продукт за клинична употреба, предназначен за работа в определена лаборатория, която формира собствена тестова система и разработва работен протокол, който трябва да се валидира и верифицира, сравнявайки се с друга сертифицирана лаборатория, която работи с предварително валидирана система<sup>12</sup>; (iv) придружаваща диагностика (companion diagnostics, CDx) се дефинира като IVD-тест/кит или образно средство за определяне на подходящ пациент за таргетна терапия, която въздейства на уникален биохимичен път и изисква специфични генотипи или мутации; тестът е специфичен и задължителен за назначаване на определен медикамент<sup>13</sup>; (v) допълваща диагностика (complementary diagnostics) се дефинира като незадължителен IVD-тест/кит или об-

разно средство, осигуряващи допълнителна информация за използване на лекарство или приложение на съответен клас терапевтични агенти, давайки допълнителна информация за очаквана терапевтична полза.<sup>12</sup>

**Профил на туморни биомаркери:** характеризира се със задължителни показатели: чувствителност, специфичност, точност, устойчивост и възпроизводимост.<sup>5</sup>

**Валидиране на биомаркери:** преминава през три задължителни стъпки: аналитична (техническа) валидност, клинична валидност и клинична полза.<sup>6</sup>

**Аналитично валидиране (имунохистохимично):** осъществява се според ръководствата за лабораторна практика, основани на доказателства (LPG), на Колегията на американските патолози<sup>7,8</sup> и се дефинира като процедура, при която се проверяват резултати от един тест в конкретна лаборатория според инструкции на фирма-производител, показвайки съпоставимост с резултати от други, вече утвърдени в практиката. Включва следните подходи: (i) координиране на резултат от нов тест с морфология и

очаквани резултати; (ii) сравняване на резултат от нов тест с резултати от тестване на същите тъкани с валидиран тест в същата лаборатория; (iii) сравняване на резултати от нов тест с резултати от тестване на същите материали за потвърждаване в друга лаборатория, използвайки валидиран анализ; (iv) сравняване на резултати от нов тест с предишни валидирани неимунохистохимични тестове или (v) тестване на стари материали, оценени чрез официална тестова програма (ако има такава), и сравняване на резултатите с настоящите отговори. За валидност се приема съгласуваност за позитивен резултат при 90% и за негативен резултат – при 95%. При модифицирани тестове се изискват 40, а при клинично утвърдени тестове – 20 тъканни материала.<sup>9</sup> Препоръчва се проследяване на съотношение *позитивни към негативни случаи* поне двукратно годишно с методи на вътрешен одит и сравняване с литературни резултати.

**Клинична полза (доказателственост):** при наличие на проспективно клинично проучване, дизайнирано за тестване на биомаркери, или съвместими резултати от  $\geq 2$  сходни проспективни клинични проучвания, начално недизайнирани за тестване на биомаркери.<sup>10</sup>

## ЛИТЕРАТУРА

1. Deverka P, Messner DA, McCormack R, et al. Generating and evaluating evidence of the clinical utility of molecular diagnostic test in oncology. *Genet Med* 2016; 18: 780-787
2. Lyman GH, Moses HI. Biomarker tests for molecularly targeted therapies: Laying the foundation and fulfilling the dream. *J Clin Oncol* 2016; 34 (17): 2061-2066
3. AJCC Cancer staging manual, 8<sup>th</sup> edition. Ed: Amin MB. *Springer*, 2017
4. Howick J, et al. The 2011 Oxford CEBM levels of evidence. Available at: [www.cebm.net/index.aspx?o=56535](http://www.cebm.net/index.aspx?o=56535).

3. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therapeutics* 2001; 69: 89-95
6. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med* 2009; 11 (1): 3-14
7. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays. Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1432-1443
8. Stuart LN, Volmar KE, Nowak JA, et al. Analytic validation of immunohistochemistry assays. *New*

- benchmark data from a survey of 1085 laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2017. doi: 10.5858/arpa.2016-0559-CP
9. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond MEH, et al. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 930-935
  10. Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101 (21): 1446-1452
  11. Ballman KV. Biomarker: predictive or prognostic? *J Clin Oncol* 2015; 33 (33): 3968-3972
  12. Framework for regulatory oversight of laboratory developed tests (LDTs). FDA, October 3, 2014; Available at: [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
  13. Principles for codevelopment of an in vitro companion diagnostic device with a therapeutic product. FDA, July 15, 2016; Available at: [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
  14. NCI Dictionary of Cancer terms, National Cancer Institute, 2017. Available at: [www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms](http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms)





1

Предиктивни биомаркери при остри левкемии

1



## 1

## ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ОСТРИ ЛЕВКЕМИИ

## 1.1. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ОСТРА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ

## 1.1.1. Цитогенетика

*Георги Балаценко, Маргарита Генова*

**Молекулярна биология.** Клонални промени в кариотипа се срещат в 59% от възрастните пациенти<sup>1,2</sup> и в около 78% от децата с остра миелоидна левкемия (ОМЛ). Спектърът на хромозомните аберации е изключително хетерогенен, като се съобщават над 200 различни бройни или структурни аномалии, които са рекурентни при ОМЛ с честота, варираща от 0.1% до 10%.<sup>3</sup> Към момента на диагнозата в 31% от пациентите се доказва поне една хромозомна аномалия, в 13% – две, а в 14% – три или повече<sup>2</sup>, като по-чести са монозомии и тризомии, разнообразни делеции, транслокации и инверсии. От особено клинично значение при ОМЛ е т.нар. *комплексен кариотип* – наличие на три или повече независими хромозомни аберации, и *монозомален кариотип* – наличие на две или повече автозомни монозомии или една автозомна монозомия в съчетание с една или повече структурни аномалии<sup>4</sup>, които имат доказана прогностична стойност. Най-общо, хромозомните аномалии при ОМЛ се разделят на две основни групи: (i) първични, настъпващи през ранни етапи на левкемогенеза и имащи ключова роля за развитието на съответната болест; по правило са специфични и неслучайни, в много случаи са единствена

промяна в кариотипа и често корелират с конкретна форма на болестта; (ii) вторични, настъпващи в хода на болестта; често са неспецифични, появата им е белег на клонална еволюция и са свързани с прогресия и резистентност към провеждано лечение.

Хромозомните аномалии проявяват значими различия по честота в различни възрастови групи, като балансираните цитогенетични аберации – t(3;5)(q21-25;q31-35), t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q21), inv(16)(p13q22) и t(11q23) – се срещат предимно при млади пациенти, докато небалансираните аномалии, включително различните монозомии, del(5q), del(7q), тризомии на хромозоми 11 и 13, са по-чести при по-възрастни пациенти.<sup>2</sup> Някои от тези аберации се наблюдават единствено при ОМЛ или се срещат и при други хематологични неоплазии, но проявяват изразена асоциация с характерни морфологични и имунофенотипни особености на бластната популация, клиничния ход, отговора към лечение и цялостната прогноза или изискват специфично лечение. Поради тези причини, според последната ревизия на класификацията на ОМЛ на Световната здравна организация (WHO), 2016, редица обособени подтипове ОМЛ се дефинират въз основа на наличие на конкретни неслучайни хромозомни аномалии.<sup>5</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Конвенционалният хромозомен лентов анализ е задължителен елемент от диагностичния панел при новодиагностицирани пациенти с ОМЛ. Чрез него се установяват разнообразни структурни и бройни хромозомни аберации, независимо дали са балансираны, или не, срещащи се самостоятелно или в комбинация в левкемичните клетки. За получаване на годни за анализ метафази пробите от костномозъчен аспират се подлагат на стандартни 1-2-дневни култури *in vitro*, в края на които се третират за спиране на клетъчното деление в метафаза, обработват се с хипотоничен разтвор и фиксатори. Получените препарати, съдържащи метафазни фигури,

се подлагат на хромозомно-лентово оцветяване (най-често G-оцветяване) и се анализират микроскопски. По правило се анализират 20 или повече метафази, особено в случаи, при които отсъстват клонални промени в кариотипа, докато при наличие на абнормален кариотип могат да бъдат достатъчни и по-малко. За да имат клинична значимост, промените в кариотипа трябва да бъдат клонални, което означава наличие най-малко в две метафази на идентични структурни аномалии и тризомии и наличие най-малко в три метафази, когато се касае за идентична загуба на хромозоми (монозомии).<sup>6</sup> В случаите, когато цитогенетичният анализ е неуспешен или не може да се проведе, някои клинично значими хромозомни аномалии могат да бъдат доказани чрез FISH (5q-, 7q-, 17p- и др.) или чрез RT-PCR [(t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1, inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)/CBFB-MYH11, t(15;17)(q22;q21)/PML-RARA, t(v;11q23)/KMT2A (MLL) и др.].

**Доказателства за предиктивно значение.** Получените резултати от цитогенетичния анализ имат ключово значение както за диагноза и субкласификация на ОМЛ, така и за прогностична стратификация на отделните болни и избор на риск-адаптирана терапия. Данните от цитогенетичния анализ са абсолютно необходимо условие за класифициране на някои подтипове ОМЛ, съгласно класификацията на WHO, 2016. Така например, осем балансирани транслокации и инверсии, както и техни варианти, дефинират обособени подтипове на болестта, които са включени в категорията *ОМЛ с рекурентни генетични аномалии*: t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), t(9;11)(p21-22;q23), t(6;9)(p23;q34), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) и t(1;22)(p13;q13). Две заболявания от същата група са дефинирани въз основа на доказване на молекулярни еквиваленти на съответните транслокации (фузионни гени/транскрипти), тъй като поради наличие на “криптични форми” на аномалии те могат да бъдат пропуснати в част от случаите при конвенционална кариотипизация, но се доказват чрез PCR или FISH. Към тази група

се отнасят острата промиелоцитна левкемия с фузионни гени/транскрипти *PML-RARA*, образувани при t(15;17)(q22;q21), и ОМЛ с фузионни гени/транскрипти *BCR-ABL1*, образувани при t(9;22)(q34;q11.2), чието идентифициране е изключително важно поради възможност да се използва специфично таргетно лечение. От друга страна, при наличие на някои от аномалиите [t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) и t(15;17)(q22;q21)/*PML-RARA*] диагнозата ОМЛ се поставя независимо от процента на бласти, за разлика от всички останали форми на ОМЛ, при които абсолютно условие за диагнозата е наличие на  $\geq 20\%$  бласти в костен мозък или в периферна кръв. Данните от цитогенетичния анализ са важни и за диагноза на друга категория – *ОМЛ с промени, свързани с миелодисплазия*, при която наличието на някои от 9-те балансирани хромозомни преустройства, както и многобройни небалансирани аномалии, са достатъчни за диагноза в случаите, когато са налице  $\geq 20\%$  бласти в костен мозък или в кръв.<sup>7</sup>

Прогностичната стойност на цитогенетичните аберации е оценявана почти изключително в ретроспективни проучвания, често върху относително малък брой пациенти, поради което е необходима предпазливост при интерпретация на получения резултат. С изразена прогностична значимост са сравнително малко на брой хромозомни аномалии, при които се наблюдава отчетлива корелация с вероятност за постигане на ремисия, продължителност на преживяемост без болест (ПББ) и обща преживяемост (ОП). Доказването им позволява пациентите да се стратифицират в три цитогенетични групи с различна прогноза: (i) благоприятна – t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), t(15;17)(q22;q21); (ii) интермедиерна – нормален кариотип +8, t(9;11)(p21-22;q23) и цитогенетични аномалии, в които не са включени прогностични групи с благоприятен и неблагоприятен риск; (iii) неблагоприятна – комплексен кариотип, монозомален кариотип, -5/del(5q), -7, транслокации с участие на хромозома 11q23 [различни от t(9;11)(p21-



22;q23), t(6;9)(p22;q34) и inv(3)(q21q26.2). Така например, десетгодишната ОП в групата с благоприятна прогноза варира от 81% [t(15;17)] до 61-55% [съотв. при inv(16)/t(16;16) и t(8;21)], докато в групата с неблагоприятна прогноза е значително по-кратка, съотв. 3% при inv(3)/t(3;3), 5% при монозомален кариотип, 6% при -5/5q-, 10% при -7/7q- и 11% при t(9;22). При пациенти с интермедиерна прогноза десетгодишната ОП е 32-38%.<sup>2</sup> Медианната ОП при пациенти с комплексен кариотип е много кратка, като се наблюдават известни вариации според брой и вид на хромозомни аберации, съотв. 9.8-11 месеца при наличие на три аномалии и 6.1-5.4 месеца – при наличие на четири аномалии.<sup>8</sup> Редица наблюдения показват, че пациенти с нормален кариотип (интермедиерна прогноза) са изключително хетерогенни по отношение на отговор към лечение и клинично протичане, поради което се предлага допълнително прецизиране на риска въз основа на различни генни мутации (напр. мутации, засягащи гени *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3* и др.).<sup>7</sup>

От статистическа гледна точка само предиктивните маркери могат да се използват при избор на лечение.<sup>3</sup> По правило ОМЛ с t(8;21) или с inv(16)/t(16;16) често се разглеждат заедно и се обозначават като core-binding factor (CBF)-положителни ОМЛ, защото и при двете състояния се засяга хетеродимерният протеинен-комплекс CBF, участващ в транскрипционната регулация на нормалната хемопоеза. Пациенти със CBF-положителна ОМЛ имат изразена клинична полза от интензивна химиотерапия, включваща високи дози *cytarabine*, като резултатите са валидирани както при по-млади пациенти, така и при тези, на възраст над 60 години. Понастоящем се препоръчва при пациенти със CBF-положителна ОМЛ и отсъствие на значима коморбидност да се прилага интензивна химиотерапия, независимо от възрастта. Въпреки благоприятната прогноза при CBF-положителна ОМЛ, при около 40-45% настъпва рецидив на болестта, като при пациенти с t(8;21) вероятността за постигане на втора ремисия е много малка и прогнозата е достоверно по-лоша от тази

при inv(16)/t(16;16). За момента отсъстват убедителни доказателства, че алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки би променила прогнозата.<sup>9</sup>

Терапевтичният подход при острата промиелоцитна левкемия (ОПЛ) се различава от този, използван при останалите подтипове. Болестта се описва с характерна хромозомна аномалия – t(15;17)(q22;q12), водеща до синтез на онкопротеин, който нарушава нормалната миелоидна диференциация. Съществува консенсус, че доказването на аномалията е индикация за специфичен терапевтичен протокол, включващ таргетен диференциращ агент *All Trans Retinoic Acid* (ATRA), в комбинация с антрациклин (*daunorubicin* или *idarubicin*). Алтернативен подход при нисък и интермедиерен риск е комбиниране на ATRA с друг диференциращ агент – *arsenic trioxide* (ATO), без прилагане на химиотерапия<sup>10</sup>, чрез което се постига пълна ремисия в 95-100%, ПББ – над 90%<sup>11</sup> и ОП – 86-97%. При високорискови пациенти добри резултати се съобщават при комбинация ATRA-ATO в съчетание с анти-CD33-моноклонални антитела.<sup>12</sup> При подтип ОМЛ с *BCR-ABL1*, респективно с t(9;22)(q34;q11.2), също се прилага таргетно лечение с тирозинкиназни инхибитори (ТКИи) (*imatinib*, *dasatinib* или *nilotinib*), но все още липсват системни наблюдения и сигурни данни за полза от подобен терапевтичен подход, поради което не се препоръчват рутинно като първа линия. Освен това, използването на ТКИи в комбинация с интензивна химиотерапия и/или като мост към алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки остава индивидуално решение, като се съпоставят потенциални ползи спрямо възможни рискове.<sup>13</sup> При около 30% от ОМЛ се установява неблагоприятен кариотип и посредством конвенционална химиотерапия се постига пълна ремисия едва в около 50% от случаите, а очакваната петгодишна ОП е 10-20%. При всички пациенти от тази група, при които е постигната пълна ремисия, алогенната трансплантация на хемопоетични стволови клетки е най-добър избор.<sup>14</sup>

**A**

- При новодиагностицирани пациенти с остра миелоидна левкемия се препоръчва конвенционален цитогенетичен анализ като задължителен елемент на диагностичния панел за оценка на риск и избор на терапевтична стратегия (таргетна и/или риск-адаптирана).
- Доказването на някои хромозомни аберации се препоръчва като абсолютен диагностичен критерий за класифициране на подтиповете от категория *остра миелоидна левкемия с рекурентни генетични аномалии* и за диагноза на категория *остра миелоидна левкемия с промени, свързани с миелодисплазия*.
- При цитогенетичен анализ с отсъствие на транслокации  $t(15;17)(q22;q21)/PML-RARA$  и  $t(9;22)(q34;q11.2)$  за окончателна верификация на статуса им се препоръчва провеждане на FISH или RT-PCR с оглед своевременно стартиране на таргетна терапия.



- Хромозомните аберации са едни от най-важните прогностични маркери при остра миелоидна левкемия, но при стратификация на болните в групи с различен риск трябва да се имат предвид само тези аномалии, чиято прогностична значимост е безспорно доказана.
- Цитогенетичното изследване трябва да се провежда в акредитирана цитогенетична лаборатория, притежаваща теоретични познания и практически опит в хромозомните нарушения при хематологични неоплазии като цяло и в частност – при остра миелоидна левкемия, с оглед коректна интерпретация на получените резултати.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol* 2008; 26 (29): 4791-4797
2. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116 (3): 354-365
3. Schlenk RF, Ganser A, Döhner K. Prognostic and predictive effect of molecular and cytogenetic aberrations in acute myeloid leukemia. ASCO Educational Book, 2010, 228-232
4. Orozco JJ, Appelbaum FR. Unfavorable, complex, and monosomal karyotypes: the most challenging forms of acute myeloid leukemia. *Oncology (Williston Park)* 2012; 26 (8): 706-712
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405
6. ACC Best Practice Guidelines. Acute Myeloid Leukaemia & Myelodysplastic Syndromes. 2012, v1.00
7. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al., Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood* 2017; 129 (4): 424-447
8. Stölzel F, Mohr B, Kramer M, Oelschlägel U, et al. Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* 2016; 6 (1): e386

9. Schlenk RF, Pasquini MC, Perez WS, et al. HLA-identical sibling allogeneic transplants versus chemotherapy in acute myelogenous leukemia with t(8;21) in first complete remission: collaborative study between the German AML Intergroup and CIBMTR. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14:1 87-196
10. McCulloch D, Brown C, Iland H. Retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: current perspectives. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 1585-1601
11. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013; 369 (2): 111-121
12. Tamamyian G, Kadia T, Ravandi F, et al. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 110: 20-34
13. Neuendorff NR, Burmeister T, Dörken B, et al. BCR-ABL-positive acute myeloid leukemia: a new entity? Analysis of clinical and molecular features. *Ann Hematol* 2016; 95 (8): 1211-1221
14. Schlenk RF, Döhner K, Mack S, et al. Prospective evaluation of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation from matched related and matched unrelated donors in younger adults with high-risk acute myeloid leukemia: German-Austrian trial AMLHD98A. *J Clin Oncol* 2010; 28 (30): 4642-4648

### 1.1.2. *NPM1*-мутация

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Генът *nucleophosmin* (*NPM1*) е разположен на хромозома 5q35 и включва в структурата си 12 екзона. В резултат на алтернативен сплайсинг се образуват три изоформи (B23.1; B23.2 и B23.3), транслиращи се във фосфопротеин, чието основно количество е разположено в клетъчното ядро. Една част от него постоянно мигрира между ядро и цитоплазма и участва в редица клетъчни процеси – биогенеза и експорт на рибозоми, дупликация на центрозоми, ремоделиране на хроматин, асамблиране на хистони, клетъчна пролиферация, регулация на ДНК-репарирани механизми, контрол на транскрипция и отговор към стрес-стимули.<sup>1</sup> Мутациите в *NPM1*-гена са специфично асоциирани с остра миелоидна левкемия (ОМЛ) и са едни от често срещаните генетични нарушения при възрастни пациенти – в около 35% от всички случаи и в 50-60% от пациентите с нормален кариотип. При деца с ОМЛ се среща значително по-рядко (8%). Мутациите винаги са хетерозиготни и с редки изключения не се срещат при ОМЛ с рекурентни генетични аномалии.<sup>2,3</sup> Описани са над 55 различни мутации в *NPM1*, най-често засягащи екзон 12 под форма на малки инсерции или дупликации (обикновено четири нуклеотидни двойки, а понякога до единадесет нуклеотидни двойки).<sup>4</sup> Счита се, че последствията на ниво протеин са идентични и водят до клетъчна делокализация от ядро в цитоплазма чрез формиране на нов сигнал за ядрен експорт и/или чрез увреждане на С-терминалния триптофан, участващ в ядрената ретенция на протеина.<sup>5</sup> В около 90-95% от всички мутации в *NPM1*-гена са представени под форма на три мутации, от които най-честа е тип А (ТСТГ-дупликация) (75-80%), докато останалите две са по-редки – съотв. тип В (САТГ-инсерция) (10%), по-честа

при деца, и тип D (ССТГ-инсерция) (5%).<sup>6,7</sup> В редки случаи са описани и мутации, настъпващи в екзон 9 и екзон 11.<sup>8</sup> Пациентите с мутации в *NPM1*-гена се характеризират с преобладаване на женския пол, “cup-like” ядрос изразени инвагинации в бластите, мутиленийна дисплазия, по-висок брой левкоцити и бласти към момента на диагноза, по-често екстремедуларно ангажиране, висока честота на нормален кариотип (85%) и вътрешни тандемни дупликации (ITD) на *FLT3*-гена (40-55%) и мутации в *DNMT3*-гена, отсъствие на CD34 (90-95%) и специфичен профил на генна експресия и микро-РНК.<sup>9,10</sup> Мутациите в *NPM1* са с изразена стабилност в хода на болестта, което ги прави удобен маркер за проследяване на минимална резидуална болест.<sup>11</sup>

**Аналитични методи за изследване.** За рутинно доказване на *NPM1*-мутации се използват различни подходи. Конвенционалното секвениране по *Sanger* е дефинитивен метод, позволяващ доказването както на известни, така и на нови, неописани форми.<sup>12</sup> Широко се използват и редица алтернативни подходи – фрагментен анализ при капилярна електрофореза след амплификация чрез полимеразно-верижна реакция (PCR)<sup>13</sup>, чрез алел-специфична PCR с праймери, специфично насочени към най-чести форми на мутациите – А, В и D, и агарозна електрофореза<sup>14</sup> или с *Taqman*-сонди<sup>15</sup>. Друга възможност е използване на имуистохимична техника чрез анти-*NPM1*-антитела, доказваща цитоплазматична делокализация на мутирала форма на протеина върху препарати, получени чрез трепанобиопсия; при този подход не е възможно да се прецизира конкретната форма на мутацията.<sup>16</sup> През последните година се използва и секвениране от ново поколение (NGS).

**Доказателства за предиктивно значение.** Наличието на мутации в *NPM1*-гена дефинира обособен подтип ОМЛ, включен в категорията *ОМЛ с рекурентни генетични*

*аномалии*<sup>17</sup>; има значение за определяне на риск и за избор на терапия, поради което изследването на аномалията е съществен елемент от диагностичния панел. По правило наличието на *NPM1*-мутации в отсъствие на вътрешна тандемна дупликация на *FLT3*-гена (*FLT3-ITD*) корелира с повишена честота на постигане на пълна ремисия и с удължена преживяемост без болест (ПББ) и обща преживяемост (ОП). Според повечето препоръки пациенти с това нарушение се стратифицират в група с нисък риск (благоприятна прогноза)<sup>18, 19</sup>, най-силно изразен при нормален кариотип. По правило при тези пациенти се прилага коинвенционална индукционна терапия, включваща *cytarabine* и антрациклин, с последваща постремисионна терапия, включваща 2-4 цикъла интермедиерни дози *cytarabine* (1000-1500 mg/m<sup>2</sup> I.V. за 3 часа, 3 дни, или 1000-1500 mg/m<sup>2</sup> I.V. за 3 часа, 5 или 6 дни), когато са на възраст 18-65 години, и съотв. 2-3 цикъла интермедиерни дози *cytarabine* (500-1000 mg/m<sup>2</sup> I.V. за 3 часа, 3 дни, или 500-1000 mg/m<sup>2</sup> I.V. 3 часа, 5 или 6 дни), когато са на възраст над 65 години.<sup>19</sup> Алогенната трансплантация на хемопоеични стволови клетки не е опция при тези пациенти, тъй като липсва значима разлика в ОП (70% срещу 60% при пациенти без донор).<sup>20</sup> Петгодишната ОП при мутации в *NPM1* в отсъствие на *FLT3-ITD* (60%) се доближава

до тази при пациенти с хромозомни аномалии, асоциирани с благоприятна прогноза, каквито са ОМЛ с хромозомни аномалии, засягащи транскрипционния фактор core-binding factor. От друга страна, подобрената ОП при мутации в *NPM1* спрямо тези, без мутации в *NPM1* е изразена при по-млади пациенти на възраст под 65 години – съотв. двегодишна ОП – 70% срещу 32%. При по-възрастни подобни различия не се наблюдават.<sup>21</sup> При проучване на 1312 възрастни пациенти (> 65 години) се съобщава значително по-висока честота на пълна ремисия, независимо от използван терапевтичен протокол, при пациенти, носещи мутации в *NPM1*, без обаче това да е свързано с подобряване на ОП.<sup>22</sup> Когато *NPM1*-мутациите са придружени от *FLT3-ITD*, болните се отнасят към група с интермедиерна прогноза; някои проучвания показват, че прогнозата при *FLT3-ITD*(+) с мутации в *NPM1*-гена е по-добра от тази, при пациенти с *FLT3-ITD*(+) без мутации, които попадат в групата с висок риск.<sup>23</sup> Прогностичната значимост на мутациите в *NPM1*-гена при пациенти с абнормен кариотип е обект на дискусии и не е изяснена. През последните години някои проучвания очертават перспективност на използване на *All-trans retinoic acid* (ATRA) и *arsenic trioxide* при пациенти с мутации в *NPM1*.<sup>24, 25</sup>

A

- При всички пациенти с остра миелоидна левкемия и нормален кариотип се препоръчва изследване за *NPM1*-мутации към момента на диагноза за дефиниране на подтип *остра миелоидна левкемия с рекурентни генетични аномалии*.
- За интерпретация на прогностичната стойност на *NPM1*-мутации е задължително определянето на *FLT3-ITD*-статус.
- Алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки не се препоръчва при пациенти с *NPM1*-мутации при отсъствие на *FLT3-ITD*.
- За оценка на *NPM1*-статус се препоръчва аел-специфичен PCR или имунохистохимично изследване на цитоплазмена делокализация в костномозъчна биопсия.



При пациенти с мутации в NPM1-гена благоприятна прогноза се очаква само когато са на възраст под 65 години, с нормален кариотип и без FLT3-ITD.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci* 2013; 22 (5): 545-556
2. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 2009; 27 (4):171-181
3. Braoudaki M, Papathanassiou C, Katsibardi K, et al. The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol* 2010; 3: 41
4. Heath EM, Chan SM, Minden MD, et al. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia* 2017; 31 (4): 798-807
5. Liso A, Bogliolo A, Freschi V, et al. In human genome, generation of nuclear export signal through duplication appears unique to nucleophosmin (NPM1) mutations and is restricted to AML. *Leukemia* 2008; 22 (6): 1285-1289
6. Szankasi P, Jama M, Bahler DW. A new DNA-based test for detection of nucleophosmin exon 12 mutations by capillary electrophoresis. *J Mol Diagn* 2008; 10 (3): 236-241
7. Falini B. Any role for the nucleophosmin (NPM1) gene in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities? *Leuk Lymphoma* 2007; 48 (11): 2093-2095
8. Albiero E, Madeo D, Bolli N, et al. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. *Leukemia* 2007; 21 (5): 1099-1103
9. Rau R, Brown P. Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukemia: towards definition of a new leukaemia entity. *Hematol Oncol* 2009; 27 (4): 171-181
10. Falini B, Martelli MP, Bolli N, et al. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood* 2011; 117 (4): 1109-1120
11. Kristensen T, Møller MB, Friis L, et al. NPM1 mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to WT1 expression. *Eur J Haematol* 2011; 87 (5): 400-408
12. Alpermann T, Haferlach C, Dicker F, et al. Evaluation of different NPM1 mutations in AML patients according to clinical, cytogenetic and molecular features and impact on outcome. *Blood* 2013; 122: 51-51
13. Noguera NE, Ammatuna E, Zangrilli D, et al. Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2005; 19 (8): 1479-1482
14. Ottone T, Ammatuna E, Lavorgna S, et al. An allele-specific rt-PCR assay to detect type A mutation of the nucleophosmin-1 gene in acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn* 2008; 10 (3): 212-216
15. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood* 2009; 114 (11): 2220-2231
16. Lit BM, Kwong YL, Wong KF. Immunohistochemical detection of cytoplasmic nucleophosmin in formalin-fixed paraffin-embedded marrow trephine biopsies in acute myeloid leukaemia. *J Clin Pathol* 2016; 69 (5): 409-414
17. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405

18. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: Acute myeloid leukemia, Version 1, 2017 4. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
19. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017;129(4): 424-447
20. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129 (4): 424-447
21. Röllig C, Bornhäuser M, Kramer M, et al. Allogeneic stem-cell transplantation in patients with NPM1-mutated acute myeloid leukemia: results from a prospective donor versus no-donor analysis of patients after upfront HLA typing within the SAL-AML 2003 trial. *J Clin Oncol* 2015; 33 (5): 403-410
22. Ostronoff F, Othus M, Lazenby M, et al. Prognostic significance of *NPM1* mutations in the absence of *FLT3*-internal tandem duplication in older patients with acute myeloid leukemia: a SWOG and UK National Cancer Research Institute/Medical Research Council report. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1157-1164
23. Lazenby M, Gilkes AF, Marrin C, et al. The prognostic relevance of *flt3* and *npm1* mutations on older patients treated intensively or non-intensively: a study of 1312 patients in the UK NCRI AML16 trial. *Leukemia* 2014; 28 (10): 1953-1959
24. Liu Y, He P, Liu F, et al. Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 2014; 2 (2): 275-281
25. Martelli MP, Gionfriddo I, Mezzasoma F, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells. *Blood* 2015; 125 (22): 3455-3465
26. El Hajj H, Dassouki Z, Berthier C, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1 resulting in apoptosis of AML cells. *Blood* 2015; 125 (22): 3447-3454

### 1.1.3. Биалелна *CEBPA*-мутация

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Генът *CCAAT/enhancer binding protein α (CEBPA)* е разположен на хромозома 19q13.1. В структурата му липсват интрони и кодираният от него протеин изпълнява функции на фактор на транскрипция. Според началното място на транслацията се синтезират два различни продукта – *CEBPA*-протеин, включващ цялостната структура (P42), и скъсена изоформа, в която липсват 117 N-терминални аминокиселини. Като нуклеарен фактор за транскрипция, в структурата на *CEBPA*-протеина са включени C-терминално разположен ДНК-свързващ домейн и области, необходими за хомо- и хетеродимеризацията с други транскрипционни фактори, а в N-края са разположени три трансактивационни домейна за взаимодействие с компоненти на транслационната система, регулатори на клетъчния цикъл и фактори, участващи в хроматиново ремоделиране. По правило *CEBPA*-протеинът има ключово значение за контрол на миелоидната диференциация на хемopoетичните стволови клетки.<sup>1</sup> Ектопичната експресия на *CEBPA* води до арест на клетъчния цикъл.

Мутации в *CEBPA*-гена се срещат в около 10% от пациентите с остра миелоидна левкемия (ОМЛ).<sup>2</sup> Най-общо, те се разделят на две основни групи: (i) C-терминални in-frame ins/del-мутации, които водят до нарушена димеризация на протеина и намалено свързване с ДНК, и (ii) N-терминални out-of-frame ins/del-мутации, при които се нарушава транслацията на пълната P42-изоформа и се синтезира скъсен P30-протеин, който има доминантно-негативен ефект.<sup>3</sup> Крайният резултат от появата на мутации е нарушена активност на транскрипционния фактор.<sup>4</sup> В някои проучвания преобладават моноалелни мутации в *CEBPA* (*CEBPA*sm) – 62.5% срещу 42.6% биалелни мутации

(*CEBPA*Adm)<sup>2</sup>, докато в други те са със сходна честота, съответно 45% със *CEBPA*sm и 55% със *CEBPA*Adm<sup>5</sup>. В преобладаващия брой от случаите с биалелни *CEBPA*-мутации (около 90%) едната е C-терминална, а другата – N-терминална. Случаите с хомозиготни N-терминални или C-терминални мутации са относително редки. Съобщава се изразена асоциация на аномалията с нормален кариотип – около 70% от пациенти с *CEBPA*-мутации, както и по-висока честота при пациенти с del(9q), 62.5% от които носят мутацията.<sup>6</sup> Същевременно се наблюдават различия в честотата и вида на съпътстващи други мутации според това дали е засегнат само едният или и двата *CEBPA*-алела. Например допълнителни мутации в други гени се съобщават в 69.2% при *CEBPA*Adm срещу 88.6% при *CEBPA*sm. От друга страна, при *CEBPA*Adm са по-чести допълнителни мутации, засягащи *GATA1*- и *WT1*-гените, докато при *CEBPA*sm са по-чести нарушенията в гените *FLT3*, *NPM1*, *ASXL1* и *RUNX1*.<sup>2</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Мутациите в *CEBPA*-гена при ОМЛ са хетерогенни по своята природа и имат разпръсната локализация, което предопределя необходимост от секвениране на кодиращата секвенция на гена за тяхното установяване. Рутинен подход е конвенционално секвениране по *Sanger*.<sup>7</sup> През последните години успешно се прилага и секвениране от ново поколение (NGS)<sup>8,9</sup>; предлагат се и комерсиални китове за изследване на миелоидни неоплазии, които позволяват доказване и на *CEBPA*-мутации.

**Доказателства за предиктивно значение.** Изследване за *CEBPA*-мутациите се препоръчва да бъде включено в диагностичния панел при новодиагностицирани болни с ОМЛ.<sup>10</sup> Наличието на *CEBPA*Adm дефинира обособен подтип ОМЛ, включен в категория *ОМЛ с рекурентни генетични аномалии*. Наличие на мутации в *CEBPA* дефинира



и един подтип от категория *миелоидни неоплазии с наследствено предразположение без предшестващи заболявания или органна дисфункция*.<sup>11</sup> Според препоръките на European Leukemia Net (2017) пациенти със *CEBPA*dm-мутации се стратифицират в генетична група с нисък риск, заедно с тези, носещи t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1-RUNX1T1*, inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFB-MYH11* и *NPM1*-мутации без вътрешни тандемни дупликации на *FLT3*-гена (*FLT3-ITD*).<sup>10</sup> Наличие на *CEBPA*dm се смята за благоприятен прогностичен фактор и пациентите се характеризират с подобрена осемгодишна обща преживяемост (ОП) от 54% срещу 31% и 34% съответно при пациенти със *CEBPA*sm и без мутации. По отношение на честота на постигане на пълна ремисия не се отбелязват значими различия, свързани с мутационния статус на *CEBPA*.<sup>5</sup> Редица наблюдения подкрепят идеята, че наличие на съпътстващи хромозомни аберации не променя прогнозата при пациенти с билалелни мутации в *CEBPA*.<sup>10</sup> Същевременно му-

тацията губи своето прогностично значение при допълнително наличие на вътрешни тандемни дупликации на *FLT3*-гена (*FLT3-ITD*) съответно с ОП – 26% при *FLT3-ITD*(+)/без мутации в *CEBPA*, 21% при *FLT3-ITD*(+)/*CEBPA*sm и 14% при *FLT3-ITD*(+)/*CEBPA*dm.<sup>5</sup> Терапевтичният подход при *CEBPA*dm е сходен с този, прилаган при всички ОМА с нисък риск, и включва конвенционална индукция с антрациклин и *cytarabine*, най-често под форма на класическия 3 + 7 протокол. След постигане на пълна ремисия при *CEBPA*dm ОМА, без съпътстващи *FLT-ITD*, пациентите следва да получат поне един цикъл интензивна консолидационна химиотерапия, включваща интермедиерни или високи дози *cytarabine*.<sup>12</sup> Алогенната трансплантация на хемопоеични стволови клетки е опция само при пациенти с рецидив или с неблагоприятни молекулярни или цитогенетични фактори.

**A**

- При всички пациенти с остра миелоидна левкемия и нормален кариотип се препоръчва изследване на билалелни *CEBPA*-мутации.
- За интерпретация на прогностична стойност на *CEBPA*-мутации е задължително изследване на *FLT3-ITD*-статус.
- За оценка на *CEBPA*-статус се препоръчва секвениране.

**B**

Алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки се препоръчва само при *CEBPA*-позитивни пациенти с рецидив или с неблагоприятни прогностични фактори.



Билалелни мутации в *CEBPA*-гена са свързани с благоприятна прогноза само в случаи, когато отсъстват *FLT3-ITD*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Yohe S. Molecular genetic markers in acute myeloid leukemia. *J Clin Med* 2015; 4 (3): 460-478
2. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia* 2014; 28( 4): 794-803
3. Tian TV, Graf T. CEBPA (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2015; 19( 4): 249-255
4. Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, et al. NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9 (Suppl. 5): S1-32
5. Green CL, Koo KK, Hills RK, et al. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol* 2010; 28 (16): 2739-2747
6. Fröhling S, Schlenk RF, Krauter J, et al. Acute myeloid leukemia with deletion 9q within a noncomplex karyotype is associated with CEBPA loss-of-function mutations. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42 (4): 427-432
7. Behdad A, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KS, et al. A clinical grade sequencing-based assay for CEBPA mutation testing: report of a large series of myeloid neoplasms. *J Mol Diagn* 2015; 17 (1): 76-84
8. Wertheim GB, Daber R, Bagg A. Molecular diagnostics of acute myeloid leukemia: it's a (next) generational thing. *J Mol Diagn* 2013; 15 (1): 27-30
9. Grossmann V, Schnittger S, Schindela S, et al. Strategy for robust detection of insertions, deletions, and point mutations in CEBPA, a GC-rich content gene, using 454 next-generation deep-sequencing technology. *J Mol Diagn* 2011; 13 (2): 129-136
10. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129 (4): 424-447
11. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405
12. Fey MF, Buske C. ESMO Guidelines Working Group. Acute myeloblastic leukaemias in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 (Suppl. 6): vi138-143

#### 1.1.4. *FLT3*-вътрешна тандемна дупликация

Георги Балаценко, Маргарита Генова


**Молекулярна биология.** Генът *FLT3* (*Fms like tyrosine kinase 3*) е разположен на хромозома 13q12-q13 и кодира синтез на клас III рецептор с тирозинкиназна активност, експресиращ се върху хемopoетични стволови клетки, след което експресията му намалява по време на диференциация. Структурата му е сходна с тази на рецепторите за растежен фактор, освобождаван от тромбоцити (PDGFR), колонистимулиращ фактор (CSF) и Kit-лиганд. При свързване със съответния *FLT3*-лиганд *FLT3* димеризира и претърпява конформационни промени, в резултат на които става възможно взаимодействие с АТР и последващо автофосфорилиране на юкстамембранния домейн и активиране на сигнални каскади, водещи до индуциране на пролиферация и подтискане на апоптозата с участие на STAT5, MAPK и др. При остри миелоидни левкемии (ОМЛ) се срещат две основни нарушения в структурата на *FLT3*: (i) вътрешна тандемна дупликация (ITD) и (ii) точкова мутация, водеща до промяна в аминокиселнната последователност в D835. От двете аномалии само първата е с изразена клинична значимост при ОМЛ.<sup>1</sup> По правило *FLT3*-ITD представлява тандемно инсертираната дупликация на кодиращи секвенции в юкстамембрания домейн. Нарушението е in-frame, като дължината на дублицирания фрагмент варира между 3 и 200 bp (най-често < 100 bp).<sup>2</sup> Функционалните последици от придобиване на *FLT3*-ITD включва нарушена автоинхибираща функция на тирозинкиназния домейн, водеща до постоянно подаване на активиращи сигнали в трансформирани левкемични клетки. Аномалията е характерна за ОМЛ и е с честота около 20%<sup>3</sup>, но се среща и при други заболявания като остра лимфобластна левкемия и миелодиспластични синдроми, макар и значително по-рядко, съотв. < 1%<sup>4</sup>

и 6.1%<sup>5</sup>. Честотата на *FLT3*-ITD при ОМЛ проявява изразена асоциация с възрастта: аномалията е рядка при кърмачета, нараства до 5-10% при деца на възраст 5-10 години, до 20% при млади и достига до > 35% при възраст > 55 години.<sup>6</sup> Честотата на *FLT3*-ITD варира в широки граници при отделни субтипове ОМЛ. Най-висока честота е установена при ОМЛ с нормален кариотип (28-34%) и с мутации в *NPM1*-гена (39%)<sup>7</sup> и при остра промиелоцитна левкемия (31-36%)<sup>1,8</sup>. При *FLT3*-ITD(+) пациенти с ОМЛ се наблюдава тенденция за бласти с c/like-ядрени инвагинации и по-изразена левкоцитоза. **Аналитични методи за изследване.** Изследването на *FLT3*-ITD в рутинната практика се извършва върху геномна ДНК или РНК, изолирани от клетки от костен мозък или периферна кръв, чрез полимеразно-верижна реакция (след обратна транскрипция при РНК) (PCR) и с последващ анализ на продуктите на амплификация чрез агарозна електрофореза или чрез фрагментен анализ при капилярна електрофореза. Последният метод се предпочита през последните години, тъй като позволява доказване на ITD с къси фрагменти, определяне на дължина на дупликацията, както и оценка на съотношението на мутантен към нормален ("див" тип, WT) алел.<sup>9</sup> Броят на бластите в изследваната проба има решаващо значение за успеха на изследването, тъй като разреждането на левкемични с нормални хемopoетични клетки може да намали чувствителността.<sup>1</sup> Основни недостатъци на този подход относително ниска чувствителност и преференциално амплифициране на нормален *FLT3*-алел (с по-малка дължина на фрагмента) спрямо мутантната му форма; затова установеното съотношение *FLT3*-ITD/*FLT3*-wt не винаги отразява реалното, особено при ITD с по-голяма дължина. Чрез фрагментен анализ се доказват ниски нива на аномалия със съотношение *FLT3*-ITD/*FLT3*-wt – 5% срещу 10% чрез конвенционален PCR. Съобщава се и възможност за успешно използване и на високоразрешителен мелтинг-анализ<sup>10</sup>, който обаче не на-

мира широко приложение в практиката. Желателно е резултатът от изследването на *FLT3-ITD* да е наличен в рамките на 48-72 часа. Като оптимален скринингов подход се очертава и секвениране от ново поколение (NGS)<sup>11</sup>, независимо че се съобщават проблеми, свързани с биоинформативна обработка на данните<sup>12</sup>.

**Доказателства за предиктивно значение.** От клинична гледна точка *FLT3-ITD* е един от най-важните прогностични фактори за обща преживяемост (ОП) при пациенти с ОМЛ, с подчертано неблагоприятна прогноза, независимо от прогностичната цитогенетична група, към която пациентът е стратифициран. Същевременно *FLT3-ITD* представляват хетерогенна група от аномалии, различаващи се по брой на вътрешни тандемни дупликации, дължина, място на инсертуване, както и по съотношение на мутантен и нормален *FLT3*-алели, респективно – в относителни нива на аб-нормен и нормален протеини.<sup>13</sup> С доказана прогностична значимост е относителната големина на мутантния товар, респективно – съотношение *FLT3-ITD*-към нормален *FLT3*-алел. Само когато съотношението *FLT3-ITD/FLT3-WT* е > 50%, аномалията има клинична значимост<sup>14</sup>, тъй като при тези нива е вероятна загуба на нормален *FLT3*-алел<sup>1</sup>. Дори много малки нива на *FLT3* ITD-мутации (големина на клона от 0.2-2%) е важно да бъдат установени, защото клетките могат да оцелеят след индукционна терапия и след време да пролиферират. Обсъжда се също и значението на дължина на *FLT3-ITD*; медианната дължина на ITD е между 39-54 bp и се смята, че при по-дълги дупликации ( $\geq 70$  bp) началото е в киназия, а не в юкстамембранния домейн. Съществуват данни, че при по-дълги ITD, както и при инсертуване на ITD в киназия домейн, са налице асоциации с по-ниска честота на пълна ремисия и/или с влошена ОП.<sup>9, 15</sup> Тези резултати обаче не се потвърждават в други проучвания.<sup>16</sup> По отношение на клиничното значение на броя на ITD данните също са противоречиви; според

някои автори наличието на повече от една дупликация корелира със скъсена ОП<sup>17</sup>, докато според други тази находка няма прогностична значимост<sup>18</sup>. Прогностично значение има и динамиката на аномалията в хода на болестта: при някои пациенти с доказана *FLT3-ITD* при диагноза по време на рецидив аномалията отсъства; при тези случаи прогнозата е по-благоприятна в сравнение с тези, при които дупликацията персистира. От друга страна, при случаи, които са били *FLT3-ITD*-отрицателни при диагноза, аномалията се доказва при рецидив; в тези случаи прогнозата също е толкова неблагоприятна, както при тези, при които аномалията персистира.<sup>20</sup> В някои проучвания се съобщава, че наличието на *NPM1*-мутации при *FLT3-ITD*-положителни пациенти подобрява прогнозата, независимо, че е по-неблагоприятна спрямо тези, при които *FLT3-ITD* отсъства. При пациенти със съотношение *FLT3-ITD/FLT3-WT* > 50% прилагането на рутинни индукционни протоколи (7 + 3) е крайно неефективно, въпреки че при възрастни не се отбелязва значима разлика в честота на пълна ремисия, асоциирана *cFLT3-ITD*-статус, докато при деца вероятността за пълна ремисия е значително по-ниска, когато аномалията присъства.<sup>21</sup> Същевременно, аномалията е свързана с кратка ОП и преживяемост без болест (ПББ). Една от опциите за промяна на тази неблагоприятна прогноза е алогенната трансплантация на хемопоеични стволови клетки; метаанализ отчетливо демонстрира, че трансплантацията при първа ремисия намалява честотата на рецидиви и подобрява както ОП, така и ПББ.<sup>22</sup> Друга потенциална опция е използване на таргетна терапия с *FLT3*-инхибитори, най-често в съчетание с цитостатици.<sup>23</sup> Наличието на *FLT3-ITD* при пациенти с *t(15;17)/PML-RARA*-положителна остра промиелоцитна левкемия не повлиява терапевтичния отговор или прогноза, особено при комбинирано използване на *arsenic trioxide* (ATO) и *all-trans retinoic acid* (ATRA).<sup>24</sup>

<b>A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ При всички пациенти с остра миелоидна левкемия се препоръчва задължително изследване на <i>FLT-ITD</i> към момента на диагноза.</li> <li>■ Препоръчителен метод за изследване на <i>FLT-ITD</i>-аномалия е PCR с последващ фрагментен анализ.</li> </ul>
<b>B</b>	<p>При пациенти с остра миелоидна левкемия, носители на <i>FLT-ITD</i>-аномалия, се препоръчва включване в клинични проучвания с експериментални протоколи (<i>FLT3</i>-инхибитори и др.) или провеждане на аlogenна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ С изразена неблагоприятна прогноза са само тези форми на <i>FLT-ITD</i>-аномалия, при които съотношението <i>FLT3-ITD/FLT3-WT</i> е над 50%.</li> <li>■ При пациенти с остра миелоидна левкемия резултатът от изследването трябва да е готов през първите 48-72 часа.</li> </ul>

## ЛИТЕРАТУРА

1. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013; 2013: 220-226
2. Pratz KW, Levis M. How I treat FLT3-mutated AML. *Blood* 2017; 129 (5): 565-571
3. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2011; 10; 29 (5): 475-486
4. Yamamoto T, Isomura M, Xu Y, et al. PTPN11, RAS and FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2006; 30 (9): 1085-1089
5. Shih LY, Huang CF, Wang PN, et al. Acquisition of FLT3 or N-ras mutations is frequently associated with progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004; 18 (3): 466-475
6. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15 (13): 4263-4269
7. Wang M, Yang C, Zhang L, Schaar DG. Molecular mutations and their cooccurrences in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Stem Cells Int* 2017; 2017: 6962379
8. Poiré X, Moser BK, Gallagher RE, et al. Arsenic trioxide in front-line therapy of acute promyelocytic leukemia (C9710): prognostic significance of FLT3 mutations and complex karyotype. *Leuk Lymphoma* 2014; 55 (7): 1523-1532
9. Kim Y, Lee GD, Park J, et al. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. *Blood Cancer J* 2015; 5: e336
10. Liu Y, Tang J, Wakamatsu P, et al. High-resolution melting curve analysis, a rapid and affordable method for mutation analysis in childhood acute myeloid leukemia. *Front Pediatr* 2014; 2: 96
11. Spencer DH, Abel HJ, Lockwood CM, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication in targeted, short-read-length, next-generation sequencing data. *J Mol Diagn* 2013; 15 (1): 81-93
12. Au CH, Wa A, Ho DN, et al. Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms. *Diagn Pathol* 2016; 11: 11
13. Estey E. High cytogenetic or molecular genetic risk acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 474-480

14. Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 2017; 129 (4): 424-447
15. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood* 2014; 124 (23): 3441-3449
16. Gale RE, Green C, Allen C et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111 (5): 2776-2784
17. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 2001; 98: 1752-1759
18. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114: 2386-2392
19. Warren M, Luthra R, Yin CC, et al. Clinical impact of change of FLT3 mutation status in acute myeloid leukemia patients. *Modern Pathology* 2012; 25: 1405-1412
20. Levis M, Small D. FLT3: ITD Does matter in leukemia. *Leukemia* 2003; 17 (9): 1738-1752
21. Ma Y, Wu Y, Shen Z, et al. Is allogeneic transplantation really the best treatment for FLT3/ITD-positive acute myeloid leukemia? A systematic review. *Clin Transplant* 2015; 29 (2): 149-160
22. Hospital MA, Green AS, Maciel TT, et al. FLT3 inhibitors: clinical potential in acute myeloid leukemia. *Onco Targets Ther* 2017; 10: 607-615
23. Cicconi L, Divona M, Ciardi C, et al. PML-RAR $\alpha$  kinetics and impact of FLT3-ITD mutations in newly diagnosed acute promyelocytic leukaemia treated with ATRA and ATO or ATRA and chemotherapy. *Leukemia* 2016; 30 (10): 1987-1992

### 1.1.5. Биомаркери за мерима (минимална) резидуална болест (*PML-RARA*-фузионни транскрипти)

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Острата промиелоцитна левкемия (ОПЛ) е обособен подтип остра миелоидна левкемия (ОМЛ), характеризиращ се със специфични морфологични промени, асоциирана коагулопатия и патогномонични генетични нарушения – t(15;17)(q22;q21) и фузионен ген *PML-RARa*, които имат ключово значение в патогенезата на болестта.<sup>1</sup> В повечето случаи фузионният ген се образува при реципрочен обмен на генетичен материал при t(15;17)(q22;q21), при което се сливат области на *PML* (Promyelocytic Leukemia) [15q24] и *RARa* [Retinoic acid receptor, alpha] [17q21] гените. В около 4% от случаите появата на *PML-RARa* е свързана с интерстициална инсерция или по-сложни пренаредения, при които често липсват видими промени в хромозоми 15 и 17 (криптични пренаредения). В зависимост от локализацията на счупването в *PML*-гена (*bcr1*, *bcr2* и *bcr3*) се формират различни *PML-RARa*-гени и фузионни транскрипти, означавани като *дълги* [Long (L)], *вариабилни* [Variable(V)] и *къси* [Short(S)]. Като казуистика, вместо *PML-RARa*, се срещат други фузионни гени с участие на *RARa* – ZBTB16(PLZF)-*RARa*/t(11;17)(q23;q21), NPM1-*RARa*/t(5;17)(q32;q12), NUMA1-*RARa*/t(11;17)(q13;q21) и др.<sup>2</sup>

*RARa*-генът кодира синтез на транскрипционен фактор, участващ в регулация на голяма група гени от пътя на сигнална трансдукция, свързан с ретиноева киселина [Retinoic Acid (RA)]. *RARa*-медирираният контрол на транскрипция е възможен само когато *RARa* е свързан с Retinoid X Receptor (RXR) под форма на хетеродимерен комплекс. При липса на RA хетеродимерът е свързан с корепресорен фактор (Co-R) и транскрипцията е блокирана. При наличие на RA пространствените промени в *RARa* водят до отделяне на

Co-R, свързване с коактиватор (Co-A) и индуциране на транскрипция на гени, участващи в терминалната миелоидна диференциация и в блокиране на пролиферацията.<sup>3</sup> По правило *PML*-генът кодира синтез на протеин, който е основен компонент на мулти-протеинен комплекс, разположен в ядрените органели, означавани като Nuclear Body (NB) или *PML*-онкогенни домейни [*PML oncogenic domains* (PODs)]. Така *PML* участва в регулацията на транскрипция и апоптоза, като изпълнява и функция на тумор-супресор и вероятно участва и в имунната защита на организма.<sup>4</sup>

Хибридният *Pml-Rara* онкопротеин запазва частично структурата и функциите на *Rara*, като в същото време придобива и нови свойства, свързани с области от *Pml*. В резултат на това *Pml-Rara* може да се свързва с редица гени, които са необичаен таргет за *Rara*; образува мултипротеинни комплекси, водещи до функционално изчерпване на редица фактори, без които нормалният *Rara*-протеин не може да реализира биологичната си активност; в допълнение води до пространствената им делокализация в нови нуклеарни и/или цитоплазмени компартменти. В същност *Pml-Rara* конкурентно измества *Rara* при свързването му с ключови за миелоидната диференциация гени и те остават изцяло под контрол на онкопротеина. За разлика от нормалния *Rara*, връзката на *Pml-Rara* с корепресорните фактори е много здрава и те не се отделят при физиологични концентрации на RA, поради което прибицията е блокирана. От значение е и формирането на хетеродимери на *Pml-Rara* с нормален *Pml*-протеин, при което се разрушават NB, а протеините, включени в комплекса, се делокализират в многобройни малки аберантни структури. Поради тези промени *Pml*-протеинът функционално се инактивира и настъпва загуба на контрол върху пролиферация, скъсяване на фазите на клетъчния цикъл и блокиране на апоптозата.

Наличието на PML-RARa при болни с ОПЛ е в основата на изключително висока терапевтична ефективност на специфичните терапевтични протоколи, включващи таргетен диференциращ агент *All Trans Retinoic Acid* (ATRA) в комбинация с антрациклин (*daunorubicin* или *idarubicin*) или комбиниране на ATRA с друг диференциращ агент – *Arsenic trioxide* (ATO), без прилагане на химиотерапия<sup>10</sup>, чрез което се постига пълна ремисия в 95-100%, преживяемост без болест (ПББ) – над 90%<sup>11</sup> и обща преживяемост (ОП) – 86-97%. Фармакологично ATRA е активната форма на ретинол в тъканите и прилагайки се във високи концентрации, преодолява здравата връзка на PML-RARa/RXR с Co-R и предизвиква дисоциация на последния; това позволява свързване с Co-A и активиране на транскрипцията. Индуцираната от ATRA диференциация се придружава от деградация на Pml-Rara, арест на клетъчния цикъл и инхибиране на клетъчния растеж. След лечение с ATRA малигнените клетки се диференцират в зрели гранулоцити и се възстановяват повечето функционални отношения на нормалните клетки. За разлика от химиотерапия, ATRA може да индуцира ремисия в значителна част от болните, без това да се съпровожда с нарушения в хемостазата. Действието на ATO е свързано с нормализиране на Pml. Когато се прилага в ниски концентрации (0.1-0.5 mmol/L), препаратът предизвиква директно разграждане на Pml-Rara в неговата Pml-част, в резултат на което отпада негативното въздействие на онкопротеина върху функциите на Rara и се стимулира диференциация на промиелоцити. При високи концентрации (0.5-2.0 mmol/L) ATO, освен разграждане на Pml-Rara, повишава и трансфера на Pml от нуклеоплазмата към нуклеарния матрикс, чрез което се възстановява нормалната структура на NB. В същото време се активира caspase 3 и се подтиква експресията на Bcl-2. Крайният резултат е индуциране на апоптоза и възстановяване на контрол на клетъчната пролиферация.<sup>6</sup>

**Аналитични методи за изследване.** По дефиниция всички пациенти с ОПЛ са положителни за фузионни *PML-RARa*-транскрипти, което позволява използване на аномалията като маркер за проследяване на МРБ. За оценка на МРБ може да бъде прилагана двуетапна (Nested primers) качествена полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR)<sup>7</sup> или количествена RT-PCR с използване на Taqman-сонди, която е значително по-прецизна<sup>8</sup>. За разлика от повечето молекулярни маркери при ОМЛ, при които чувствителността на RT-PCR може да достигне  $10^{-5}$ , по отношение на PML-RARa тя е значително по-ниска ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$ ), вероятно поради по-слабата му експресия. По-ниската чувствителност на метода, както и изразената ефективност на съвременните таргетни препарати при ОПЛ, са в основа на липса на установими PML-RARa транскрипти, наблюдавана във висок процент от болните с молекулярна ремисия (пълнен молекулярен отговор).<sup>9</sup> Когато се използват по-чувствителни PCR-методи за доказване на МРБ чрез определяне на PML-RARa (10-6), изразената корелация между молекулярния тест и прогнозата не е така изразена.<sup>11</sup> Мониторингът следва да се извършва върху материал от аспират от костен мозък, тъй като нивото на фузионни транскрипти в периферна кръв е около 1.5 лога по-ниско и съответно установяването на молекулярен рецидив се забавя с 29 дни.<sup>11</sup> През последните години се съобщава за успешното използване на капков дигитален PCR (Droplet digital PCR) като по-точен и чувствителен подход за оценка на МРБ.<sup>12</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Понятието *минимална резидуална болест* дефинира наличие на резидуални левкемични клетки при пациенти в пълна ремисия, чието количество е под граница на чувствителност на морфологичните методи за оценка на терапевтичен отговор. Доказването им е възможно само чрез по-чувствителни имунологични или молекулярни подходи, каквито са многопараметърната флуоцитометрия



метрия и PCR.<sup>13</sup> През последните години ОПЛ от агресивна, често фатална неоплазия, се превърна в остра левкемия с най-висок процент на излекуване. До голяма степен това е свързано както с прилагане на нови таргетно-ориентирани терапевтични подходи, така и с адаптиране на терапевтичната стратегия според данни за ниво на МРБ.<sup>14</sup> По правило ОПЛ е едно от малкото хематологични неоплазии, при които съществува консенсус за полза от интегриране на МРБ в рутинната клинична практика и съответно за терапевтични решения, които се вземат въз основа на тези данни.<sup>16</sup> Най-общо, при ОПЛ е в сила правилото, че трайното отсъствие на МРБ корелира с благоприятна прогноза и дългогодишна преживяемост, докато прогностичната стойност на RT-PCR-МРБ(+) зависи от установено ниво, моментна анализ, както и от вид на лечение.

Настоящите препоръки за значението на МРБ при ОПЛ до голяма степен се основават на данни от класически терапевтични стратегии, включващи индукция с комбинация от АТРА и антрациклин, последвана от три курса консолидация с химиотерапия и двегодишна поддържаща терапия.<sup>16, 17</sup> В края на индукционно лечение с АТРА плюс химиотерапия наличието на RT-PCR-МРБ(+) се съобщава при значителна част от болните (47-79%), независимо от постигната хематологична ремисия при повечето от тях.<sup>17-19</sup> Същевременно се смята, че статусът на RT-PCR-МРБ в този момент има ниска клинична значимост. В проучване, обхващащо 406 пациенти с ОПЛ, не е установена каквато и да е връзка между молекулярен МРБ-статус и риск от рецидив.<sup>19</sup> Подобни са данните и от друго проучване, включващо 145 болни, в което липсват значими различия по отношение на петгодишен риск от рецидив, свързан с RT-PCR-МРБ-статуса в края на индукцията – съответно 71% при RT-PCR-МРБ(+) и 80% при RT-PCR-МРБ(-), като не е наблюдавана асоциация и по отношение на ОПЛ.<sup>18</sup> Причина за отсъствие на прогностична значимост в този момент вероятно е свързана с факта, че наличието на установими

*PML-RARa* може да означава забавена матурация, а не резистентност, тъй като 87.5% от пациентите с RT-PCR-МРБ(+) впоследствие негативират своя МРБ-статус в края на консолидацията.<sup>17</sup> Въз основа на тези и други сходни данни не се препоръчва информацията за ниво на МРБ в края на индукционно лечение с АТРА плюс химиотерапия да се има предвид при вземане на терапевтични решения.<sup>20</sup> Същевременно при пациенти, при които индукционното лечение е проведено с АТО, наличието на RT-PCR-МРБ(+) в края на индукционното лечение корелира с повишен риск от рецидив (относителен риск = 4.9), докато при нито един от пациентите с RT-PCR(-) не е наблюдаван рецидив.<sup>21</sup> Тези различия биха могли да се обяснят с вариации в динамиката на очистиране на *PML-RARa* при лечение с АТРА и АТО, които вероятно са свързани с конкретния механизъм на действие на двата препарата върху левкемичните клетки: докато АТРА води до диференциация на бластите, АТО, приложен във високи концентрации ( $1-2 \times 10^{-6}$  M), индуцира апоптоза, независимо че, използван в ниски концентрации ( $0.25-0.5 \times 10^{-6}$  M) и по-продължителни курсове, също води до диференциация на ОПЛ-бласти.<sup>22</sup>

От друга страна, RT-PCR-МРБ-статусът в края на консолидиращо лечение е най-мощен предиктивен фактор за преживяемост без рецидив (ПБР) (относителен риск 17.87)<sup>19</sup>, поради което наличието на молекулярна ремисия трябва да бъде верифицирано в края на последния цикъл от консолидиращата терапия, независимо от използвания терапевтичен протокол.<sup>23</sup> Още през 1999 г. група GIMEMA показва за първи път, че превантивна терапия, базирана на молекулярни данни за МРБ, обуславя преимущества в сравнение с пациенти, при които лечението е започнало при разгънат клиничен рецидив – съответно кумулативна ПБР – 85% срещу 44%.<sup>24</sup> В последствие данните за по-добра прогноза при пациенти със стартирано превантивно лечение при установим молекулярен рецидив е значително по-добра от тази при изчакване на

поява на хематологичен рецидив.<sup>25</sup> По правило АТО-базирани режими са първа опция на спасителна терапия при пациенти с молекулярен рецидив, въпреки че може да се използва и АТРА плюс химиотерапия.<sup>26</sup> Резултати от проучване Medical Research Council AML15 показват, че профилактичните терапевтични интервенции с АТО при пациенти с молекулярен рецидив спират прогресията при повечето болни и честотата на едногодишна ПБР е 73%, а тригодишната кумулативна честота на рецидиви е едва 5%.<sup>19</sup>

Понятието *молекулярен рецидив* се дефинира като ново позитивиране на RT-PCR за *PML-RARa*-транскрипти (чувствителност  $10^{-4}$ ) при две последователни изследвания на материал от костномозъчен аспират.<sup>24</sup> Препоръчва се молекулярен мониторинг за МРБ да се извършва през три месеца, в продължение на две или три години след края на консолидиращо лечение.<sup>11, 21</sup> Съществуват данни, че неспазването на този интервал и удължаването му до 4-5 месеца води до пропускане на развитието на хематологичен рецидив.<sup>18</sup> Както молекулярният рецидив, така и трайното персистиране на високи нива на *PML-RARa* или тяхното нарастване в хода на проследяване са свързани с неблагоприятна прогноза и идентифицират пациенти с по-висок риск от рецидив и с по-кратка преживяемост.<sup>20</sup> Постигането на молекулярна ремисия след трети курс от консолидираща терапия се према като основна терапевтична цел при пациенти с ОПЛ, като и лонгитудинално RT-PCR-мониторинг и прилагане на превантивна терапия при молекулярно доказан рецидив понастоящем е възприета от повечето кооператив-

ни групи.<sup>27</sup> Изборът на конкретна терапевтична стратегия варира и зависи от конкретната ситуация и локално възприета клинична практика.

С цел индуциране на молекулярна ремисия при пациенти с рецидив на ОПЛ се прилага комбинация АТО плюс АТРА. Според установения *PML-RARa*-статус се препоръчват следните опции: автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки (авто-ТХСК) при пациенти с молекулярна ремисия, алогоенна ТХСК (ало-ТХСК) при пациенти с перистираща болест при молекулярен мониторинг [PCR(+)]<sup>28</sup> или до 6 курса АТО, със или без АТРА, със или без химиотерапия при RT-PCR-МРБ(+) пациенти, при които не може да се проведе ТХСК.<sup>26, 28</sup> Използването на комбинация АТРА-АТО като индукционно лечение е значително по-ефективно в сравнение с класическите протоколи, като четиригодишната кумулативна честота на молекулярни рецидиви е съотв. 1% срещу 18%.<sup>29</sup> Редица проучвания показват, че поддържащо лечение с АТРА, евентуално комбинирано с *6-mercaptopurine* или *methotrexate*, при високорискови пациенти с PCR(-)-резултат след консолидация има благоприятно прогностично значение. Същевременно значението на поддържащо лечение при пациенти с нисък риск, които са в молекулярна ремисия след консолидация, не е изяснено.<sup>30</sup> От друга страна, имайки предвид изключително ниския риск от рецидив при пациенти, получили АТО-базирани режими, икономическата рентабилност на молекулярния мониторинг е под въпрос, а някои автори смятат, че последователно проследяване на МРБ е необходимо само при висок риск с оглед да се предскаже рецидив и своевременно да се стартира превантивна терапия.<sup>27</sup>

**A**

■ Изследване на минимална резидуална болест чрез количествен RT-PCR се препоръчва като задължителен елемент от оценка на терапевтичен отговор при остра промиелоцитна левкемия, лекувана с таргетни препарати.

A

- Препоръчва се изследването на минимална резидуална болест при остра промиелоцитна левкемия да се провежда с количествена или качествена RT-PCR, с чувствителност не по-малка от  $10^{-4}$ , върху материал от костен мозък.
- Препоръчва се изследването на минимална резидуална болест да се провежда през три месеца в продължение на две-три години след края на консолидиращо лечение.
- Оценка на минимална резидуална болест в края на индукционно лечение се препоръчва при пациенти, получили терапия, съдържаща *Arsenic trioxide*, но не и при пациенти, лекувани с режими, съдържащи *All Trans Retinoic Acid*.
- Статусът на минимална резидуална болест, определена с RT-PCR след приключване на консолидиращо лечение, се препоръчва като най-важен прогностичен фактор за преживяемост без рецидив, налагащ верифициране на молекулярна ремисия в края на последния цикъл от консолидиращата терапия, независимо от използвания терапевтичен протокол.
- Препоръчва се проследяването на минимална резидуална болест да продължи не по-малко от две години, особено при високорискови пациенти.
- При доказване на молекулярен рецидив в края на консолидиращо лечение или след него се препоръчва стартиране на превантивно лечение, без да се изчаква развитие на клинично проявен рецидив.



- При всички пациенти със съмнение за остра левкемия задължително се прилага интегриран диагностичен подход, включващ морфология на периферна кръв и костен мозък, имунофенотипизация и провеждане на генетични изследвания за идентифициране на рекурентни генетични аберации и потенциални биомаркери за мониториране на резидуална болест.
- Изследването на минимална резидуална болест при остри левкемии следва да се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за интегриране на морфологична и молекулярна оценка на клиничния материал в съпоставка с основни клинични данни, заедно с годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести от всяко едно направление.

## ЛИТЕРАТУРА

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405
- Poddighe PJ, Weghuis DO. t(15;17)(q24;q21) PML/RARA; Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. in press
- Halftermeyer J, Le Bras M, De Thé H. RXR, a key member of the oncogenic complex in acute promyelocytic leukemia. *Med Sci (Paris)* 2011; 27 (11): 973-978
- Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8 (12): 1006-1016
- De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. *Expert Rev Hematol* 2014; 7 (3): 347-357
- dos Santos GA, Kats L, Pandolfi PP. Synergy against PML-RARa: targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 2013; 210 (13): 2793-2802
- van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13 (12): 1901-1928
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17 (12): 2318-2357
- Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, et al. Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RARa isoform type: long-term followup in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 2651-2656
- Tobal K, Liu YJ. RT-PCR method with increased sensitivity shows persistence of PML-RARA fusion transcripts in patients in long-term remission of APL. *Leukemia* 1998; 12 (9): 1349-1354
- De Angelis F, Breccia M. Molecular monitoring as a path to cure acute promyelocytic leukemia. *Rare Cancers and Therapy* 2015; 3 (1): 119-132
- Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, et al. Droplet digital PCR is a reliable tool for monitoring minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *J Mol Diagn* 2017; 19 (3): 437-444
- Ossenkoppele G, Schuurhuis GJ. MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2016; 2016(1): 356-365
- Fenaux P, Chomienne C, Degos L. Treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14 (1): 153-174
- Pettit K, Stock W, Walter RB. Incorporating measurable ('minimal') residual disease-directed treatment strategies to optimize outcomes in adults with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2016; 57 (7): 1527-1533
- Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, et al. Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups. *Blood* 1997; 90: 1014-1021
- Sanz MA, Martin G, Rayon C, et al. A modified AIDA protocol with anthracycline-based consolidation results in high antileukemic efficacy and reduced toxicity in newly diagnosed PML/RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia PETHEMA group. *Blood* 1999; 94: 3015-3021
- Santamaria C, Chillón MC, Fernández C, et al. Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2007; 92 (3): 315-322
- Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27 (22): 3650-3658
- Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009; 113 (9): 1875-1891

21. Chendamarai E, Balasubramanian P, George B, et al. Role of minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide in frontline therapy. *Blood* 2012; 119 (15): 3413-3419
22. Chen GQ, Shi XG, Tang W, et al. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), I: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerts dose dependent dual effects on APL cells. *Blood* 1997; 89: 3345-3353
23. Acute Promyelocytic Leukemia Clinical Practice Guideline Lyhe-008 Version 1, 2015. Available at: [www.albertahealthservices.ca](http://www.albertahealthservices.ca)
24. Lo-Coco F, Diverio D, Avvisati G, et al. Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1999; 94 (7): 2225-2229
25. Esteve J, Escoda L, Martín G, et al. Outcome of patients with acute promyelocytic leukemia failing to front-line treatment with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy (PETHEMA protocols LPA96 and LPA99): benefit of an early intervention. *Leukemia* 2007; 21 (3): 446-452
26. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2009; 113 (9): 1875-1891
27. Cicconi L, Lo-Coco F. Current management of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Ann Oncol* 2016; 27 (8): 1474-1481
28. Seftel MD, Barnett MJ, Couban S, et al. A Canadian consensus on the management of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia in adults. *Curr Oncol* 2014; 21 (5): 234-250
29. Burnett A, Russell NH, Hills RK, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16 (13): 1295-1305
30. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Acute Myeloid Leukemia. v.3, 2017. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)

### 1.1.6. TP53-мутация при миелодиспластичен синдром

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** TP53 е тумор-супресорен ген, чието увреждане под форма на делеции или соматични мутации се среща при различни хематологични неоплазии и солидни тумори. Генът е разположен на късото рамо на хромозома 17p13.1 и съдържа 11 екзона, от които 10 са кодиращи (2-11). Синтезираният p53-протеин е изграден от 393 аминокиселини и включва в структурата си следните домейни: (i) N-терминален домейн, който осигурява трансактивация на таргетните гени; (ii) централен ДНК-свързващ домейн, който директно взаимодейства с консенсусни ДНК-последователности в таргетните промотори; (iii) олигомеризационен домейн, чрез който четири мономерни полипептидни вериги се свързват една с друга и формират финална тетрамерна молекула; (iv) C-терминален домейн, който съдържа важни регулаторни области за ДНК-специфично и ДНК-неспецифично свързване с p53-протеина.<sup>1</sup> По своята същност синтезираният p53-протеин изпълнява функции на транскрипционен фактор, участващ в регулация на генната експресия в отговор на стрес-сигнали, в резултат на което се индуцира арест на клетъчния цикъл, стареене, ДНК-възстановяване или клетъчен метаболизъм.<sup>2</sup>

Нарушенията в TP53 при миелодиспластични синдроми (МДСи) могат да засягат само единия или и двата алела, като могат да бъдат свързани със загуба на 17p в резултат на хромозомни или субмикроскопски делеции и/или с придобиване на мутации, които могат да бъдат хетерозиготни (wt/mut), биалелни (mut1/mut2) или хомозиготни (mutwt/mut).<sup>3</sup> Мутациите в TP53 могат да бъдат локализирани в ДНК-свързващия домейн (24%), в трансактивационния домейн (3%), в тетрадимеризационния домейн (1%) или в друга област (72%).<sup>4</sup> Мутации в TP53 се доказват в около 7-10% от пациенти с

МДС<sup>5</sup>, като са значително по-чести при изолирано носителство на 5q- (20%), при високорискови пациенти с комплексен кариотип (70%)<sup>6</sup>, особено ако той включва и 5/5q-<sup>7</sup>, както и при МДСи, свързани с предхождащо лъчелечение и химиотерапия (40%).<sup>8, 9</sup> Честотата на аномалията при отделните субтипове МДС е съотв. 29.4% при мултилинейни цитопении, 26.7% при форми с ексцес на бласти, 25% при 5q- и 23.5% при унилинейна цитопения.<sup>10</sup> Според някои автори не се наблюдава изчезване на мутантния клон в хода на болестта или поява на нови клонове, което предполага, че мутациите в TP53 настъпват на ранен етап от болестта.<sup>7</sup> Според други, при нискорискови пациенти с МДС в две трети от случаите мутации в TP53 са установени към момента на диагноза, докато в една трета – вторично в хода на болестта.<sup>11</sup> В тази насока са и данните, че субклонове, носещи мутации в TP53, могат да се докажат месеци преди клинична изява на съответните промени.<sup>12</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Предвид изразената хетерогенност на локализация на мутациите в TP53 метод на избор е директното секвениране по Sanger, като през последните години приложение намира и секвениране от ново поколение (NGS). Изследването на мутации на TP53 няма диагностично значение в отсъствие на морфологични данни за МДС и според актуалните препоръки не е задължителен елемент от изследвания към момента на диагноза. Препоръчва се в случаи за разграничаване на клонална хемопоеза при МДС от бенигнени състояния, асоциирани с цитопении, както и за прецизиране на прогнозата при пациенти, стратифицирани в група с интермедиерна прогноза според IPSS или IPSS-R.<sup>13, 14</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Изборът на терапевтична стратегия при МДС се основава на оценка на риск за очаквана обща преживяемост (ОП) и вероят-

ност за трансформация в остра миелоидна левкемия (ОМЛ). За стратифициране на болни в рискови групи се използват разнообразни прогностични модели, между които с голямо значение са: (1) международна прогностична скоринг система [International Prognostic Scoring System (IPSS)], (2) ревизирана международна прогностична скоринг система [IPSS- Revised(IPSS-R)] и (3) прогностична скоринг система, основаваща се на класификацията на МДС на Световната здравна организация [WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS)].<sup>15</sup> Наскоро беше разработен и валидиран нов прогностичен модел, в който е включено и наличие на мутации в *TP53* и в някои други гени. Смята се, че този модел е много по-прецизен, тъй като мутациите в *TP53* имат независима прогностична стойност, разграничавайки четири групи с различен риск – нисък, интермедиерен-1, интермедиерен-2 и висок, съотв. с ОП от 37.4, 23.2, 19.9 и 12.2 месеца.<sup>16</sup>

Наличието на *TP53*-мутации при МДС корелира с неблагоприятно клинично протичане, с бърза прогресия и повишен риск от трансформация в ОМЛ.<sup>17,18</sup> Медианната ОП при носителство на *TP53*-мутации е значително по-кратка срещу пациенти, при които аномалията отсъства (19 срещу 65 месеца). Аналогична закономерност се наблюдава и по отношение на ОП при носителство на делеции на *TP53* (без мутации) срещу болни, при които аномалията отсъства (24 срещу 65 месеца).<sup>5</sup> В друго проучване се съобщава медианна ОП при *TP53*-мутации от 9 месеца срещу 66 месеца при пациенти с нормални *TP53*-алели.<sup>7</sup> Значими различия, свързани с *TP53*-мутационния статус, се наблюдават във всички прогностични групи, включително и при МДС с изолирано носителство на *del(5q)* – подтип, обикновено характеризиращ се с благоприятен клиничен ход.<sup>19</sup> При пациенти с IPSS висок/интермедиерен-2 риск и доказани мутации в *TP53* се отчита ОП от 6 месеца срещу 18 месеца при тези, при които генът е интактен.<sup>20</sup> В група с IPSS нисък/интермедиерен-1 риск ОП при наличие на мутации е 18 месеца срещу

28 месеца при отсъствие.<sup>21</sup> Мутациите в *TP53* неблагоприятно повлияват и посттрансплантационната преживяемост при пациенти, третирани с алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки (ало-ТХСК), независимо от клиничните фактори.<sup>22</sup>

Някои данни предполагат, че прогностичната значимост на мутации в *TP53*-гена може да варира според конкретната ситуация при отделния пациент, като се смята, че значение имат видът на мутациите<sup>4</sup> и големината на *TP53*-мутационния товар, която директно корелира с ОП.<sup>23</sup> Средният мутационен товар за мутации в *TP53* при МДС е 41.9 (граница 5-100).<sup>4</sup> Пациенти с мутационен товар < 6% се характеризират със стабилен клиничен ход и без прогресия за продължителен период от време, като ОП и преживяемостта без прогресия (ПБП) не са скъсени.<sup>11</sup> За разлика от тях, медианната ОП при *TP53*-мутации, установени към момента на диагнозата и с мутационен товар > 6%, е 43.5 срещу 138 месеца при пациенти без мутации; същата закономерност се установява и за ПБП – 20.2 срещу 116.6 месеца.<sup>11</sup> В друго проучване се съобщава, че при средна ОП при мутации в *TP53* от 8.24 месеца стойностите на показателя варират според мутационния товар (МТ) от 12.4 (нисък МТ: < 25%), 8.5 (интермедиерен МТ: 25-50%) до 3.4 месеца (висок МТ: > 50%).<sup>4</sup> При пациенти, лекувани с ало-ТХСК, наличието на *TP53*-мутации е свързано с неблагоприятна прогноза и ранни рецидиви само ако аномалията е в комбинация с комплексен кариотип, докато резултатите са значително по-добри при наличие само на мутации без комплексен кариотип. Поради това чрез трансплантация може да се постигне дългогодишна преживяемост при наличие на изолирани *TP53*-мутации без комплексен кариотип.<sup>24</sup>

Пациенти с по-нисък риск [IPSS нисък и интермедиерен-1; IPSS-R много нисък, нисък и интермедиерен, WPSS много нисък, нисък, и интермедиерен] се характеризират с по-

индолентно клинично протичане, поради което в тези групи не се препоръчват протоколи с повишен риск от ранна смъртност и се използват (според конкретната клинична ситуация) само наблюдение, трансфузионна терапия, еритропоетин, анти timoцитен глобулин със или без *cyclosporine*, имуномодулатори (*lenalidomide*), растежни фактори или хипометилиращи агенти (*azacitidine*, *decitabine*). За разлика от тях, пациентите с по-висок риск [IPSS интермедиерен-2 и висок; IPSS-R интермедиерен, висок и много висок; WPSS висок и много висок], при които се наблюдава клинично протичане, сходно с това при ОМА, са показани за ало-ТХСК, а при невъзможност да се проведе – за ОМА-подобни протоколи, включващи интензивна химиотерапия. При пациенти, при които не могат да бъдат приложени тези два подхода, се използват хипометилиращи агенти.<sup>13</sup>

Пациенти с МДС с del(5q), нисък или интермедиерен-1 IPSS скор и наличие на TP53-мутации имат значително по-висок риск от трансформация в ОМА, поради което трябва да им се препоръчва *lenalidomide* или алтернативни терапевтични възможности.<sup>25</sup> Същевременно при МДС с изолирано носителство на del(5q) доказването на аномалията е свързано с по-слаб отговор към *lenalidomide*, отколкото при останалите пациенти<sup>19</sup>, поради което се препоръчва изследване на мутационен статус при всички,

при които се планува започване на лечение.<sup>25</sup> Някои предварителни данни предполагат, че при тези пациенти използването на *canersen* (антисансов олигонуклеотид, комплементарен на TP53) позволява да се подтисне експресията на мутантния p53 и да се възстанови нарушената еритропоеза.<sup>26</sup>

По правило ало-ТХСК е единствен подход с потенциал за излекуване при пациенти МДС с висок риск.<sup>27</sup> Пациентите с мутации в TP53, при които е приложена, имат значително по-добра ОП спрямо тези, получили друго лечение (14.9 срещу 8.9 месеца).<sup>4</sup> През последните години хипометилиращите агенти (*5-azacitidine*, *decitabine*) са стандарт за лечение при МДС с висок риск. Пациенти с мутации в TP53 първоначално отговарят добре, но продължителността на отговора е значително по-кратка от тази при пациенти без мутация.<sup>28</sup> В някои проучвания (ClinicalTrials.gov number, NCT01687400) се съобщава добър, макар и непродължителен, отговор към *decitabine* с ОП, сходна с тази при пациенти с цитогенетични аномалии, асоциирани с интермедиерна прогноза.<sup>29</sup> В друго проучване се съобщава, че наличието на мутации в TP53 е предиктивен маркер за пълен отвор към *decitabine*, наблюдаван в 66.7% от пациентите, вкл. и в случаи с носителство на комплексен или монозомален кариотип, без това обаче да е асоциирано с подобрена преживяемост поради ранни рецидиви и трансформации в ОМА.<sup>30</sup>

## С

- При всички подтипове на миелодиспластичен синдром се обсъжда изследване за наличие на мутации в TP53-гена, като независим негативен прогностичен фактор.
- Метод на избор за доказване на TP53-мутации е секвениране по Sanger или секвениране от ново поколение (NGS).
- Имунохистохимично изследване на p53 в костномозъчни биопсии се препоръчва в рутинната практика като ориентиrowъчен тест за оценка на p53-статус.



**C**

- При пациенти с миелодиспластичен синдром с нисък риск и *TP53*-мутации се препоръчва прилагане на *lenalidomide* или включване в клинични проучвания.
- При пациенти с миелодиспластичен синдром с висок риск и *TP53*-мутации се препоръчва провеждане на алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки или включване в програми за експериментално лечение. При пациенти, при които не може да се проведе алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки, се препоръчва използване на хипометилиращи агенти.



*Изследване за TP53-мутации не е задължителен елемент на диагностичния панел при миелодиспластичен синдром. Препоръчва се при пациенти, стратифицирани в група с нисък или интермедиерен риск, за прецизиране на прогнозата.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2 (6): a000919
2. Riley T, Sontag E, Chen P, et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9 (5): 402-412
3. Jasek M, Gondek LP, Bejanyan N, et al. *TP53* mutations in myeloid malignancies are either homozygous or hemizygous due to copy number-neutral loss of heterozygosity or deletion of 17p. *Leukemia* 2010; 24 (1): 216-219
4. Al-Issa K, Sekeres MA, Nielsen AD, et al. *TP53* Mutations and Outcome in Patients with Myelodysplastic Syndromes (MDS). *Blood* 2016; 128 (22): 4336
5. Stengel A, Kern W, Haferlach T, et al. The impact of *TP53* mutations and *TP53* deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases. *Leukemia* 2017; 31 (3): 705-711
6. Shahrabi S, Khosravi A, Shahjehani M, et al. Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: New insights. *Oncol Rev* 2016; 10 (2): 311
7. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mian SA, et al. *TP53* mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol* 2013; 160: 660-672
8. Ok CY, Patel KP, Garcia-Manero G, et al. *TP53* mutation characteristics in therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia is similar to de novo diseases. *J Hematol Oncol* 2015; 8:45
9. Sebaa A, Ades L, Baran-Marzack F, et al. Incidence of 17p deletions and *TP53* mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. *Genes Chromosom Cancer* 2012; 51: 1086-1092
10. Ciabatti E, Valetto A, Bertini V, et al. Myelodysplastic syndromes: advantages of a combined cytogenetic and molecular diagnostic workup. *Oncotarget* 2017; doi: 10.18632/oncotarget

11. Belickova M, Vesela J, Jonasova A, et al. *TP53* mutation variant allele frequency is a potential predictor for clinical outcome of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *Oncotarget* 2016; 7 (24): 36266-36279
12. da Silva-Coelho P, Kroeze LL, Yoshida K, et al. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Commun* 2017; 8: 15099
13. Greenberg PL, Attar E, Bennet JM, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Myelodysplastic Syndromes. v2,2017. Available at: www.nccn.org
14. Fenaux P, Haase D, Sanz GF, et al. Myelodysplastic Syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2014; 25 (Suppl. 3): iii57-iii69
15. Della Porta MG, Galli A, Bacigalupo A, et al. Clinical effects of driver somatic mutations on the outcomes of patients with myelodysplastic syndromes treated with allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2016; pii: J CLIN ONCOL673616
16. Nazha A, Narkhede M, Radivoyevitch T, et al. Incorporation of molecular data into the Revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2016; 30 (11): 2214-2220
17. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes [published online ahead of print September 12, 2013]
18. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011; 364 (26): 2496-2506
19. Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP 53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol* 2011; 29 (15): 1971-1979
20. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2011; 364: 2496-2506
21. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3376-3382
22. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2691-2698
23. Zhang L, McGraw KL, Sallman DA, List AF. The role of p53 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: molecular aspects and clinical implications. *Leuk Lymphoma* 2017; 58 (8): 1777-1790
24. Yoshizato T, Nannya Y, Atsuta Y, et al. Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood* 2017; 129 (17): 2347-2358
25. Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood* 2013; 122 (17): 2943-2964
26. Caceres G, McGraw K, Yip BH, et al. *TP53* suppression promotes erythropoiesis in del(5q) MDS, suggesting a targeted therapeutic strategy in lenalidomide-resistant patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110 (40): 16127-16132
27. Bhatt VR, Steensma DP. Hematopoietic cell transplantation for myelodysplastic syndromes. *J Oncol Pract* 2016; 12 (9): 786-792
28. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28: 562-569
29. Welch JS, Petti AA, Miller CA, et al. *TP53* and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 2016; 375 (21): 2023-2036
30. Chang CK, Zhao YS, Xu F, et al. *TP53* mutations predict decitabine-induced complete responses in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2017; 176 (4): 600-608

## 1.2. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ОСТРА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕВКЕМИЯ

### 1.2.1. Цитогенетика

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Клонални промени в кариотипа се установяват в около 60-79% от възрастни пациенти и в около 57-82% от деца с остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ).<sup>1</sup> Видът и честотата на хромозомните аномалии варира според възрастовата група. Например  $t(4;11)(q21;q23)/KMT2A-AFF1(MLL-AF4)$  се среща в 70-80% при кърмачета с ОЛЛ, в 2% при деца и в 6% при възрастни.<sup>2</sup> Изразена тенденция за нарастване с възрастта се отбелязва по отношение на  $t(9;22)(q34;q11.2)/BCR-ABL1$  – 1-3% при деца под 10 години, 10% във възрастовата група 15-39 години, 25% в група 40-49 години и 20-40% при пациенти > 50 години.<sup>3</sup> Изразени различия в честотата при деца и възрастни се наблюдават и по отношение на редица други аномалии: хипердиплоидия с 51-65 хромозоми (съотв. 23-30% срещу 7-8%),  $t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1(TEL-AML1)$  (22% срещу 2%)<sup>3</sup> и др. Изразени различия в спектъра на хромозомните аномалии се установяват и по отношение на линейната принадлежност на бластната популация (В-ОЛЛ спрямо Т-ОЛЛ). При В-ОЛЛ редица хромозомни аномалии се характеризират със специфични имунофенотипни особености на бластната популация, клинично протичане и отговор към терапия. Някои от тях, според последната ревизия на Класификацията на лимфоидни неоплазии на Световната здравна организация (WHO), 2016, дефинират отделни подтипове ОЛЛ, отнасящи се към категория *В-лимфобластни левкемии/лимфоми* (В-ОЛЛ) с рекурентни генетични аномалии, към която се отнасят: (i) В-ОЛЛ с  $t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR-ABL1$ ; (ii) В-ОЛЛ с  $t(v;11q23.3)$  с преустройство на *KMT2A-*

гена; (iii) В-ОЛЛ с  $t(12;21)(p13.2;q22.1)/ETV6-RUNX1$ ; (iv) В-ОЛЛ с хипердиплоидия; (v) В-ОЛЛ с хиподиплоидия; (vi) В-ОЛЛ с  $t(5;14)(q31.1;q32.3)/IL3-IGH$ ; (vii) В-ОЛЛ с  $t(1;19)(q23;p13.3)/TCF3-PBX1$ ; (viii) В-ОЛЛ с хромозомни транслокации, засягащи тирозинкинази или цитокинови рецептори – В-ОЛЛ с *BCR-ABL1*-подобна генна експресия (сигнатура); (ix) В-ОЛЛ с *iAMP21*.<sup>4</sup> Шест от тези подтипове се диагностицират въз основа на конвенционален цитогенетичен анализ. По правило хромозомните транслокации при В-ОЛЛ водят до формиране на фузионни гени и синтез на патологични хибридни онкопротеини. При Т-ОЛЛ цитогенетични аномалии се установяват в > 50%, като спектърът им варира от рекурентни транслокации, установими чрез кариотипизация, до криптични делеции, които се доказват единствено чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). Характерно за транслокациите при Т-ОЛЛ е, че често ангажират локуси на гени на Т-клетъчни рецептори (TCR) –  $14q11(TCRA)$  и  $7q34(TCRB)$ , при което различни гени, кодиращи фактори на транскрипция (*TAL1*, *TLX1(HOX11)*, *TLX3*, *LMO2*, *LYL1*), попадат под контрол на регулаторните елементи на *TCR*-гените, които ги активират с последваща свръхпродукция на структурно нормални протеини. Най-чести криптични делеции при Т-ОЛЛ са  $del(9p21)$  и  $del(1p32)$ .<sup>5</sup> С най-изразена прогностична значимост при възрастни с В-ОЛЛ е доказване на  $t(9;22)(q34;q11)$ ,  $t(4;11)(q21;q23)$ , наличие на комплексен кариотип, както и на хипердиплоидия или хиподиплоидия.<sup>6</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Стандартният цитогенетичен анализ е задължителен елемент от диагностичния панел при пациенти с новодиагностицирана ОЛЛ. Чрез нея се установяват разнообразни структурни и бройни хромозомни аберации, независимо дали са балансирани, или не, срещани се самостоятелно или в комбинация в левкемични клетки. За получаване на годни за анализ метафази пробите от костномоз-

зъчен аспират се подлагат на нестимулирани краткотрайни (24- или 48-часови) култури *in vitro*, в края на които се подлагат на третиране за спиране на клетъчното деление в метафаза, обработка с хипотоничен разтвор и фиксатори. Микроскопските препарати, съдържащи метафазни фигури, се подлагат на хромозно леново оцветяване (най-често G-оцветяване) и се анализират микроскопски. По правило се анализират 20 или повече метафази, като при наличие на абнормен кариотип могат да бъдат достатъчни и по-малко от 20, докато при нормални е желателно броят им да е не по-малко от 20. За да имат клинична значимост, промените в кариотипа трябва да бъдат клонални, т.е. наличие на най-малко в две метафази на идентични структурни аномалии и тризомии и наличие в най-малко три метафази, когато се касае за идентична загуба на хромозоми (монозомии).<sup>6</sup> Установяването на някои аномалии, каквато е  $t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR-ABL1$ , е желателно да се извърши в рамките на 48-72 часа с оглед стартиране на специфично таргетно лечение; в тези случаи се препоръчва използване на FISH или RT-PCR. Същите трябва да се имат предвид и за търсенето на някои клинично значими криптични аберации, каквито са  $t(12;21)(p13.2;q22.1)/ETV6-RUNX1$ ,  $iAMP21$  и др., оставащи недоловими при конвенционален цитогенетичен анализ.

**Доказателства за предиктивно значение.** Установяването на няколко структурни и бройни аномалии е основен диагностичен критерий за класифициране на шест от общо девет подтипа на В-ОЛЛ, включени в категория В-ОЛЛ с рекурентни цитогенетични аномалии:  $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ,  $t(v;11q23.3)$ , хипердиплоидия, хиподиплоидия,  $t(5;14)(q31.1;q32.3)$  и  $t(1;19)(q23;p13.3)$ . Аналогични подтипове при Т-ОЛЛ липсват.<sup>7</sup> Редица хромозомни аномалии имат отчетлива асоциация с клиничен ход, отговор към лечение и преживяемост, поради което са едни от най-важните прогностични фактори. При В-ОЛЛ те са: (i) хромозомни аберации с благоприятна прогноза и с петгодиш-

на обща преживяемост (ОП) от 49-50% – хипердиплоидия (особено при наличие на тризомии на хромозоми 4, 10, 17); (ii) хромозомни аберации с интермедиерна прогноза –  $t(5;14)(q31;q32)$  и  $t(1;19)(q23;p13.3)$ ; (iii) хромозомни аномалии с неблагоприятна прогноза и с петгодишна ОП от 13-28% –  $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ,  $t(v;11q23.2)$ , хиподиплоидия (особено при  $< 44$  хромозоми), комплексен кариотип (наличие на  $\geq 5$  хромозомни аберации).<sup>3,8</sup> При Т-ОЛЛ с благоприятна прогноза са  $t(1;14)(p32;q11)$ ,  $t(7;10)(p34;q24)$  и  $t(10;14)(q24;q11)$ . По отношение на редица други аберации, вкл. и  $t(5;14)(q35;q32)$ , клиничната значимост не е добре изяснена.<sup>6,9</sup>

Доказването на  $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ , водеща до формиране на Филадельфийска хромозома (Ph) (една от двойка дериватни хромозоми (22q-), образувани при транслокация), е изключително важно, тъй като е една от аномалиите с най-изразена неблагоприятна прогноза – петгодишна ОП при Ph(+) е 16% срещу 36% при Ph(-) ОЛЛ. От друга страна, отграничаването на пациенти с Ph(+) ОЛЛ е важно и за избора на терапия, тъй като терапевтичните протоколи включват задължително тирозинкиназен инхибитор (ТКИ), най-често в съчетание с конвенционална полихимиотерапия. Последната, включително и при използване на високи дози *cytosine arabinoside* и *methotrexate*, рядко е ефективна.<sup>10</sup> Понастоящем за лечение на Ph(+) ОЛЛ са одобрени три ТКИи – *imatinib*, *dasatinib* и *ponatinib*. Например добавяне на *imatinib* към протокол hyper-CVAD (*cyclophosphamide*, *vincristine*, *doxorubicin*, *dexamethasone/methotrexate*, *cytarabine*) води до увеличаване на тригодишната продължителност на пълна ремисия от 24% (hyper-CVAD) на 68% (hyper-CVAD с *imatinib*). Добавяне на *dasatinib* към hyper-CVAD води до пълна ремисия в 94%. Използване на *ponatinib* позволява постигане на голям хематологичен отговор при 41% от пациентите с Ph(+) ОЛЛ след неуспех от *dasatinib* или *nilotinib*, вкл. и при наличие на T315I-мутация, която обуславя резистентност към всички останали

ТКИи. Независимо от това, прогнозата при Ph(+) ОЛЛ остава неблагоприятна, поради което алогенната трансплантация на хемопоеични стволови клетки продължава да бъде съществен елемент от терапевтична стратегия, асоциирана с по-добра преживяемост без рецидив (ПБР) при по-млади пациенти.<sup>11</sup> Алогенната трансплантация се препоръчва и при пациенти с Ph(-) ОЛЛ, носещи хромозомни аномалии, свързани с неблагоприятна прогноза – t(v;11q23.2), хиподиплоидия и комплексен кариотип, като

единствен терапевтичен подход с потенциал за излекуване.<sup>12</sup> При пациенти със стандартен и нисък риск трансплантацията не се препоръчва поради висока смъртност, свързана с процедурата (20-30%), за разлика от много добри резултати при по-млади пациенти с педиатрични протоколи, при които се постига ОП от 70%, при ниска смъртност, свързана с лечение (3%).<sup>13</sup>

**A**

- При новодиагностицирани пациенти с остра лимфобластна левкемия се препоръчва конвенционален цитогенетичен анализ чрез хромозомно лентово оцветяване, като задължителен елемент от диагностичния панел.
- Установяването на някои специфични хромозомни аберации е основен диагностичен критерий за класифициране на някои подтипове В-остра лимфобластна левкемия, включени в категория *В-остра лимфобластна левкемия с рекурентни аномалии*.
- Тестването за t(9;22)/Ph-хромозома се препоръчва при всички пациенти с остра лимфобластна левкемия с оглед подбор на пациенти за комбинирани протоколи, включващи полихимиотерапия и тирозинкиназен инхибитор (*imatinib, dasatinib, ponatinib*).
- При млади пациенти с хромозомни аномалии с неблагоприятна прогностична стойност се препоръчва алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки като съществен елемент от цялостната терапевтична стратегия.



*Наличието на някои специфични хромозомни аберации е един от най-важните прогностични фактори при остри лимфобластни левкемии.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23 (5): 991-1010
2. Jha S, Kantarjian HM. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults: Lessons learned and future directions. In: *Treatment of Acute Leukemias: New Directions for Clinical Research (Current Clinical Oncology)*. Editor Pui, Ching-Hon, Humana Press, 2003, pp. 113-120
3. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2016. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405
5. Raimondi SC. T-lineage acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Atlas genet cytogenet oncol haematol*. 2007; 11 (4): 328-339
6. Association for Clinical Cytogenetics (ACC). Professional guidelines for clinical cytogenetics: Acute lymphoblastic leukemia. 2011, v1.00
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405
8. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2014; 124 (9): 1434-1444
9. Raimondi SC, Heerema NA. Cytogenetics in children, adolescents and young adults with ALL and AML. In: *Hematological malignancies in children, adolescents and young adults*. Eds. Cairo MS, Perkins SL. 2012, 101-120
10. Gleissner B, Gökbüget N, Bartram CR et al. Leading prognostic relevance of the BCR-ABL translocation in adult acute B-lineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood* 2002; 99: 1536-1543
11. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, et al. ESMO Guidelines Committee. Acute lymphoblastic leukemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 (Suppl. 5): v69-v82
12. Khaled SK, Thomas SH, Forman SJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia (ALL) in adults. *Curr Opin Oncol* 2012; 24 (2): 182-190
13. Curran E, Stock W. How I treat acute lymphoblastic leukemia in older adolescents and young adults. *Blood* 2015; 125 (24): 3702-3710

### 1.2.2. IKZF1-делеция

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Генът *IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1)* е разположен на късо-то рамо на хромозома 7p12.2, съдържа осем екзона и кодира синтез на протеин, изграден от 519 аминокиселини, изпълняващ функцията на транскрипционен фактор с ключово значение за регулация на лимфоидната диференциация.<sup>1</sup> Разграничават се най-малкото 11 различни сплайсингови изоформи на транскриптите с общ C-терминален домейн, съдържащ два цинк-пръстоподобни мотива (цинкови пръсти, zinc-fingers), които са необходими за хетеро- и хомодимеризация и взаимодействие с други протеини. Отделните изоформи се различават по брой на N-терминални цинк-пръстоподобни мотиви, чрез които се реализира свързване с ДНК, както и по наличие на сигнал за ядрена локализация, в резултат на което се синтезират протеини със и без ДНК-свързващи свойства.<sup>2</sup> От критично значение за функционалната активност на IKZF1-протеина е броят на N-терминалните цинк-пръстоподобни мотиви в отделни изоформи, като само пет от тях (Ik1, Ik2, Ik2A, Ik3 и Ik3A) съдържат необходимите три или повече мотива, осигуряващи свързване с висок афинитет към специфични ДНК-последователности в промоторите на таргетните гени; по този начин те се транслират в протеини, които са активатори на транскрипция. Останалите изоформи (Ik4, Ik4A, Ik5, Ik6, Ik7 и Ik8) се транслират в протеини, които не притежават ДНК-свързващ капацитет, разположени са основно в цитоплазмата и изпълняват функции на доминантно-негативни фактори.<sup>3</sup>

Наличие на придобити нарушения във функцията и/или структурата на IKZF1-гена в резултат на епигенетични нарушения (експресия на Ik6-изоформа, хиперметилиране или хиперфосфорилиране) или генетични нарушения (делеции, транслокации или

мутации) се съобщават при редица солидни тумори и хематологични неоплазии.<sup>4</sup> При остри лимфобластни левкемии (ОЛЛи) *KZF1* се смята за един от най-важните клинично значими тумор-супресорни гени. Нарушения на *IKZF1* под форма на делеции или мутации се доказват при над 70% от *BCR-ABL1(+)* В-ОЛЛ, както при *de novo* В-ОЛЛ, така и при бластна криза на хронична миелоидна левкемия (ХМЛ). В допълнение, нарушения в *IKZF1*-гена се установяват и в част от пациенти с *BCR-ABL1(-)* В-ОЛЛ, имащи профил на генна експресия, сходен с този при *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ; поради това те се отнасят към група на т.нар. *подобни на BCR-ABL1 (BCR-ABL1-like)* ОЛЛ.<sup>5</sup> Мутации в *IKZF1* се съобщават и при Т-ОЛЛ, по-често при ранни Т-клетъчни прекурсорни (ЕТР) левкемии.<sup>6</sup> Спектърът от молекулярни нарушения на *IKZF1*-гена при В-ОЛЛ включва: делеции (90%) и точкови мутации (10%). Най-общо, делециите на *IKZF1*-гена се разделят на две основни форми: (i) пълна загуба на един *IKZF1*-алел в резултат на монозомия 7 или големи делеции на 7p-рамо (15%); (ii) интрагенни делеции, към които се отнасят: (а) делеция на екзони 4 до 7 ( $\Delta 4-7$ ) (30%), които водят до експресия на доминантно-негативна изоформа Ik6; (б) делеция на екзони 2 до 7 ( $\Delta 2-7$ ) (15%), при която липсва експресия на съответен алел, тъй като екзон 2 кодира инициращ АТГ-кодон; (с) други делеции (30%), при които се засягат първият некодиращ екзон и различни по дължина 5'-фрагменти или други комбинации от кодиращи екзони, например екзони 2-8. Като цяло, при В-ОЛЛ преобладават моноалелни делеции, но в около 12% се засягат и двата алела с пълно отсъствие на протеин *ikaros*.<sup>7</sup> Смята се, че делециите в *IKZF1*-гена не са първични патогенетични нарушения, а настъпват вторично в хода на малигнена трансформация или при клонална прогресия на болестта.<sup>3</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Понастоящем липсва валидирана технология за изследване на делеции на *IKZF1*-гена за клинични цели, като нито един от наличните

методологии не отговоря напълно на нуждите на клиничната практика.<sup>7</sup> Приложение намират флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH), ДНК-микрочипово изследване на полиморфизма на единични нуклеотиди (SNP)<sup>8</sup>, мултиплексна лиганд-зависима амплификация (MLPA)<sup>9</sup>, мултиплексна полимеразно-верижна реакция (PCR)<sup>10</sup> и секвениране<sup>11</sup>. Основните проблеми при методите включват: чрез FISH не могат да се докажат по-малки интрагени делеции, а делеции в *IKZF1* могат да се пропуснат от SNP-арей и MLPA, ако се носят от по-малки субклонове (съотв. < 10% и < 30%); от друга страна, големи делеции, засягащи целия алел, се пропускат от мултиплексна PCR.<sup>4</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Делеции в *KZF1* се срещат при всички основни цитогенетични подгрупи ОЛЛ, независимо че честота може да варира. Най-висока честота се съобщава при *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ (75%) и в групата с интермедиерна прогноза (пациенти с нормален кариотип, неспецифични хромозомни аберации или с неуспех от конвенционално цитогенетично изследване) (30%). За разлика от тях, делециите са редки при пациенти с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ (3-6%). Вероятно това е причина за изразени различия в честотата на аномалията при деца и възрастни – съотв. 12% и 57%.<sup>12, 13</sup> Данните за прогностична значимост на делециите в *IKZF1* варират според възрастовата група и цитогенетичната рискова група. При деца с В-ОЛЛ наличието на делеции в *IKZF1* се смята за неблагоприятен прогностичен фактор, свързан с повишен риск от рецидив и скъсена преживяемост без събития (ПБС). Смята се, че делециите в *IKZF1* са единствена субмикроскопска делеция, която проявява значима асоциация с резултати от лечението, особено при пациенти с интермедиерен риск.<sup>4</sup> Въз основа на анализ на 694 деца с ОЛЛ, лекувани според ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 2000 протокол, пациенти с *IKZF1(+)* ОЛЛ се характеризират с по-кратка петгодишна ПБС, основно за сметка на по-висока кумулативна честота на рецидиви в сравнение с тези,

при които отсъстват делеции ( $0.21 \pm 0.04$  срещу  $0.10 \pm 0.01$ ). Впреки че са наблюдавани значими различия в петгодишната ОП в цялата група, свързани с *IKZF1*-делеционния статус, тези различия се губят, когато се анализира преживяемостта в отделни рискови групи, което предполага, че пациенти с *IKZF1*-делеции при рецидив запазват в известна степен чувствителност към лечение.<sup>12</sup> Въз основа на метаанализ на 15 проучвания, включващи общо 5021 пациенти с ОЛЛ (възрастни и деца), авторите демонстрират, че наличие на *IKZF1*-делеции има неблагоприятно значение за ПБС (HR 2.32, 95%CI 1.97-2.74) и ОП (HR 2.56, 95%CI 1.75-3.74).<sup>14</sup> Все още не е ясно дали *IKZF1*-делециите са независим прогностичен фактор при детски *BCR-ABL1(-)* ОЛЛ, когато се вземат предвид ниво на минимална резидуална болест и наличие на придружаващи аномалии. Съществува мнение, че неблагоприятната прогноза, свързана с *IKZF*-делеции, корелира по-скоро с подлежаща геномна нестабилност, отколкото със самите делеции.<sup>4</sup> От друга страна, данните за прогностично значение на делециите в *IKZF1*-гена при възрастни с ОЛЛ не са толкова еднопосочни, както при деца. Метаанализ на осем проучвания, включващи 1008 пациенти, съобщава, че делециите имат независимо неблагоприятно значение за редица прогностични променливи – ОП, преживяемост без болест (ПББ), преживяемост без рецидив (ПБР) и др. Това неблагоприятно прогностично значение е изразено само в групата на *BCR-ABL1(-)*, но не и при *BCR-ABL1(+)* пациенти.<sup>15</sup> От друга страна, в някои проучвания се отбелязва противоположна тенденция – при *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ пациенти с *IKZF1*-делеции се характеризират с по-кратка ПББ срещу тези без делеции (10 срещу 32 месеца), с по-кратко медианно време на кумулативна честота на рецидиви (10.1 срещу 56.1 месеца), както и със значително по-висока кумулативна честота на рецидиви (69.1% срещу 40.4%).<sup>16</sup> В заключение, независимо от преобладащите данни за прогностично



значение на *IKZF1*-делеции при В-ОЛЛ, особено при деца, изследването им не е част от препоръчителния панел от генетични аномалии към момента на диагноза.<sup>17,18</sup> Това е свързано с отсъствие на адекватен скриниращ подход за всички клинично значими

форми на аномалията и с тяхната хетерогенност, с наличие на съпътстващи генетични аномалии, различия в биологията на болестта, както и с относително малкия брой изследвани случаи при възрастни.

**С**

**Изследване за *IKZF1*-делеции не се препоръчва като задължителен елемент в диагностичния панел при новодиагностицирана остра лимфобластна левкемия.**



- **При детски остри лимфобластни левкемии *IKZF1*-делециите имат отчетливо неблагоприятно значение за честота на рецидиви, продължителност на преживяемост без болест/събития и обща преживяемост, докато при възрастни данните са противоречиви.**
- **Понастоящем липсва валидиран метод за тестване на всички клинично значими делеции в *IKZF1*-гена.**

## ЛИТЕРАТУРА

1. Huret, JL. IKZF1 (Ikaros family zinc finger 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 2000; 4 (4): 179-180
2. Reyes-León A, Juárez-Velázquez R, Medrano-Hernández A, et al. Expression of Ik6 and Ik8 isoforms and their association with relapse and death in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE* 2015; 10 (7): e0130756
3. Meyer C, Zur Stadt U, Escherich G, et al. Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. *Am J Blood Res* 2013; 3(2):165-173
4. Olsson L, Johansson B. Ikaros and leukaemia. *Br J Haematol* 2015; 169 (4): 479-491
5. Zhao Y, Huang H, Wei G. Novel agents and biomarkers for acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 40
6. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2012; 481 (7380): 157-163
7. Kastner P, Dupuis A, Gaub MP, et al. Function of Ikaros as a tumor suppressor in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Blood Res* 2013; 3 (1): 1-13
8. Qazi S, Uckun FM. Incidence and biological significance of IKZF1/Ikaros gene deletions in pediatric Philadelphia chromosome negative and Philadelphia chromosome positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2013; 98 (12): e151-152
9. Yao QM, Liu KY, Gale RP, et al. Prognostic impact of IKZF1 deletion in adults with common B-cell acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer* 2016; 16: 269
10. Caye A, Beldjord K, Mass-Malo K, et al. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2013; 98 (4): 597-601

11. Qazi S, Ma H, Uckun FM. Absence of genomic Ikaros/IKZF1 deletions in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Med Sci* 2013; 3(9): 72-82
12. Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica* 2013; 98 (3): 428-432
13. Tokunaga K, Yamaguchi S, Iwanaga E, et al. High frequency of IKZF1 genetic alterations in adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol* 2013; 91: 201-208
14. Jia M, Wang ZJ, Li JY, et al. The impact of IKZF1 deletion on the prognosis of acute lymphoblastic leukemia: an updated meta-analysis. *Cancer Biomark* 2014; 14 (6): 493-503
15. Zhang W, Kuang P, Li H, et al. Prognostic significance of IKZF1 deletion in adult B cell acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Ann Hematol* 2017; 96 (2): 215-225
16. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* 2009; 27 (31): 5202-5207
17. Hoelzer D, Bassan R, Dombret H, et al. Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 (Suppl. 5): v69-v82
18. Alvarnas JC, Brown PA, Advani A, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: Acute lymphoblastic leukemia, v2.2016. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)

### 1.2.3. Субтип на Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна В-лимфобластна левкемия/лимфом

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** *Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом* (В lymphoblastic leukaemia/lymphoma, BCR-ABL1-like) е относително наскоро описана подгрупа, съставена от неопластични клетки от В-клетъчна линия на диференциация. Включена е като провизорна нозологична единица в редактираната Четвърта версия на WHO класификацията на хемопоеични и лимфоидни неоплазии от 2016 г. и се дефинира с профил на генна експресия, много подобен на този на остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ), носеща Rh-хромозома и/или фузионния ген BCR-ABL1, но без самото BCR-ABL1-пренареждане. Често при левкемии с тези характеристики се доказват транслокации, които ангажират други тирозинкинази или алтернативно имат транслокации, включващи или CRLF2 (цитокин-рецептор-подобен фактор 2), или в по-редки случаи – пренареждане, водещо до скъсяване и активиране на EPOR (еритропоетинов рецептор).<sup>1</sup> В 91% от случаите е идентифицирана промяна на поне една активираща киназа. Засягането на множество различни кинази обуславя обозначаване на тази хетерогенна категория като *kinase-driven* ОЛЛ, съставена от обособени клинично значими подгрупи с различни основни генетични особености според засегнатите специфични кинази. Налице са няколко основни групи: две от тях се отличават с активиране на ABL- или JAK-STAT-пътя на сигнална трансдукция; третата се характеризир с участие на променени гени, които са част от RAS-пътя, а четвърта е при малък брой пациенти, при която не е установен специфичен механизъм.<sup>2-4</sup>

*Подгрупа с абнормна активация на ABL-пътя.* ABL1- и ABL2-гените кодират вътреклетъчни кинази със сходна структура и отношение към клетъчна пролиферация и

оцеляване. Абнормната ABL-активация при Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна ОЛЛ може да се дължи на различни молекулярни преустройства: фузии на ABL1- или ABL2-гени или пренареждания на миелоидни повърхностни рецептори, като PDGFRB и CSF1R (Табл. 1).<sup>5,6</sup>

*Подгрупа с генетични аберации на CRLF2- и JAK-STAT-пътя.* Мутации в JAK2-гена предизвикват конститутивно активиране на JAK-STAT-сигналния път и водят до повишен цитокин-независим растеж на В-клетъчни прогенитори. Най-често срещаната мутация замества консервативния аргинин (R683) в псевдокиназия домейн на JAK2 и е специфична за ОЛЛ. CRLF2-рецепторът е ангажиран при ОЛЛ с активиран JAK-STAT-път. От друга страна, CRLF2 хетеродимеризира с IL7Rα (IL7R) и създава рецептор за тимусен стромален лимфопоетин (TSLP), който нормално се експресира в някои дендритни и Т-клетки и предава сигнали чрез ензимите JAK2 и JAK1. Абнормна свръхекспресия при В-ОЛЛ настъпва в резултат на пренареждания, които или сливат конститутивно експресирания промотор на P2RY8, или прехвърлят CRLF2-гена до IGH-локуса, който е активен в В-клетките. В значителна част от ОЛЛ със свръхекспресия на CRLF2 се идентифицира и друга мутация, като мутация в JAK2 или JAK1, активиращи мутации в CRLF2 или IL7R, или инактивиращи мутации в SH2B3-ген, кодиращ JAK-инхибитора LNK (Табл. 2).<sup>7</sup>

*Подгрупа с активация на RAS-сигналния път.* Понякога RAS-мутациите могат да заместят JAK2-мутациите в CRLF2(+) левкемии. Установени са различни алтерации на RAS-сигналния път (KRAS, PTPN11, NF1, NRAS, CBL и др.). Един от таргетите на преустройство е BLNK-адапторен протеин, който предава сигнали от В-клетъчния рецептор и активира RAS-сигналния път посредством ERK. Друг RAS-активиращ механизъм

е фузията *KANK1-CBL*, в която участва *CBL*, който е негативен регулатор на пътища на сигнална трансдукция, в това число *RAS*. Фузията с *KANK1* инактивира *CBL*, в резултат на което настъпва хиперактивация на *RAS*.<sup>7,8</sup>

*Висока честота на IKZF1 делеции или мутации без да дефинира подгрупа.* Съобщава се за висока честота (35-46%) на инактивиращи аберации на транскрипционен фактор *IKZF1* (IKAROS Family Zinc Finger 1) в категория на *Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом*, без да са достатъчно специфични за нея, за да бъдат включени като компонент на дефиниция.<sup>9,10</sup> Установено е, че биологичният ефект на делецията на *IKAROS* в В-клетки е синергичен с активиране на пътя на *IL7R-JAK-STAT*.<sup>11</sup> Предполага се, че *IKAROS* подтиска експресията на *CRLF2* и делецията може да доведе до свръхекспресия на *CRLF2*.<sup>12</sup> Разбирането на ефектите от нарушена функция на гена при ОЛЛ и потенциалните възможности за възстановяване на експресията на транскрипционния фактор *IKZF1* може в крайна сметка да има съществени терапевтични последици.<sup>13</sup>

Подтип *Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом* е сравнително често срещан – при 10-25% от пациентите с ОЛЛ. Честотата е най-ниска при деца с ОЛЛ със стандартен риск според Националния раков институт (National Cancer Institute, NCI) и постепенно нараства при деца с висок риск, юноши и възрастни. Деца със синдром на *Down* показват много висока честота на В-ОЛЛ с *CRLF2*-транслокации. Честотата на някои геномни лезии варира според етническата принадлежност. Като цяло, категорията е по-честа както при възрастни, така и при деца с испански етнически произход, като достига до 78% от случаите с *CRLF2*-аберации.<sup>14,15</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Категорията е идентифицирана за първи път чрез генно-експресионно профилиране, използвайки Affymetrix U133 plus 2.0 GeneChips и йерархичен клъстер-анализ<sup>2</sup> и е характеризирана чрез секвениране от ново поколение (NGS), в това число transcriptome, whole-genome и whole-exome секвениране<sup>4</sup>. Засега няма достъпни рутинни диагностични техники за идентифициране на *Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом*, поради което различни автори предлагат по-практичен, стъпаловиден скринингов подход. Първо, не всички пациенти с ОЛЛ следва да бъдат изследвани за абнормно активиране на кинази и други асоциирани аберации. Наличието на доминиращи левкемогенни хромозомни транслокации, като *Rh/BCR-ABL*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* и *MLL*-пренареждания, на практика изключва необходимост от по-нататъшна оценка. Ето защо скринингът трябва да се съсредоточи върху „Другите“ В-клетъчни ОЛЛ, които реагират лошо на първоначална терапия.<sup>4,5</sup> Случаи с повишена експресия на *CRLF2*, причинена от геномни пренареждания, могат да бъдат диагностицирани чрез флоуцитометрия и/или FISH или PCR.<sup>16-18</sup> Липсата на международно приет диагностичен стандарт изключва използване на скрининг на *CRLF2*-генна експресия в рутинната диагностика, но е съществен компонент в клинични проучвания за потенциална терапевтична роля на JAK-инхибитори. Основни транслокации, участващи в абнормно активиране на ABL, особено тези, за които се съобщава, че отговарят на тирозинкиназни инхибитори (ТКИи), могат да бъдат идентифицирани чрез специфично конструирани FISH-сонди, мултиплексна RT-PCR или таргетно РНК-секвениране с използване на ограничени панели от NGS.<sup>19,20</sup> Използва се и РНК-секвениране (напр. Archer Fusion-Plex Oncology Research Kit, Archer DX, Boulder, CO, Foundation One Heme, Foundation Medicine, Cambridge, MA35).<sup>7</sup> Дигитална молекулярна баркод-платформа NanoString (NanoString, Seattle, WA) позволява мултиплексен анализ на 200 раз-

лични генетични изменения. Анализът е относително опростен и изисква малко материал, но позволява идентифициране само на известни фузии.<sup>21</sup> За цялостна и навременна идентификация на пациенти с *Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом* са необходими технологии за NGS.

**Доказателства за предиктивно значение.** Независимо от възрастта, категорията е свързана с кратка преживяемост и персистирание на минимална резидуална болест (МРБ). Данни от различни проучвания показват, че пациенти, постигнали негативизиране на МРБ със стандартни терапевтични режими, нямат по-неблагоприятна прогноза в сравнение с другите пациенти с ОЛЛ.<sup>14, 22</sup> Като цяло, подходите за подобряване на терапевтичните резултати могат да бъдат обсъждани както при първоначално индукционно лечение, така и при лечение на рецидиви. В случай, че е възможна бърза и надеждна предварителна идентификация на определени аберации, различни киназни инхибитори биха могли да бъдат комбинирани със стандартна химиотерапия или с химиотерапия с редуцирани дози. Друг подход би бил фокусиране на усилия за иден-

тифициране на потенциални таргетни лезии само върху онези пациенти, при които отговорът е незадоволителен на цитологично и молекулярно ниво, както и при пациенти с рецидиви.<sup>22</sup> Аберации, свързани с активация на ABL-пътя, са потенциални таргети за терапевтично повлияване с ТКИи. Понастоящем са инициирани фаза III клинични изпитвания при новодиагностицирана В-ОЛЛ с висок риск и мутации на комбинация от химиотерапия с *dasatinib* при деца (NSC # 732517), подрастващи и млади (NCT02883049) и възрастни пациенти (NCT02420717) (Табл. 3). Свърхекспресия на *CRLF2* е свързана с мутации, които представляват таргети на JAK- и mTOR-инхибитори. Резултати от тези предклинични проучвания дават основание да се очаква, че комбинирано PI3K/mTOR-инхибиране може да увеличи ефективността на директно инхибиране на *JAK2*, както и прилагане на хистон-деацетилаза инхибитор.<sup>23-26</sup> Понастоящем в MD Anderson Cancer Center са стартирани фаза III клинични изпитвания на комбинация на химиотерапия с JAK1/JAK2-инхибитор (*ruxolitinib*) както при възрастни (NCT02420717), така и при деца (NCT02723994).

**В**

- Препоръчва се *Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом* да бъде разпознавана като специфична подкатегория на остра лимфобластна левкемия, която носи висок риск за рецидив със стандартна терапия.
- Препоръчва се резистентните към първоначална терапия пациенти с остри прекурсорни В-лимфобластни левкемии, при които не е идентифицирана нито една от обичайните транслокации (*Ph'/BCR-ABL, ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1* и *MLL*) с помощта на конвенционални генетични техники, да се изследват за наличието на *Rh-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом*.

C

- Препоръчва се или стъпаловиден скринингов алгоритъм за идентифициране на *Ph-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом*, който включва (i) изследване за повишена експресия на *CRLF2* чрез флуориметрия и/или FISH или PCR; (ii) изследване за транслокации, участващи в абнормно активиране на *ABL* чрез специфично конструирани FISH сонди, мултиплексна RT-PCR или таргетно РНК-секвениране, или дигитална молекулярна баркод-платформа.
- При установяване на мутации в гени от *ABL*-киназно семейство се препоръчва обсъждане за комбиниране на химиотерапия с тирозинкиназен инхибитор (*dasatinib*).
- При установяване на мутации, водещи до активиране на *JAK-STAT*-пътя, и/или високо ниво на експресия на *CRFL2* се препоръчва обсъждане на лечение с *JAK1/JAK2*-инхибитори (*ruxolitinib*).
- Препоръчва се включване на пациенти с *Ph-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом* в клинични проучвания.



- Към момента липсва общоприето становище за методологичен подход за идентифициране на “*Ph-подобна/BCR-ABL1-подобна остра лимфобластна левкемия/лимфом*”.
- Липсата на международно приет диагностичен стандарт на този етап изключва използване на скрининг за *CRLF2*-гена експресия в рутинната диагностика, но е съществен компонент в клинични проучвания за потенциална терапевтична роля на *JAK*-инхибитори.

Таблица 1. Генни пренареждания с абнормна активация на *ABL*-пътя (адаптирана от *Ofran et al., 2017*).<sup>5</sup>

Партниращи гени		Кариотип	Проучвания за ефективност на тирозинкиназни инхибитори
ETV6	ABL1	t(12;9)(p13;q34)	Ксенографт

NUP214	ABL1	del(9;9)(q34)	<i>In vitro</i> , клинични случаи
RCS1	ABL1, ABL2	t(1;9)(q24;q34)	Клинични случаи
SNX2	ABL1	t(5;9)(q23;q34)	Резистентност към ТКИ
EBF1	PDGFB	del5(q33q33)	<i>In vitro</i> , клинични случаи
SSBP2	CSF1R	Фузия на SSBP2 в 5q14 - CSF1R в 5q33	Ксенографт
ATF7IP	PDGFRB	t(5;12)(q33;p13)	<i>In vitro</i> , клинични случаи
NCOR1	LYN	ND	ND

Таблица 2. Транслокации в подгрупа със засягане на JAK-STA-пътя (адаптирана от Ofran et al., 2017).<sup>5</sup>

Партниращи гени		Кариотип	Проучвания за ефективност на тирозинкиназни инхибитори
P2RY8	CRLF2	P2RY8 (Xp22.33)/CRLF2 (Xp22.33)	<i>In vitro</i> , ксенографт
IgH	CRLF2	t(14;X)(q32;p22) или t(14;Y)(q32;p11)	<i>In vitro</i> , ксенографт
IgH	EPOR	t(14;19)(q32;p13.1)	<i>In vitro</i> , ксенографт
PAX5	JAK2	Къса делеция на 9p13.2	<i>In vitro</i>

Таблица 3. Потенциални терапевтични опции (адаптирана по Herold et al., 2017, и Roberts et al., 2017).

Категория	Фузионен ген	Партниращ ген	Потенциална терапевтична опция
ABL	ABL1	ETV6, NUP214, RCSD1, RANBP2, SNX2, SFPQ, ZMIZ1, PAG1, ZC3HAV1	<i>Dasatinib</i>
	ABL2	PAG1, RCSD1, ZC3HAV1	<i>Dasatinib</i>
	CSF1R	MEF2D, SSBP2	<i>Dasatinib</i>
	PDGFRA	FIP1L1	<i>Dasatinib</i>
	PDGFRB	ATF7IP, EBF1, SNX29, SSBP2, TNIP1, ZEB2	<i>Dasatinib</i>
	LYN	NCOR1	<i>Dasatinib</i>
JAK-STAT	CRLF2	IGH, P2RY8	<i>Ruxolitinib</i> , mTOR-инхибитори <i>Givinostat</i> – хистон-деацетилаза инхибитор
	JAK2	ATF7IP, BCR, EBF1, ETV6, OFD1, PAX5, PPF1B1, SSBP2, SMU1, STRN3, TERF2, TPR, ZNF340	<i>Ruxolitinib</i>
	EPOR	IGH, IGK, THADA	<i>Ruxolitinib</i>
	IL2RB	MYH9	JAK1/JAK3-инхибитор
	TSLP	IQGAP2	<i>Ruxolitinib</i>
Други кинази	NTRK3	ETV6	NTRK инхибитор, <i>Crizotinib</i>
	FLT3	ZMYM2	FLT3-инхибитор
	PTK2B	KDM6A, TMEM2, STAG2	FAK-инхибитор



## ЛИТЕРАТУРА

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391-2405
- Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009; 10 (2):1 25-134
- Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012; 22 (2): 153-166
- Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2014; 371 (11): 1005-1015
- Ofran Y Israeli S. BCR-ABL (Ph)-like acute leukemia-Pathogenesis, diagnosis and therapeutic options. *Blood Rev* 2017; 31 (2): 11-16
- Yano M, Imamura T, Asai D, et al. Identification of novel kinase fusion transcripts in paediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukaemia with IKZF1 deletion. *Br J Haematol* 2015; 171 (5): 813-817
- Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, et al. High frequency and poor outcome of philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in adults. *J Clin Oncol* 2017; 35 (4): 394-401
- Imamura Y, Oda A, Katahira T, et al. BLNK binds active H-Ras to promote B cell receptor-mediated capping and ERK activation. *J Biol Chem* 2009; 284 (15): 9804-9813
- van der Veer A, Waanders E, Pieters R, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood* 2013; 122 (15): 2622-2629
- Boer JM, Koenders JE, van der Holt B, et al. Expression profiling of adult acute lymphoblastic leukemia identifies a BCR-ABL1-like subgroup characterized by high non-response and relapse rates. *Haematologica* 2015; 100 (7): e261-264
- Heizmann B, Kastner P, Chan S. Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals. *J Exp Med* 2013; 210 (13): 2823-2832
- Ge Z, Gu Y, Zhao G, et al. High CRLF2 expression associates with IKZF1 dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia without CRLF2 rearrangement. *Oncotarget* 2016; 7 (31): 49722-49732
- Witkowski MT, Hu Y, Roberts KG, et al. Conserved IKAROS-regulated genes associated with B-progenitor acute lymphoblastic leukemia outcome. *J Exp Med* 2017; 214 (3): 773-791
- Jain N, Roberts KG, Jabbour E, et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood* 2017; 129 (5): 572-581
- Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010; 115 (26): 5312-5321
- Konoplev S, Lu X, Konopleva M, et al. CRLF2-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia in adult patients: A single-institution experience. *Am J Clin Pathol* 2017; 147 (4): 357-363
- Bugarin C, Sarno J, Palmi C, et al. Fine tuning of surface CRLF2 expression and its associated signaling profile in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2015; 100 (6): e229-232
- Robin AJ, Peterson JF, Grignon JW Jr, et al. Identification of high-risk cryptic CRLF2 rearrangements in B-cell acute lymphoblastic leukemia utilizing an FGFR3/IGH dual-color dual-fusion DNA probe set. *J Pediatr Hematol Oncol* 2017; 39 (4): e207-e210
- Fasan A, Kern W, Nadarajah N, et al. Three steps to the diagnosis of adult ph-like ALL. *Blood* 2015; 126: 2610
- Herold T, Gökbuget N. Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia in adults. *Curr Oncol Rep* 2017; 19 (5): 31
- He J, Abdel-Wahab O, Nahas MK, et al. Integrated genomic DNA/RNA profiling of hematologic malignancies in the clinical setting. *Blood* 2016; 127 (24): 3004-3014

22. Herold T, Schneider S, Metzeler KH, et al. Adults with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica* 2017; 102 (1): 130-138
23. Tasian SK, Doral MY, Borowitz MJ, et al. Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120: 833-842
24. Maude SL, Tasian SK, Vincent T, et al. Targeting JAK1/2 and mTOR in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120: 3510-3518
25. Shi C, Han L, Zhang Q, et al. Combined targeting of JAK2 with a type II JAK2 inhibitor and mTOR with a TOR kinase inhibitor constitutes synthetic activity in JAK2-driven Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 126: 2529a
26. Tasian SK, Li Y, Shen F, et al. Potent efficacy of combined PI3K/mTOR and JAK or SRC/ABL inhibition in Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 126: 798a

#### 1.2.4. ЕТР-имунофенотип

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** Ранната Т-прекурсорна остра лимфобластна левкемия (Early T-cell precursor, ЕТР) е наскоро описана подгрупа, съставена от неопластични клетки от Т-клетъчна линия на диференциация. Включена е като провизорна нозологична единица в редактираната Четвърта версия на класификацията на Световната здравна организация на хемопоетични и лимфоидни неоплазии от 2016 г.<sup>1</sup> Ранната Т-прекурсорна остра лимфобластна левкемия (РТП-ОЛЛ) се отличава с определена антигенна констелация, генно-експресионен профил и мутационен спектър. Специфичният имунофенотип се дефинира с липса на CD8 и CD1a, липсваща или ниска експресия на CD5 в < 75% от бластните клетки, положително маркиране за един или повече миелоидни и/или стволовоклетъчни маркери – CD34, CD117, HLA DR, CD13, CD33, CD11b или CD65 в > 25% от бластната популация. Левкемичните клетки обикновено експресират също така и цитоплазмен CD3, CD2, CD7 или CD4, но тези маркери не са част от дефиницията. Миелопероксидазата е отрицателна. Налице са и случаи с по-ярка или равномерна експресия на CD5, които се определят като *близки до ЕТР*.<sup>2</sup> Генно-експресионният профил на РТП-ОЛЛ е тясно свързан с профила на т.нар. ЕТР (ранни Т-клетъчни прекурсори) – подгрупа от тимоцити, които представляват последни “емигранти” от костен мозък в тимус и са запазили мултилинеен потенциал за диференциация (Т- и NK-клетъчен/дендритоклетъчен/миелоиден), на базата на което се предполага директен произход на левкемията от хемопоетични стволови клетки, различен от този на Т-ОЛЛ, съответстващи на по-късни етапи на Т-клетъчно съзряване. Свърхекспресирани са както гени, типично свързани с миелоиден или стволовоклетъчен генно-експресио-

нен профил (например *CD44*, *CD34*, *KIT*, *GATA2*, *CEBPA* и др.), така и гени на онкогенни транскрипционни фактори, част от които участват в патогенезата на Т-ОЛЛ (*LMO1*, *LYL1* и *ERG*).<sup>2-6</sup> Трета характеристика на РТП-ОЛЛ е мутационният спектър, подобен на този при миелоидни неоплазии: активиране на мутации в гени, регулиращи цитокинови рецептори и RAS-пътя на сигнална трансдукция (*HPO*, *KRAS*, *FLT3*, *IL7R*, *JAK3*, *JAK1*, *SH2B3* и *BRAF*), инактивиращи лезии, водещи до нарушаване на хемопоетичното развитие (*GATA3*, *ETV6*, *RUNX1*, *IKZF1* и *EP300*) или в хистон-модифициращи гени (*EZH2*, *EED*, *SUZ12*, *SETD2* и *EP300*), както и в други гени като *DNMT3A*, *DNM2*, *ECT2L* и *RELN*. Липсват *NOTCH1*- и *CDKN1/2*-мутации. Клонални пренареждания на *TCR*-гените се наблюдават с много ниска честота.<sup>7</sup> Първоначално РТП-ОЛЛ е описана при деца, но се среща във всички възрасти, съставлявайки около 10-13% от случаите на Т-ОЛЛ в детска възраст и около 5-10% при възрастни.

**Аналитични методи за изследване.** Съществуват четири потенциални метода за класифициране на ранната/недиференцирана Т-клетъчна остра лимфобластна левкемия: (i) установяване на клъстер с незрял експресионен профил; (ii) установяване на експресионен профил на РТП-ОЛЛ чрез ПАМ (prediction analysis of microarrays); (iii) установяване на имунофенотип на РТП-ОЛЛ; (iv) установяване на липса на билалелна TCRgamma-делеция (ABD). Съществува отлично припокриване на клъстера с незрял експресионен профил и РТП-ОЛЛ, дефинирани чрез генно-експресионен профил на ЕТР, за разлика от случаи с РТП-ОЛЛ, които са дефинирани чрез имунофенотип. Използването на CD5 съществено намалява чувствителността и специфичността на фенотипизацията. Ако се изключат т.нар. *близки до ЕТР* случаи, фенотипно дефинираните случаи най-точно и пълно се припокриват с експресионния РТП-ОЛЛ-профил. Класифицирането въз основа на ABD само частично се припокрива с всяка една от

категориите.<sup>8, 9</sup> Имунофенотипизацията се осъществява чрез многоцветна флоуцитометрия; технологията е рутинна, широко достъпна и стандартизирана в значителна степен. Необходимо е стриктно прилагане на утвърдените критерии за линейна принадлежност и оценка на потенциално смесени фенотипи, както и за дефиниране на РТП-ОЛЛ. Подходът дава потенциална възможност за погрешно класифициране както в посока на остра левкемия със смесен линейен миелоиден/Т-клетъчен фенотип, така и към ОМЛ с аберантна коекспресия на Т-клетъчни маркери. От друга страна, микрочип-технологиите за оценка на генно-експресионни профили не са рутинно достъпни. Остава все още отворен въпросът за валидиране на рутинно приложим подход и възпроизводим маркер за идентифициране на РТП-ОЛЛ към момента на диагноза. Категорията остава “условна” в класификационната схема.

**Доказателства за предиктивно значение.** Първоначално РТП-ОЛЛ е описана като левкемия с много висок риск и незадоволителни терапевтични резултати.<sup>2, 10, 11</sup> Впоследствие по-големи серии при деца и възрастни, при които са използвани интензивни протоколи (напр. COALL-97, VFM), включително алогенна трансплантация на хемопетични стволови клетки, не показват статистически значимо по-различен клиничен

изход.<sup>9, 12-17</sup> Крайният резултат е един и същ, независимо от разлика в кинетиката на терапевтичния отговор спрямо останалите Т-клетъчни ОЛЛ: по-лош ранен отговор към терапия и индукционен неуспех, ранни рецииви, наличие на категория с ЕТР или с незрял фенотип, отличаващи се с невъзможност за постигане на ремисия, или с изключителна резистентност на рецидиви.<sup>9</sup> Фактът, че около 60% от пациентите с РТП-ОЛЛ носят мутации, които потенциално биха могли да бъдат третирани със специфична таргетна терапия, поставя на дневен ред проучвания на иновативни терапевтични технологии. Налице са *in vitro* проучвания на тирозинкиназни инхибитори, приложени върху клетъчни линии от Т-ОЛЛ, трансфектирани с FLT3-експресионни конструкти, резултатите от които дават основания за провеждане на клинични проучвания с прилагане на FLT3-инхибитори в допълнение към алогенна трансплантация на хемопетични стволови клетки.<sup>15</sup> По правило РТП-ОЛЛ се характеризира с необичайно активиране на JAK/STAT-сигналния път и JAK1/2-инхибиторът *ruxolitinib* показва силна активност в ксенографтни модели на РТП-ОЛЛ, получени от пациенти.<sup>18</sup> Данните за зависимост на РТП-ОЛЛ от Bcl-2 дават основание за приложение на BCL2-инхибитори (напр. АВТ-199) като потенциална терапевтична стратегия при определени категории пациенти.<sup>19</sup>


А

При всички пациенти с остра лимфобластна левкемия се препоръчва интегриран диагностичен подход, включващ морфология на периферна кръв и костен мозък, имунофенотипизация и провеждане на генетични изследвания за оценка на риска.

В

- Препоръчва се *ранна Т-прекурсорна остра лимфобластна левкемия* да бъде разпознавана като специфична подкатегория на остра лимфобластна левкемия.
- За идентифициране на *ранна Т-прекурсорна остра лимфобластна левкемия* се препоръчва многопараметърна флоуцитометрия.

<b>В</b>	<p>■ При идентифициране на <i>ранна T-прекурсорна остра лимфобластна левкемия</i> се препоръчва обсъждане на интензивни химиотерапевтични протоколи (COALL-97, BFM), включително алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.</p>
<b>С</b>	<p>Препоръчва се включване на пациенти с <i>ранна T-прекурсорна остра лимфобластна левкемия</i> в клинични проучвания.</p>

	<p>■ <i>Диагностиката на остри лимфобластни левкемии следва да се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за комуникация между звената, осъществяващи морфологична, имунофенотипна и генетична/молекулярна оценка на клиничен материал (в съпоставка с основни клинични данни) и годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести през всяко едно от обособените лабораторни направления.</i></p> <p>■ <i>Имунофенотипизацията на остри левкемии се провежда с <math>\geq 4</math>-цветна многопараметърна флоуцитометрия и достатъчно широк панел, който да позволява идентифициране на определените в класификацията на Световната здравна организация (4-та ревизирана версия, 2016) нозологични единици, вкл. “ранна T-прекурсорна остра лимфобластна левкемия”.</i></p>
---	--

## ЛИТЕРАТУРА

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391-2405
- Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009; 10: 147-156
- Ferrando AA, Neuberger DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2002; 1: 75-87
- Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 9-21
- Tremblay CS, Hoang T, Hoang T. Early T cell differentiation lessons from T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 92: 121-156
- Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 2008; 452: 764-767
- Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2012; 481 (7380): 157-163
- Zuurbier L, Gutierrez A, Mullighan CG, et al. Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged T-cell receptors. *Haematologica* 2014; 99: 94-102

9. Bernt KM, Hunger SP, Neff T. The functional role of PRC2 in early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (ETP-ALL) – mechanisms and opportunities. *Front Pediatr* 2016; 4: 49
10. Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, et al. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Br J Haematol* 2012; 156: 358-365
11. Ma M, Wang X, Tang J, et al. Early T-cell precursor leukemia: a subtype of high risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Front Med* 2012; 6: 416-420
12. Patrick K, Wade R, Goulden N, et al. Outcome for children and young people with early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol* 2014; 166: 421-424
13. Guo RJ, Bahmanyar M, Minden MD, Chang H. CD33, not early precursor T-cell phenotype, is associated with adverse outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2016; 172: 823-825
14. Zuurbier L, Gutierrez A, Mullighan CG, et al. Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged T-cell receptors. *Haematologica* 2014; 99 (1): 94-102
15. Neumann M, Heesch S, Gökbuget N, et al. Clinical and molecular characterization of early T-cell precursor leukemia: a high-risk subgroup in adult T-ALL with a high frequency of FLT3 mutations. *Blood Cancer J* 2012; 2 (1): e55
16. Conter V, Valsecchi MG, Buldini B, et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia in children treated in AIEOP centres with AIEOP-BFM protocols: a retrospective analysis. *Lancet Haematol* 2016; 3( 2): e80-86
17. Jain N, Lamb AV, O'Brien S, et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: a high-risk subtype. *Blood* 2016; 127 (15): 1863-1869
18. Maude SL, Dolai S, Delgado-Martin C, et al. Efficacy of JAK/STAT pathway inhibition in murine xenograft models of early T-cell precursor (ETP) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125 (11): 1759-1767
19. Kawashima-Goto S, Imamura T, Tomoyasu C, et al. BCL2 Inhibitor (ABT-737): A restorer of prednisolone sensitivity in early T-cell precursor-acute lymphoblastic leukemia with high MEF2C expression? *PLoS ONE* 2015; 10 (7): e0132926



## 2 Предиктивни биомаркери при миелопролиферативни неоплазии





## 2.1. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ХРОНИЧНА МИЕЛОИДНА ЛЕВКЕМИЯ

### 2.1.1. BCR-ABL-фузионен ген

*Георги Балаценко, Маргарита Генова*

**Молекулярна биология.** Появата на хронична миелоидна левкемия (ХМЛ) е свързана с формирането на Филадельфийска хромозома (Ph) и предизвиканите от нея нарушения ключови за клетъчната биология процеси. По правило Ph-хромозома е една от двойката дериватни хромозоми (22q-), образувани при транслокация t(9;22)(q34;q11). На молекулярно ниво при обмяна на генетичен материал се сливат области от протоонкогена на *Abelson (ABL1)* [9q34] и гена breakpoint cluster region (*BCR*) [22q11], в резултат на което се образува фузионен ген *BCR-ABL1*, водещ до синтез на химерен онкопротеин Bcr-Abl с ключово значение за патогенеза на болестта. При ХМЛ счупването в *ABL1*-гена почти винаги е разположено в началната част на гена, най-често в 1-ви интрон и рядко във 2-ри. За разлика от него, счупванията в *BCR*-гена са хетерогенни, като при ХМЛ счупването най-често е разположено в средната част на гена – в област, означавана като *Major (M)-bcr*, обхващаща екзони e12-e16 (означавани и като b1-b5). Прекъсванията в тази област водят до формиране на фузионен ген *M BCR-ABL1*, който се транскрибира в b3a2 и/или b2a2 РНК (транскрипти) и води да синтез на хибридни протеини

с молекулно тегло 210 KD (P210<sup>BCR-ABL</sup>).<sup>1</sup> В около 2-4.5% от пациентите се срещат други атипични форми на *BCR-ABL1*-фузионни транскрипти<sup>2</sup>, от които по-чести са варианти, при които счупването е разположено в началото на *BCR*-гена (1-ви интрон) – в област, означавана като *minor (m)-bcr*, в която образуваният *mBCR-ABL*-ген се транскрибира в e1a2-РНК и се синтезира химерен протеин с молекулно тегло 190 KD (P190<sup>BCR-ABL</sup>). Тази форма се среща по правило при Ph(+) остри левкемии, докато при ХМЛ се доказва в около 1% от случаите.<sup>3</sup> Мисро ( $\mu$ )-*bcr*-областта е локализирана в края на *BCR*-гена и обхваща участък между екзони e19 и e20. Образуваният  $\mu$ *BCR-ABL*-ген води до синтез на e19a2-транскрипти и онкопротеин с молекулно тегло 230 KD (P230<sup>bcr-abl</sup>), който се среща при клиничен вариант на ХМЛ, характеризиращ се с усилена продукция на зрели неутрофили или с повишена пролиферация на мегакариоцити.<sup>4</sup> За разлика от нормалния P145<sup>abl</sup> протеин, онкопротеинът P210<sup>bcr-abl</sup> се характеризира с постоянно повишена тирозинкиназна активност, с променена клетъчна локализация, както и със способност да взаимодейства с многобройни протеини, включително и с нехарактерни такива. Благодарение на тези си свойства P210<sup>bcr-abl</sup> чрез директно фиксиране на медиатори към специфични домейни или чрез образуване на многокомпонентни комплекси с участие на “адапторни” молекули предизвиква постоянно и нерегулируемо активиране на множество различни сигнални пътища, което води до неконтролируема пролиферация на цитокин-зависими хемопоеични клетки (при намалена концентрация или отсъствие на цитокини), нарушена клетъчна адхезия към костномозъчната строма и към компонентите на екстрацелуларния матрикс, инхибиране на апоптозата, а в напреднали стадии – до блокиране на клетъчната матурация.<sup>5</sup>

**Аналитични методи за изследване.** При почти всички пациенти, лекувани с тирозинкиназни инхибитори (ТКИи), се постига пълен хематологичен отговор, а при значи-

телна част от тях – и пълен цитогенетичен отговор. При отсъствие на Ph-хромозома молекулярните методи са единствени подход за откриване и количествено характеризиране на нивото на минималната резидуална болест, поради което молекулярният мониторинг има ключова роля в терапевтичното моделиране на отделни пациенти. Понастоящем за оценка на молекулярния отговор се препоръчва количествена полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR) с използване на Taqman-сонди, с чувствителност, позволяваща доказване на нива на  $BCR-ABL1 \leq 0.0032\%$ . Приложение намират два основни подхода: (i) стандартизирана мануална техника с готови, комерсиално разработени диагностични китове, най-често базиращи се на стандартизиран протокол, разработен от програма Europe Against Cancer<sup>11,12</sup>; (ii) автоматизиран подход с използване на Cepheid xpert monitor platform<sup>10</sup>. Като контролни нормални транскрипти се препоръчва използване на *ABL1*, *BCR*, *GUSB* или друг международно признат ген.<sup>12</sup> Оценката на нивото на фузионни транскрипти се провежда върху ядроносни клетки, изолирани от периферна кръв, а резултати се съобщават след умножаване на получената  $BCR-ABL1/ABL1$ -стойност с локален фактор на конверсия според международна скала (IS), позволяваща сравнимост на резултати, получени в различни лаборатории.<sup>13</sup> Най-общо, IS се дефинира като намаление на  $BCR-ABL1$ -транскрипти спрямо стандартизирано базисно ниво от 100%, изчислено въз основа на средно ниво на  $BCR-ABL1$ , определено в 30 проби, взети преди започване на лечение в проучване IRIS. Освен като процент, молекулярният отговор може да бъде представен и като логове на редукция, където 1 лог е десеткратно намаление в нивото на  $BCR-ABL1$ , 2 лог – стократно намаление и т.н. Основните дефиниции на молекулярния отговор (МО) включват: (i) голям МО – ниво на  $BCR-ABL1/ABL1 \leq 0.1\%$ ; (ii) дълбок МО – ниво на  $BCR-ABL1/ABL1 \leq 0.01\%$  с три различни нива на дълбок МО, като не се прави раз-

лика дали се установяват, или не се установяват резидуални  $BCR-ABL1$ -транскрипти: (a) МО 4.0 лог – RT-PCR(+) с  $BCR-ABL1/ABL1 < 0.01\%$  или RT-PCR(-) при наличие на  $> 10\,000$   $ABL1$ -транскрипта; (b) МО 4.5 лог – RT-PCR(+) с  $BCR-ABL1/ABL1 < 0.0032\%$  или RT-PCR(-) при наличие на  $> 32\,000$   $ABL1$ -транскрипта; (c) МО 5.0 лог – RT-PCR(+) с  $BCR-ABL1/ABL1 < 0.001\%$  или RT-PCR(-) при наличие на  $> 100\,000$   $ABL1$ -транскрипта.<sup>14</sup> В началото молекулярният мониторинг следва да се провежда през три месеца до постигане на голям МО ( $BCR-ABL1/ABL1 \leq 0.1\%$ ), след което – през 3-6 месеца. Един от най-важните прогностични фактори е оценка на т.нар. ранен МО – ниво на  $BCR-ABL1$  на 3-и и 6-и месец от начало на терапията, където установените нива корелират с всички прогностични индекси: вероятност за постигане на голям МО, дълбок МО, преживяемост без прогресия (ПБП), приживяемост без трансформация (ПБТ) и обща преживяемост(ОП).<sup>9,15</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Основен подход при лечение на ХМЛ е инхибитори на повишена тирозинкиназна активност; по този начин се цели специфично прекъсване на основния патогенетичен механизъм на болестта. За рутинна употреба са одобрени пет тирозинкиназни инхибитора (ТКИи) – *imatinib*, *dasatinib*, *nilotinib*, *bosutinib* и *ponatinib*.<sup>6</sup> Този подход е изключително ефективен и понастоящем десетгодишната ОП при ХМЛ е над 80%.<sup>7,8</sup> За да се реализира целта на лечението, изключително е важно да се отграничат своевременно пациенти със субоптимален отговор, при които ранната промяна на използвания ТКИ би позволила по-добра прогноза. Цел на изследванията в хода на лечение е да се оцени степен на редукция на левкемичните клетки, като се търсят прояви на резистентност или прогресия, за да се идентифицират пациенти, нуждаещи се от допълнително изследване, по-стриктно проследяване или превключване към втора линия терапия. Според степента на намаляване на броя

на левкемични клетки (левкемичен обем) се разграничават три нива на отговор: (1) хематологичен отговор – включва нормализиране на кръвните показатели и размера на слезката; (2) цитогенетичен отговор – включва оценка на динамика на остатъчни левкемични клетки, носещи Филадельфийска хромозома, спрямо изходното им ниво, вкл. и до пълното им изчезване; основните нива на клинично значим “голям” цитогенетичен отговор включват парциален цитогенетичен отговор с наличие на 1-35% Ph(+) метафази и пълнен цитогенетичен отговор с изчезване на Ph-хромозома; (3) молекулярен отговор (МО) – промени в нивото и относителния дял на фузионните *BCR-ABL1*-транскрипти, представен като съотношение на фузионните към нормални транскрипти.<sup>9</sup> Характеризирането на ниво на *BCR-ABL1*-транскрипти в хода на лечение с ТКИи е най-чувствителен подход за оценка на терапевтична ефективност с доказана прогностична значимост и е с ключово значение за определянето на необходимост от промяна на терапевтичното поведение.<sup>10</sup> Задължително е към момента на диагноза да се определи наличие и вид на фузионни транскрипти, тъй като в около 0.5-5% от случаите се срещат атипични форми на фузионен ген, които могат да бъдат пропуснати при рутинно използвани диагностични китове за проследяване на молекулярен отговор.<sup>9</sup> Съществуват данни, че при атипични *BCR-ABL1*-транскрипти наблюдаваният отговор може да бъде различен от очаквания. Смята се, че бързината на спадане на нивото на фузионни транскрипти спрямо изходното им ниво са по-важна, отколкото абсолютното ниво, измерено в определен изолиран момент от лечението<sup>16</sup>, въпреки че това становище не е общоприето<sup>17</sup>. Най-общо, установяване на постоянно намаляващи и/или персистиращи много ниски нива на *BCR-ABL1*, вкл. и пълното им изчезване, корелира с благоприятна прогноза и дългогодишна преживяемост. Обратното, трайно персистиращи високи нива на *BCR-ABL1* или наново нарастването им след първоначално

постигнат молекулярен отговор се свързва с лекарствена резистентност и прогресия на болестта. Според актуалните препоръки за ниво на минимална резидуална болест в специфични моменти от лечението се препоръчват следните определения: (i) оптимален отговор – постигане на оптимална степен на редукция на *BCR-ABL1/ABL1*, което показва много добра прогноза в дългосрочен план; промяна в използваната терапия не се налага; (ii) неуспех – отсъствие на терапевтичен отговор с невъзможност да се постигне желано ниво на редукция на левкемична популация; показва резистентност и е маркер за неблагоприятна прогноза, поради което е необходима промяна в терапевтичното поведение; (iii) предупреждение – установява се известен отговор към лечение, но той е по-слабо изразен от очаквания, поради което е необходимо по-внимателно мониториране с готовност за промяна на лечението.<sup>9</sup> Понастоящем съществуват известни различия в дефинициите за оптимален отговор в двете основни ръководства за провеждане на молекулярен мониторинг и интерпретация на получените резултати. Съгласно препоръките на European Leukemia Net (ELN), 2013, за оптимален МО се приема ниво на *BCR-ABL1/ABL1*  $\leq 10\%$  на трети месец от начало на лечението, *BCR-ABL1/ABL1*  $\leq 1\%$  на шести месец и *BCR-ABL1/ABL1*  $\leq 0.1\%$  на дванадесети месец или по което и да е време в хода на лечението. Според NCCN 2017 за оптимален МО се приема *BCR-ABL1/ABL1* между 10% и 1% на трети и шести месец, между 1% и 0.1% на дванадесети месец и  $< 0.1\%$  на осемнадесети месец.<sup>9, 15</sup> Постигане на голям МО (*BCR-ABL1/ABL1*  $\leq 0.1\%$ ) корелира със значително по-добра прогноза по отношение на ПБП и ПБС и е една от основните цели при лечение на ХМЛ.<sup>18</sup> Постигане на дълбок МО с неустановими *BCR-ABL1*-транскрипти в случаите, когато е траен ( $> 2$  години), позволява при пациенти, лекувани с ТКИи в продължение на минимум три години без фаза на изострене, бластна криза или прояви на резистентност, да се направи опит

за спиране на лечението при стриктен ежемесечен молекулярен контрол на ниво на фузионни транскрипти.<sup>15</sup> Около 50% от пациентите запазват постигнатия молекулярен статус, независимо от отсъствие на активно лечение; при останалите се наблюдава мо-

лекулярен рецидив, налагащ възобновяване на терапия с ТКИи. Най-висока честота на рецидиви се наблюдава през първите шест месеца, но прогресия към бластна криза е изключително рядка (0.8%).<sup>19</sup>

**A**

- При хронична миелоидна левкемия в момента на диагноза се препоръчва задължително определяне на наличие и вид на фузионни *BCR-ABL1*-транскрипти.
- При пациенти с хронична миелоидна левкемия се препоръчва проследяване на ниво на фузионни *BCR-ABL1*-транскрипти през дефинирани времеви интервали с цел определяне на терапевтична ефективност на тирозинкиназни инхибитори (*imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib*) и прогнозиране на хода на болестта.
- Резултати за ниво на фузионни *BCR-ABL1*-транскрипти е препоръчително да се съобщават като процентно съотношение *BCR-ABL1/ABL1* според международната скала IS.
- За детекция на *BCR-ABL1*-транскрипти се препоръчва полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR).



- Изследването на *BCR-ABL1/ABL1* следва да се провежда в дефинирани времеви интервали в хода на лечението с тирозинкиназни инхибитори, тъй като само тогава определеното ниво има доказана прогностична стойност, особено през първата година от началото на лечението.
- Оценката на терапевтичния отговор следва да се извършва в сертифицирана лаборатория.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113 (8): 1619-1630
2. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia* 2015; 29 (6): 1336-1343
3. Arun AK, Senthamizhselvi A, Mani S, et al. Frequency of rare BCR-ABL1 fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Int J Lab Hematol* 2016; 29
4. Melo JV. BCR-ABL gene variants. *Baillieres Clin Haematol* 1997; 10 (2): 203-222
5. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* 2015; 94 (2): S107-121
6. Soverini S, De Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Best Practices in chronic myeloid leukemia

- monitoring and management. *Oncologist* 2016; 21 (5): 626-633
7. Kalmanti L, Sausse S, Lauseker M, et al. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. *Leukemia* 2015; 29 (5): 1123-1132
  8. Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, et al. Treatment recommendations for chronic myeloid leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6 (1): e2014005
  9. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2013; 122 (6): 872-884
  10. Marum JE, Branford S. Current developments in molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* 2016; 7 (5): 237-251
  11. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003; 17 (12): 2318-2357
  12. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 2003; 17 (12): 2474-2486
  13. Müller MC, Cross NC, Erben P, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia* 2009; 23 (11): 1957-1963
  14. Cross NC, White HE, Colomer D, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2015; 29 (5): 999-1003
  15. Radich JP, Deiniger M, Abboud CN, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines): Chronic myelogenous leukemia, v2.2017. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
  16. Breccia M, Molica M, Colafigli G, et al. Early molecular response in chronic myeloid leukemia and halving time: Latest evidences. *Leuk Res* 2016; 48: 20-25
  17. Huet S, Cony-Makhoul P, Heiblig M, et al. Major molecular response achievement in CML Patients can be predicted by BCR-ABL1/ ABL1 or BCR-ABL1/GUS ratio at an earlier time point of follow-up than currently recommended. *PLoS ONE* 2014; 9(9): e106250
  18. Press RD. Major molecular response in CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors: the paradigm for monitoring targeted cancer therapy. *Oncologist* 2010; 15 (7): 744-749
  19. Campiotti L, Suter MB, Guasti L, et al. Imatinib discontinuation in chronic myeloid leukaemia patients with undetectable BCR-ABL transcript level: A systematic review and a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2017; 77: 48-56

### 2.1.2. ABL-точкови мутации

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Използването на тирозинкиназни инхибитори (ТКИи) като нов таргетен подход при лечение на хронична миелоидна левкемия (ХМА) промени изцяло протичането на болестта и неговата прогноза.<sup>1</sup> От друга страна, развитието на резистентност към ТКИи е една от основните причина за непостигане на очакван терапевтичен отговор (първична резистентност) или за загуба на вече постигнат отговор (вторична резистентност). Най-чест механизъм на придобита резистентност е поява на мутации в киназния домейн на *ABL1*-частта на фузионния ген *BCR-ABL1*, установяван в 9-48% от случаите с първична и в 10-68% – с вторична резистентност.<sup>2</sup> Понастоящем са описани над 100 различни мутации.<sup>3</sup> Броят им е относително по-малък при резистентност към първа линия спрямо този към втора, трета и последваща терапия, което вероятно е свързано със селективен натиск върху левкемичната популация при промяна във вида на ТКИи през отделни етапи от лечението.<sup>4</sup> В този смисъл пациенти с доказана мутация в *BCR-ABL1* са с повишен риск от развитие на допълнителни мутации при смяна на терапията. Честотата на мутациите е непосредствено свързана и със стадия на болестта, като мутациите в *BCR-ABL1* се доказват значително по-рядко при пациенти в хронична фаза (25-35%)<sup>5</sup> в сравнение с фаза на изострене или в бластна криза, при които носителството на мутации се доказва до 80%.<sup>6</sup> Смята се, че появата на мутации в киназния домейн на *BCR-ABL1* затруднява свързването на онкопротеина със съответен ТКИ и отслабва частично или напълно неговото действие. С клинична значимост за появата на резистентност са само тези мутации, които повлияват свързването на ТКИ, без обаче да нарушават самата тирозинкиназна активност на онкопро-

теина. При пациенти с резистентност към ТКИ търсенето на *BCR-ABL1*-мутации остава основен подход, който ръководи избора на последваща ТКИ-терапия. Дори наличие на мутации с много ниски нива може да има клинична значимост при прогнозиране на терапевтичен отговор при стартиране на последваща терапия. Установяването на многобройни различни мутации с ниска честота се приема като биомаркер на клонална хетерогенност на болестта с тенденция за развитие на резистентност. Имайки предвид всичко това, търсенето на мутации в киназния домейн е съществен елемент от молекулярния мониторинг и има важно значение при терапевтично моделиране на пациенти с ХМА.<sup>7</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Понстоящем препоръчван метод за скрининг на мутации в *BCR-ABL1*-гена е конвенционално секвениране по *Sanger*.<sup>5</sup> Най-често секвенирането се извършва след амплификация на *BCR-ABL1*-комплементарна ДНК, като се доказват нарушения, когато мутационният товар е не по-малко от 10-20%.<sup>8</sup> При невъзможност за секвениране в рутинната практика редица лаборатории използват алел-специфична полимеразно-верижна реакция (PCR) или PCR с амплификация-рефрактерна мутационна система за търсенето на една или няколко мутации с изразена клинична значимост. Такава е мутация *T315I*, свързана с резистентност към повечето използвани в момента ТКИи, а чувствителността при този подход е значително по-висока от тази при конвенционално секвениране.<sup>9</sup> Редица публикации показват успешно използване на секвениране от ново поколение (NGS) за идентифициране на мутациите в *ABL1*.<sup>10</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Според препоръките на European LeukemiaNet (ELN) мутационен анализ към момента на диагноза следва да се провеж-

да само при пациенти, при които болестта е диагностицирана във фаза на изостряне или в бластна криза. Анализът следва да се провежда в хода на терапия при следните обстоятелства: (1) отсъствие на очакван терапевтичен отговор, (2) при десеткратно нарастване на нивото на *BCR-ABL1*-транскрипти, съпроводено със загуба на голям молекулярен отговор; (3) при загуба на отговор, дефиниран като хематологичен или цитогенетичен рецидив; (4) при всички пациенти с прогресия на болестта и с трансформиране в изострена фаза или бластна криза.<sup>11, 12</sup> Според последната Ревизия на класификацията на миелопролиферативни неоплазии на Световната здравна организация (WHO), 2016, доказването на две или повече мутации в *BCR-ABL1* в хода на лечение с ТКИИ се предлага като условен критерий, дефиниращ изострена фаза на болестта. В рутинната практика не е достатъчно само установяване на наличие на мутации в *BCR-ABL1*, но е необходимо и прецизиране на конкретния им вариант, тъй като клиничната значимост на различни форми варира според вида на използвания ТКИ. В повечето случаи различните мутации обуславят резистентност или понижена чувствителност към конкретен ТКИ, но могат да запазят чувствителност към друг. Поради тази причина конкретната форма на мутацията е от значение при избор на следващ ТКИ след неуспех за постигане на оптимален отговор, независимо дали е съпроводено, или не с клинична прогресия.<sup>11</sup> Пациентите с доказана мутация имат голяма вероятност да развият

допълнителни мутации и следва да бъдат проследявани по-внимателно. По правило наличието на множество мутации е асоциирано с различен профил на резистентност в сравнение с обособени мутации и с по-неблагоприятна прогноза.<sup>14, 15</sup> При пациенти, лекувани с *imatinib*, по-често срещани мутации в киназния домейн включват Q252R/H, F317L/I, M351T/V и E355G/D (обуславят умерена резистентност към препарата), както и мутации G250E, Y253F/H, E255K/V и T315I (обуславят силно изразена резистентност).<sup>17</sup> Като цяло, използваните инхибитори от второ поколение (*nilotinib*, *dasatinib* и *bosutinib*) показват запазена активност по отношение на повечето мутации, водещи до резистентност към *imatinib*, като изборът за втора или последваща линия до голяма степен се определя от конкретния вид на намерените мутации. Например при установяване на мутации Y253H, E255K/V и F359V/C/I се препоръчва използването на *dasatinib*, при F317L/V/I/C, T315A или V299L – *nilotinib*, а при E255K/V, F317L/V/I/C, F359V/C/I, T315A или Y253H – *bosutinib*.<sup>12</sup> С най-изразена клинична значимост е доказване на мутация *T315I*, която е свързана с резистентност както към *Imatinib*, така и към трите ТКИИ от второ поколение; единствен препоръчван препарат при тези пациенти е ТКИ от трето поколение *ponatinib*. Алтернативна възможност при тези пациенти е алогенната трансплантация на хемопоеични стволови клетки.<sup>11, 12</sup>

**В**

- При пациенти с хронична миелогенна левкемия, лекувани с тирозинкиназни инхибитори, се препоръчва изследване за мутации в киназния домейн на *BCR-ABL1* при следните индикации: (1) липса на очакван терапевтичен отговор, (2) загуба на постигнат терапевтичен отговор, (3) нарастване на нивото на *BCR-ABL1*-транскрипти 1 лог, съпроводено със загуба на голям молекулярен отговор, (4) клинична прогресия на болестта на фона на провеждана терапия.
- Като клиничен минимум се препоръчва търсене на *T315I*-мутация с оглед селектиране на пациенти с резистентност към всички тирозинкиназни инхибитори от второ поколение, показани за лечение с трето поколение (*ponatinib*) или за алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.

**В**

- Провеждане на скрининг за *BCR-ABL1*-мутации към момента на диагноза не се препоръчва с изключение на случаи, при които болестта е диагностицирана във фаза на изостряне или бластна криза.
- За изследване на мутации в *BCR-ABL1* се препоръчва секвениране по *Sanger*.



- Мутации в киназния домейн на *BCR-ABL1* са най-честа причина за развитие на резистентност към лечението с тирозинкиназни инхибитори при пациенти с хронична миелоидна левкемия.
- Изборът на тирозинкиназни инхибитори за втора и последваща линии на лечение въз основа на определен мутационен профил позволява постигане на по-добра прогноза в дългосрочен план.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Hehlmann R. CML – Where do we stand in 2015? *Ann Hematol* 2015; 94 (Suppl. 2): S103-105
2. Hughes TP, Saglio G, Quintás-Cardama, et al. BCR-ABL1 mutation development during first-line treatment with dasatinib or imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia* 2015; 29 (9): 1832-1838
3. Gibbons DL, Priel S, Posocco P, et al. Molecular dynamics reveal BCR-ABL1 polymutants as a unique mechanism of resistance to PAN-BCR-ABL1 kinase inhibitor therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111 (9): 3550-3555
4. Khorashad JS, Kelley TW, Szankasi P, et al. BCR-ABL1 compound mutations in tyrosine kinase inhibitor-resistant CML: frequency and clonal relationships. *Blood* 2013; 121 (3): 489-498
5. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: Recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011; 118: 1208-1215
6. Hehlmann R. How I treat CML blast crisis. *Blood* 2012; 120 (4): 737-747
7. Branford S. Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia-how low can you go? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016; 2016 (1): 156-163
8. Branford S, Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate. *Methods Mol Med* 2006; 125: 93-106
9. Yin L, Dittman D, Chenn A. Rapid quantitative detection of the T315I mutation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Diagn Mol Pathol* 2012; 21 (1): 34-39
10. Deininger MW, Hodgson JG, Shah NP, et al. Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. *Blood* 2016; 127 (6): 703-712
11. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122 (6): 872-884
12. Radich JP, Deininger M, Abboud CN, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines): Chronic myelogenous leukemia, v2.2017. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)



13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405
14. Parker WT, Yeung DT, Yeoman AL, et al. The impact of multiple low-level BCR-ABL1 mutations on response to ponatinib. *Blood* 2016; 127 (15): 1870-1880
15. Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, et al. BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell* 2014; 26 (3): 428-442
16. Ai J, Tiu RV Practical management of patients with chronic myeloid leukemia who develop tyrosine kinase inhibitor-resistant BCR-ABL1 mutations. *Ther Adv Hematol* 2014; 5 (4): 107-120

## 2.2. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ПЪРВИЧНА МИЕЛОФИБРОЗА

### 2.2.1. *JAK2*-, *CALR*- и *MPL*-мутации

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Първичната миелофиброза (ПМФ) е клонална болест на хемопоезата, включена в групата на отрицателните за Филадельфийска хромозома и фузионен ген *BCR-ABL1* “класически” миелопролиферативни неоплазии, към която се отнасят също полицитемия вера и есенциална тромбоцитемия.<sup>1</sup> Характеризира се с пролиферация в костния мозък на мегакариоцити с белези на дисплазия, прогресираща ретикулинова и колагенова фиброза, неефективна еритропоеза и поява на екстрамедуларна хемопоеза, причиняваща изразена органомегалия.<sup>2-5</sup> Хромозомни аномалии при ПМФ се срещат в около една трета от пациентите, като най-чести са *del(20q)*, *del(13q)*, *+8* и *+9*, както и аномалиите на хромозома 1. По-рядко се наблюдават *-7/del(7q)*, *del(5q)*, *del(12p)*, *+21* и *der(6)t(1;6)(q21;p21.3)*.<sup>6</sup> Спектърът от молекулярни аномалии е изключително хетерогенен, като с най-голямо значение са мутациите, засягащи *JAK2* (*janus kinase 2*), *CALR* (*calreticulin*) и *MPL*- (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*) гените<sup>7</sup>, за които се смята, че имат основно значение за патогенезата на болестта.

По правило *JAK2*-генът е разположен на хромозома 9p24 и кодира синтез на цитоплазмен протеин с тирозинкиназна активност, имащ ключова роля в сигналната трансдукция от различни мембрани рецептори за растежни фактори. Мутацията засяга нуклеотид 1849 в екзон 14, при което настъпва заместване на валин с фенилаланин в кодон 617 (V617F); това обуславя трайно активиране на тирозинкиназната активност и свърхчувствителност или пълна независимост към съответни пролиферативни стимули от околната сре-

да. Мутацията се среща в 50-60% от пациентите, без да е патогномонична; доказва се и в над 90% от пациенти с полицитемия вера и в около 50-60% с есенциална тромбоцитемия.

От друга страна, *CALR*-генът е разположен на хромозома 19p13.2 и кодира синтез на протеин, участващ в регулация на разнообразни биологични процеси – поддържане на баланс на Ca<sup>2+</sup>, имуен отговор, клетъчна пролиферация и адхезия и др. При ПМФ най-често (85%) се наблюдават две основни индел-мутации, засягащи екзон 9: тип 1 – делеция на фрагмент с големина 52 bp (c.1092\_1143del, L367fs\*46) и тип 2 – инсерция на фрагмент с големина 5 bp (c.1154\_1155insTTGCC, K385fs\*47); по-рядко се срещат и други нарушения. Мутациите в *CALR*-гена се доказват в около 25-30% от случаите с миелофиброза. Хомозиготно носителство е изключително рядко и се наблюдава основно по отношение на тип 2 мутация.

От трета страна, *MPL*-генът е разположен на хромозома 1p34 и кодира синтез на рецептора за тромбопоетин. Най-често срещани са мутации при ПМФ се разполагат в екзон 10 и включват транзиции в нуклеотид 1544, в резултат на което се замества триптофан в кодон 515 на трансмембрания домейн с други аминокиселини – MPLW515L/K/A/R. Значително по-рядко се засяга кодон 505 – например S505N. Мутации в *MPL*-гена се доказват в около 5-10% от пациентите с ПМФ. В повечето случаи се срещат под форма на хетерозиготно носителство. Подобно на *JAK2* V617F, мутациите в *CALR*- и *MPL*-гените се срещат не само при ПМФ, но и при есенциална тромбоцитемия.<sup>9,10</sup> По правило мутациите в трите гена са взаимноизключващи се<sup>8</sup>, независимо, че се съобщава и едновременно носителство на две различни мутации<sup>11,12</sup>.

**Аналитични методи за изследване.** Изследването на мутации в *JAK2*-, *CALR*- и *MPL*-гените е задължителен елемент от диагностичния панел при пациенти със съмнения за

ПМФ. За изследване на *JAK2* V617F-мутация в рутинната практика се използват различни методи, основаващи се предимно на качествена или количествена полимеразно-верижна реакция (PCR), най-често под форма на алел-специфична PCR (качествена), количествена PCR с използване на Taqman-сонди<sup>13</sup>, комбиниране на PCR с RFLP (полиморфизъм в дължината на рестрикционните фрагменти) и BsaXI-рестриктаза и др.<sup>12,13</sup>. Понастоящем се използват четири различни подхода за изследване на *CALR*-мутация – секвениране по *Sanger*, комбинирано с фрагментен анализ и капилярна електрофореза, високо разрешителен мелтинг-анализ (HRM), количествена или качествена PCR и секвениране от ново поколение (NGS).<sup>14</sup> По правило *MPL*-мутациите могат да се докажат чрез секвениране по *Sanger*, което е скъпо и трудоемко; затова в рутинната практика се предпочитат PCR-базирани подходи, най-често алел-специфична PCR за всяка една от мутациите или PCR-амплифициране на рефракторна мутационна система (ARMS).<sup>13</sup> Мутациите в трите гена са взаимноизключващи се, поради което се препоръчва стъпков алгоритъм, при който се продължава с търсене на нова мутация само ако предходното изследване е показало отрицателен резултат. През последните години за едновременен скрининг и на трите мутации се предлага NGS.

**Доказателства за предиктивно значение.** Наличието на някоя от мутациите, засягащи един от трите гена, е един от големите диагностични критерии за ПМФ според последната ревизия на Класификацията на миелопролиферативни неоплазии.<sup>1</sup> Независимо че мутациите не са патогномонични за болестта, доказването им е маркер, показващ клонален характер на миелоидна пролиферация и отхвърлящ евентуални реактивни промени.<sup>1</sup> Според наличие и вид на мутациите се разграничават четири прогностични групи пациенти: *CALR*-мутации-положителни (медианна преживяемост 15.9 години), *MPL*-мутации-положителни (медианна преживяемост 9.9 години), *JAK2* V617F-положителни (медианна преживяемост 5.9 години) и отрицателни за *JAK2*

V617F-, *CALR*- и *MPL*-мутации (тройно отрицателни) (медианна преживяемост 2.3 години).<sup>18</sup> Сходни данни се съобщават и в друга проучване: *CALR*-мутации-положителни (медианна преживяемост 17.7 години), *MPL*-мутации-положителни (медианна преживяемост 9.1 години), *JAK2* V617F-положителни (медианна преживяемост 9.2 години) и *JAK2* V617F/*CALR*-мутации/*MPL*-мутации-отрицателни (тройно отрицателни) (медианна преживяемост 3.2 години).<sup>19</sup> По отношение на *CALR*-мутациите се съобщава, че прогностично значение има и конкретната ѝ форма – медианна обща преживяемост (ОП) при тип 1 и сходните ѝ мутации е 26.4 години срещу 7.4 години при тип 2 и сходните ѝ.<sup>20</sup> В групата на *JAK2* V617F-положителни се съобщава прогностично значение на мутационния товар за медианна ОП съотв. 80 месеца при висок ( $\geq 50\%$ ) товар срещу 50 месеца при нисък ( $< 50\%$ ).<sup>21</sup> Значима асоциация с носителство и вид на мутации е наблюдавана и по отношение на десетгодишната трансформация в остра левкемия – съотв. 9.4% при *CALR*-мутации, 19.4% при *JAK2* V617F, 16.9% при *MPL* и 34.4% при тройно отрицателни. Мутационният статус има значение и за риска от тромбози, който е значимо по-висок при пациенти с *JAK2* V617F- и *MPL*-мутации спрямо тези с *CALR*-мутации.<sup>22</sup> Редица експерти предлагат за по-добро прецизиране на риска т.нар. нова прогностична скоринг-система, основаваща се на мутационен статус (MIPSS).<sup>23</sup>

Терапевтичната стратегия варира при отделните болни и се определя от рисковата група и наличието на симптоматика. При пациенти с нисък риск, особено ако са безсимптомни, не се налага специфично лечение. При симптоматични пациенти широко приложение намира таргетно лечение с *JAK1/2*-инхибитора *ruxolitinib*, но ефективността му не се повлиява от мутационния статус, включително и от наличието на *JAK2* V617F. При пациенти с висок риск, вкл. и тези, които са тройно отрицателни, една опция с потенциал за излекуване е алогенна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.<sup>22</sup>

A

- Изследването на мутации в *JAK2* (V617F), *CALR* и *MPL* се препоръчва като задължителен елемент от диагностичния панел в момента на диагноза при пациенти с вероятна първична миелофиброза.
- Препоръчва се поетапно изследване чрез PCR на три гена според честота на мутациите: скрининг за *JAK2* V617F, при отрицателен резултат – изследване за *CALR*-мутации, а при отрицателен резултат – търсене на мутации в *MPL*-гена.
- Установяване на *JAK2*-мутация не се препоръчва като предиктивен маркер при таргетно лечение с JAK-инхибитори.
- При пациенти с тройно негативен резултат се препоръчва алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки.



Мутационният статус проявява изразена корелация с прогнозата на първична миелофиброза, като най-добра е при *CALR*-мутации, а най-неблагоприятна – при тройно отрицателни пациенти.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-2405
2. Mascarenhas J. Looking forward: novel therapeutic approaches in chronic and advanced phases of myelofibrosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015: 329-339
3. O'Malley DP, Fedoriw Y. Bone marrow. In: Essentials of Anatomic Pathology. Cheng L, Bostwick DG. (Eds.), 2016, 821-868
4. Thiele J. Philadelphia chromosome–negative chronic myeloproliferative disease. *Am J Clin Pathol* 2009; 132 (2): 261-280
5. Mesa RA, Passamonti F. Individualizing care for patients with myeloproliferative neoplasms: Integrating genetics, evolving therapies, and patient-specific disease burden. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016; 35: e324-335
6. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Eur J Haematol* 2009; 82 (5): 329-338
7. Bose P, Verstovsek S. Prognosis of primary myelofibrosis in the genomic era. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2016; 16 (Suppl): S105-113
8. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol* 2016; 91 (1): 50-58
9. Shirane S, Araki M, Morishita S, et al. JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2015; 100 (2): e46-48
10. Lin Y, Liu E, Sun Q, et al. The prevalence of JAK2, MPL, and CALR mutations in chinese patients with BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2015; 144 (1): 165-171

11. Usseglio F, Beaufls N, Calleja A, et al. Detection of CALR and MPL mutations in low allelic burden JAK2 V617F essential thrombocythemia. *J Mol Diagn* 2017; 19 (1): 92-98
12. Busque L, Porwit A, Day R, et al. Laboratory investigation of myeloproliferative neoplasms (MPNs): Recommendations of the Canadian Mpn Group. *Am J Clin Pathol* 2016; 146 (4): 408-422
13. Bench AJ, White HE, Foroni L, et al. Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations. *Br J Haematol* 2013; 160 (1): 25-34
14. Luo W, Yu Z. Calreticulin (CALR) mutation in myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Stem Cell Investig* 2015; 2: 16
15. Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2013; 15 (6): 733-744
16. Delic S, Rose D, Kern W, et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *Br J Haematol* 2016; 175 (3): 419-426
17. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2014; 89 (9): 915-925
18. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014; 124 (16): 2507-2513
19. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014; 124 (7): 1062-1069
20. Guglielmelli P, Rotunno G, Fanelli T, et al. Validation of the differential prognostic impact of type 1/type 1-like versus type 2/type 2-like CALR mutations in myelofibrosis. *Blood Cancer J* 2015; 5: e360
21. Rozovski U, Verstovsek S, Manshour T, et al. An accurate, simple prognostic model consisting of age, JAK2, CALR, and MPL mutation status for patients with primary myelofibrosis. *Haematologica* 2017; 102 (1): 79-84
22. Messa R, Jamieson C, Bhatia R, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Myeloproliferative Neoplasms. v2. 2017. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
23. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rotunno G, et al. Mutation-enhanced international prognostic scoring system (MIPSS) for primary myelofibrosis: An AGIMM & IWG-MRT Project. *Blood* 2014; 124 (21): 405



3

## Предиктивни биомаркери при лимфоидни неоплазии





### 3.1. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕВКЕМИЯ

#### 3.1.1. *del(17p)/TP53*-мутация

*Георги Балаценко, Маргарита Генова*

**Молекулярна биология.** *Del(17p)* е една от най-важните клинично значими хромозомни аберации при хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ), проявяваща изразена асоциация с отговор към лечение и цялостна прогноза.<sup>1</sup> Смята се, че основен механизъм, чрез който се опосредства това неблагоприятно прогностично значение на *del(17p)*, е загубата на *TP53*-гена.<sup>3</sup> По правило *TP53* е тумор-супресорен ген, чието увреждане при делеции или соматични мутации се среща както при различни хематологични неоплазии, така и при солидни тумори. Той е разположен на хромозома 17p13.1 и съдържа единадесет екзона, десет от които са кодиращи (2-11).<sup>4</sup> Синтезирият р53-протеин е изграден от 393 аминокиселини и включва в структурата си следните домейни: (i) N-терминален домейн, който осигурява трансактивация на таргетни гени; (ii) централен ДНК-свързващ домейн, който директно взаимодейства с консенсусни ДНК-последователности в таргетни промотори; (iii) олигомеризационен домейн, чрез който четири мономерни полипептидни вериги се свързват една с друга и формират финална тетмерна молекула; (iv) C-терминален домейн, който съдържа важни регулаторни об-

ласти за ДНК-специфично и ДНК-неспецифично свързване с р53.<sup>5</sup> В допълнение, освен протеин, съдържащ цялата аминокиселинна последователност, се срещат и различни изоформи на р53, като експресията им има както тъканно-специфичен характер, така и се наблюдават и различия на субклетъчната им локализация. Функционално р53 има ключово значение за противотуморната бариера, предпазвайки организма от пролиферация на малигнени клетки. На ранни етапи от карциногенеза туморните клетки са подложени на генотоксичен стрес, който предизвиква активиране на ДНК-йерархично структуриран механизъм за установяване на ДНК-лезии и тяхното репарирание или арест на клетъчния цикъл, ако за възстановяването на ДНК е необходимо допълнително време. Алтернативна възможност в случаите, когато увреждането на ДНК е твърде обширно и възстановяването е неприложимо, е да се индуцира апоптоза или репликативно стареене на клетката. Ефективното индуциране на всички тези процеси е възможно само с активно участие на р53.<sup>4</sup>

Делециите, засягащи късото рамо на 17 хромозома [*del(17p)*] се доказват съотв. в 5% и 9% от новодиагностицирани пациенти с ХЛЛ според използвания метод за изследване – конвенционален цитогенетичен анализ или флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH).<sup>1</sup> Честотата нараства значително и достига 30-50% при клинична прогресия на болестта, рефрактерност към имунохимиотерапия или рецидив.<sup>2</sup> По правило *del(17p)* се среща само в част от левкемичните клетки, което предполага, че появата на аномалия е субклонална. В хода на болестта или след провеждане на имунохимиотерапия настъпва клоналната селекция на клетки, носещи аномалията, които придобиват пролиферативни преимущества и се превръщат в доминираща популация. Данните за честота на мутациите в *TP53* при ХЛЛ варират между 4% и 37%<sup>6</sup> според използвана методология, особености на изследвана популация и стадий на болестта. Мутации в

*TP53* се срещат както при пациенти с *del(17p)*, така и при пациенти, при които делецията отсъства. В случаи с доказана *del(17p)* мутации в *TP53*, увреждащи незащегнатия от *del(17p)* алел, се наблюдават в над 80% от случаите<sup>7</sup>, докато при отсъствие на *del(17p)* те се срещат значително по-рядко, което вероятно отразява селективен натиск на клетки, носещи биалелното инактивиране на гена. Най-често мутациите засягат екзони 4-9 на *TP53*.<sup>8</sup> При *TP53*, за разлика от редица други тумор-супресорни гени, не е необходимо да се инактивират и двата алела, за да се наруши функцията на p53-протеина. Зависимият от p53 сигнален път е с изразена чувствителност към промени в нивото на p53-протеина и синтезираният само от единия алел продукт може да не е достатъчен, за да осигури адекватната му функция. Този ефект, означаван като хаплоинсуфициенция, се предполага като основен механизъм при пациенти с изолирана *del(17p)* или само с *TP53*-мутация.<sup>9</sup> Същевременно загубата на функция може да не е най-тежък дефект при p53, допринасящ за прогресия на болестта, тъй като два други допълнителни механизми, свързани с мутации в *TP53*, се обсъждат в този контекст. Съществуват данни за доминантно-негативен ефект на моноалелни мутации спрямо интактен (“див” тип) алел. Този ефект се наблюдава в резултат на инхибиране на p53-функцията чрез олигомеризация на мутирани и немутирани p53-полипептидни вериги. В допълнение се съобщава и за придобиване на функции, чийто ефект вероятно е независим от алелния статус.

**Аналитични методи за изследване.** Интерфазният FISH е рутинен диагностичен подход за изследване на най-важните клинично значими хромозомни аномалии при ХЛЛ, вкл. и *del(17p)*, тъй като доказването им чрез конвенционален хромозомен лентов анализ е затруднено поради нисък пролиферативен потенциал на левкемичните клетки *in vitro* и относително висока честота на фалшив “нормален kariotип”, свързан

с пролиферация на нелевкемични резидуални Т-лимфоцити.<sup>10</sup> Понастоящем се препоръчва изследване на *del(17p13)* чрез FISH преди стартиране на първа линия лечение, а не към момента на диагноза. Поради възможна клонална селекция на клетки, носещи аномалията по време на първоначално използван терапевтичен протокол, е необходимо изследването да се повтори при всяка необходимост от промяна в терапевтичното поведение, вкл. при стартиране на лечение при рецидив.<sup>11</sup>

Мутации в *TP53* се доказват при повечето *del(17p)*-положителни пациенти, както и в около 5% от нелекувани пациенти с ХЛЛ с показания за стартиране на терапия, при които отсъства *del(17p)*. Тези пациенти се характеризират с резистентност към конвенционални терапевтични протоколи и намалена преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП); поради това се препоръчва включване на изследването в диагностичния набор при пациенти с ХЛЛ<sup>12</sup> при наличие на технически възможности. От European Research Initiative on CLL (ERIC) са разработени указания за изследване на мутации в *TP53*, като за целта се препоръчва директно секвениране по *Sanger*. Областта на интерес трябва да включва минимум екзони 4-9, а при възможност – 2-11. Изследването следва да се провежда при всички пациенти, участващи в клинични проучвания, а извън тях – при пациенти, подходящи за алогенна трансплантация на хемопоетични стволови клетки или при други интензивни протоколи (FCR и BR). Анализът трябва да се проведе непосредствено преди вземане на решение за започване на лечение. При пациенти без мутации се препоръчва повторно изследване, когато е необходима смяна на терапия и резултатът от изследването може да повлияе избора ѝ.<sup>13</sup> Указанията съдържат и препоръки за стандартни оперативни процедури, качествен контрол, форма на съобщаване на резултати и интерпретация. През последните години за изследване на мутациите в *TP53* приложение намира и секвениране от ново поколение (NGS).

**Доказателства за предиктивно значение.** Изследването на *del(17p)* и мутации в *TP53* няма съществено значение за диагнозата на ХЛЛ и не е част от рутинния набор от диагностични подходи при новодиагностицирани.<sup>14</sup> Приема се, че наличието на аномалии е най-важен неблагоприятен прогностичен фактор, който, съпоставен с други клинично значими аномалии, е асоцииран с най-кратка медианна ОП и най-кратък интервал до започване на лечение, съответно 32 и 9 месеца. Изследването на аномалиите има ключово значение при определяне на прогноза и избор на оптимален терапевтичен протокол. Аномалиите, засягащи *TP53*-гена, се наблюдават предимно при отсъствие на мутации в локуса на тежките вериги на имуноглобулините (*IGHV*), като е честа асоциацията с други хромозомни аномалии, каквито са делециите на 3p, 4p, 9p, 18p, 20p, както и аберациите, засягащи хромозома 8 (8p- или 8q+).<sup>15, 16</sup> Наблюдава се също и изразен дисбаланс в експресията на редица гени, участващи в контрола на апоптоза, регулацията на клетъчния цикъл и свързаните с BCR-сигнални каскади – намалена експресия на *TP53*, *CCND3*, *BCL2*, *SYK*, *ATM*, *TCL*, *P13K*, *CCND1* и *AID* и свръхекспресия на *P2*, *MYC* и *AICL*. В допълнение при ХЛЛ с *del(17p)* се наблюдава и характерен профил на други мутации, засягащи гени *NOTCH1* (15%), *RPS15* (12%), *DDX3X* (8%) и *GPS2* (6%)<sup>16</sup>, висока честота на атипичен имунофенотип с висока експресия на CD20 и повърхностни имуноглобулини, както и по-висока честота на експресия на CD38 и ZAP-70.

Когато се обсъжда клиничната значимост на *del(17p)/TP53*-мутации, трябва да се има предвид изразената хетерогенност на пациентите, при които те се установяват, в зависимост от: (i) момент от клинична еволюция на ХЛЛ, когато са доказани аномалиите, (ii) комбинация от нарушения [*del(17p)*] и/или *TP53*] и (iii) относителен брой на клетки, носещи *del(17p)* при изследване чрез FISH. Аномалиите могат да бъдат установени на ранен клиничен етап, съответно още към момента на диагноза или по време на безсимптомната фаза, или като вторично нарушение, настъпващо в хода на болестта,

което се среща по-често в клиничната практика. В първия случай медианната ОП е значително по-дълга (4-5 години) от тази при пациенти, при които аномалията е придобита вторично (1-1.5 години).<sup>15</sup> Доскоро се смяташе, че мутациите в *TP53* се срещат рядко към момента на диагноза и по време на безсимптомна фаза, но през последните години чрез по-чувствително NGS са установени мутации в 9% от нелекувани пациенти, но с ниска алелна честота от 2.1%, поради което те се пропускат при класическо секвениране по *Sanger*. Пациенти с малки субклонове, носещи мутации в *TP53*, се характеризират със същия клиничен фенотип и неблагоприятна прогноза както тези, носещи клонални *TP53*-мутации. При проследяване е доказано, че малките субклонове, установени преди започване на лечение, стават доминираща клетъчна популация при рецидив и обуславят поява на резистентност.<sup>17</sup>

Прогностичната значимост на *del(17p)* е свързана със загуба на *TP53*-гена, като в някои проучвания се прави разграничение дали се касае за моноалелно, или за биалелно инактивиране. В преобладаващ брой от случаи *del(17p)* е придружена с мутация във втория алел (биалелно инактивиране), при което функцията на p53 напълно отсъства. По-рядко *del(17p)* се среща без придружаващи мутации в *TP53* или мутацията в *TP53*-гена може да засегне само един алел при отсъствие на *del(17p)* (моноалелно инактивиране). Среща се също така и инактивиране на *TP53*-гена посредством две различни мутации и в двата алела при отсъствие на *del(17p)*. Честотата на моно- и биалелни нарушения в *TP53* зависи от момента, в който е проведено изследването. Към момента на диагноза от изследвани 268 пациенти с ХЛЛ мутации в *TP53* са доказани в 3.7%, в повечето случаи едновременно с *del(17p)*, като относителният дял на изолирани мутации е едва 1.1%.<sup>18</sup> В друго проучване, обхващащо 400 пациенти с ХЛЛ, преди започване на лечение засягане на *TP53* е намерено в 17.5%, при 5.8% са доказани моноалелни на-

рушения (съотв. 5.0% с *TP53*-мутации и 0.8% с *del(17p)*), докато при останалите 11.8% са наблюдавани биалелни нарушения, от които 10.5% са с *del(17p)* плюс *TP53* мутации и 1.3% са с две различни мутации и в двата алела.<sup>19</sup> Мненията за прогностична значимост на моно- и биалелни нарушения са противоречиви. Според някои автори пациенти, които носят и двете аномалии [*del(17p)* плюс мутации във второ копие на *TP53*], имат значително по-неблагоприятна прогноза със скъсена ОП и ПБП в сравнение с тези, които имат само мутации в *TP53* или само *del(17p)*. Същевременно дори и само *del(17p)* (в отсъствие на мутации във второ копие или обратно) също има неблагоприятен прогностичен ефект в сравнение пациентите с нормален *TP53*, което предполага, че дори и моноалелна инактивация на *TP53* може да е достатъчна за поява на резистентност и клоална селекция.<sup>19</sup> Според други автори липсва значима разлика в прогностичната значимост, свързана с моно- или биалелно инактивиране на *TP53*.<sup>8</sup>


Друг важен фактор, стратифициращ пациенти с *del(17p)* в групи с различни риск, е големината на клона (респ. относителен дял на брой на ядрата), носещ аномалията при изследване чрез FISH; прогнозата е по-добра, когато носителството на аномалията е в малък брой клетки. Точният критичен праг на относителен дял на *del(17p)*-положителни ядра с прогностична значимост е обект на дискусии. Според някои автори при изследването на 777 пациент с ХЛЛ се установява, че наличието на *del(17p)* в  $\geq 10\%$  от клетките е с най-изразена значимост за неблагоприятна прогноза – при тези пациенти се постига терапевтичен отговор едва в 29% и се отбелязва медианна ОП от 6 месеца.<sup>20</sup> В друго проучване, обхващащо 1585 пациенти с ХЛЛ, наличието на  $\leq 20\%$  *del(17p)* е свързано със значимо по-дълго време от диагноза до започване на първа линия терапия (44 месеца) спрямо тези с  $> 20\%$  (1-8 месеца). Същата тенденция се установява и по отношение на медианна ОП – съотв. 11 срещу 3 години.<sup>21</sup> Според трети автори

оптималният праг с прогностична значимост е 25% *del(17p)*, позволяващ прогнозиране на тригодишна ОП с чувствителност – 77% и специфичност – 60%.<sup>22</sup>

Понастоящем се смята, че наличие на *del(17p13)/TP53*-мутации само по себе си не е основание за стартиране на лечение. Данните показват, че едва при 50% от нелекувани пациенти с ХЛЛ, носещи *del(17p13)*, се наблюдава прогресия в рамките на 12-18 месеца, докато при останалите, проследявани до 70 месеца, болестта има протрахирано протичане без прогресия.<sup>23</sup> При пациенти, при които се налага започване на лечение, наличието на *del(17p)*- или *TP53*-мутации са най-важни фактори, които следва да се имат предвид при избор на терапия. Данните за статуса на *del(17p)*- и/или *TP53*-мутации, заедно с четири други независими параметъра (възраст, клиничен стадий, мутационен статус на IGHV и ниво на  $\beta 2$ -микроглобулин), са в основата на международен прогностичен индекс за ХЛЛ (CLL-IPI), разработен въз основа на метаанализ от 3472 пациенти.<sup>24</sup> Редица наблюдения подкрепят идеята, че наличие на *del(17p)*- и/или *TP53*-мутации непосредствено корелира с очакваната ефективност на терапевтичния подход. Например пациенти, носещи *del(17p)*- или мутации в *TP53*-гена, имат неблагоприятна прогноза при конвенционални протоколи с имунохимиотерапия (FCR, *fludarabine/cyclophosphamide/rituximab*) и едва при 5% се постига пълна ремисия.<sup>25</sup> Отсъствие на адекватен отговор се съобщава и при лечение с BR (*bendamustine/rituximab*) като първа линия, без да се постигне пълна ремисия при нито един от включените пациенти с *del(17p)* и с медианна ПБП от 7.9 месеца.<sup>26</sup>

През последните години в клиничната практика навлизат нови таргет-ориентирани терапевтични опции с доказана ефективност при високо рискови пациенти с ХЛЛ, носещи *del(17p13)/TP53* мутации – *idelalisib* (PI3K-инхибитор), *ibrutinib* (инхибитор на тирозинкиназата на Bruton) и *venetoclax* (Bcl2-инхибитор).<sup>27</sup> Оптималното определяне на последователността на отделните лекарствени препарати е в процес на проучване.<sup>28</sup>

<b>A</b>	При пациенти с <i>del(17p)</i> и <i>TP53</i> -мутации и клинични индикации за лечение се препоръчва приложение на PI3K- или BCL2-инхибитори или аlogenна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.
<b>B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Изследване на <i>del(17p)</i>-статус и <i>TP53</i>-мутации не се препоръчва като елемент на първоначален диагностичен панел при пациенти с хронична лимфоцитна левкемия.</li> <li>■ Изследване на <i>del(17p13)</i> и търсенето на мутации в <i>TP53</i>-гена се препоръчва преди стартиране на първа линия лечение, преди промяна в терапевтичното поведение или при стартиране на лечение за рецидив.</li> <li>■ За изследване на <i>del(17p)</i>-статус се препоръчва интерфазен FISH-метод, а като средство на избор за търсене на мутации в <i>TP53</i> – секвениране по <i>Sanger</i> (най-малко на екзони 4-9) или секвениране от ново поколение (NGS).</li> </ul>

	<i>Наличие на del(17p)/мутации в TP53 при новодиагностицирани болни с хронична лимфоцитна левкемия не е индикация за стартиране на лечение при отсъствие на съответни клинични критерии.</i>
---	--

## ЛИТЕРАТУРА

1. Strati P, Keating MJ, O'Brien SM, et al. Outcomes of first-line treatment for chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion. *Haematologica* 2014; 99 (8): 1350-1355.
2. Nabhan C, Raca G, Wang YL. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era. *JAMA Oncol* 2015; 1 (7): 965-974
3. Stephens DM, Byrd JC. Chronic lymphocytic leukemia with del(17p13.1): a distinct clinical subtype requiring novel treatment approaches. *Oncology* 2012; 26 (11): 1044-1054
4. Trbusek M, Malcikova J. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Adv Exp Med Biol* 2013; 792: 109-131
5. Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2 (6): a000919
6. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012; 209 (12): 2183-2198
7. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28 (29): 4473-4479
8. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011; 29 (16): 2223-2239

9. Soussi T, Wiman KG. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death and Differentiation* 2015; 22: 1239-1249
10. Cavenagh JD, Lister TA. Chronic lymphocytic leukemia: Diagnosis and management. In: Chronic leukemias and lymphomas: Biology, pathophysiology, and clinical management. Schiller GJ. Ed. 2003, pp. 23-53
11. Ladetto M, Buske C, Hutchings M, et al. ESMO consensus conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for prognostic tools in mature B-cell lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol* 2016; 27 (12): 2149-2160
12. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015; 29: 329-336
13. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26 (7): 1458-1461
14. Wierda WG, Zelenetz AD, Gordon LI, et al. NCCN guidelines insights: Chronic lymphocytic leukemia/Small lymphocytic leukemia, v1.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15 (3): 293-311
15. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 435983
16. Yu L, Kim HT, Kasar SN, et al. Survival of del17p CLL depends on genomic complexity and somatic mutation. *Clin Cancer Res* 2017; 23 (3): 735-745
17. Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 123 (14): 2139-2147
18. Zainuddin N, Murray F, Kanduri M, et al. TP53 Mutations are infrequent in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2011; 35 (2): 272-274
19. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood* 2009; 114 (26): 5307-5314
20. Oscier D, Wade R, Davis Z, et al. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica* 2010; 95 (10): 1705-1712
21. Van Dyke DL, Werner L, Rassenti LZ, et al. The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol* 2016; 173 (1): 105-113
22. Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, et al. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol* 2012; 157 (1): 67-74
23. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al. De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009; 114 (5): 957-964
24. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016; 17 (6): 779-790
25. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 1164-1174
26. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German chronic lymphocytic leukemia study group. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3209-3216
27. Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology (NCCN Guidelines). Chronic lymphocytic leukemia/Small lymphocytic lymphoma. v2.2017. Available at: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
28. Mato AR, Hill BT, Lamanna N, et al. Optimal sequencing of ibrutinib, idelalisib, and venetoclax in chronic lymphocytic leukemia: Results from a Multi-Center Study of 683 patients. *Ann Oncol* 2017; pii: mdx031

### 3.1.2. *del(11q)/ATM*-мутация

Георги Балаценко, Маргарита Генова

**Молекулярна биология.** Делеции в дългото рамо на хромозома 11 [*del(11q)*] е втората най-честа генетична аномалия при хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ), срещаща се в около 10-32% от пациентите.<sup>1</sup> Честота на аномалията е значително по-ниска през ранни стадии (10%), докато при нелекувани пациенти с авансирала болест тя достига до 25%.<sup>2</sup> Честотата на *del(11q)* при нелекувани и лекувани болни в България е съответно 12.3% и 24.1%.<sup>3</sup> Според големината на делетирания регион се разграничават два вида делеции, означавани като *класически* и *атипични*. Така наречените класически 11q-делеции са по-чести и обхващат големи области с дължина до над 20 Mbp.<sup>4</sup> По правило аномалиите ангажират само едната 11-та хромозома, като се смята, че хомозиготни 11q-делеции не съществуват. Минималният делеционен район обхваща 11q22.3-q23.1-областта, поради което почти винаги се засяга *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated) гена, както и редица други гени, между които *RDX*, *FRDX1*, *RAB39*, *CUL5*, *ACAT*, *NPAT*, *KDEL2*, *EXPH2*, *MRE11*, *H2AX* и *BIRC3*. По правило *ATM*-генът кодира синтез на нуклеарна серин/треотин-киназа, чиято активност се индуцира чрез двуверижни ДНК-скъсвания, възникващи ендогенно или след експозиция на ДНК-увреждащи агенти (йонизираща радиация, лекарствени препарати и др.).<sup>5</sup> Атипичните *del(11q)* са значително по-редки, локализирани са по-близо до центромера и обхващат относително малки области, като минималният делеционен район е различен от този, при класически *del(11q)*. Данните за биологията и клиничното значение на тези аномалии са оскъдни.<sup>4</sup>

Мутации в *ATM*-гена са намерени само в 8-30% от пациентите с ХЛЛ с *del(11q)*, което предполага, че вероятно и други гени имат значение за патобиологията на аномалията.

Един от тези гени е *BIRC3*, който е локализиран в непосредствена близост до *ATM*-гена на 11q22.<sup>4</sup> Въз основа на наличните данни се смята, че най-вероятно ХЛЛ-фенотипът, асоцииран с *del(11q)*, е резултат на двуверижни ДНК-скъсвания и дефект в ДНК-репарационни механизми, като тези нарушения са свързани със: (i) случайни мутации в *ATM*-гена, (ii) дисфункция или хипоактивация на *ATM*, несвързана с мутации, (iii) сложни генни делеции, засягащи гени, ангажирани в двувержните ДНК-скъсвания и тяхната репарация (например *Mre11a* и *H2AX*, заедно с *ATM*)<sup>6</sup> или (iv) други неидентифицирани механизми, асоциирани с *del(11q)*.<sup>7</sup> В допълнение, в левкемичните клетки при ХЛЛ с *del(11q)* са активирани пътища на сигнална трансдукция, свързани с преживяемост на клетките и тяхната пролиферация, най-вероятно поради абнормна свръхекспресия на *INSR*-гена<sup>8</sup>; по този начин се осигурява клонален селективен натиск с натрупване на клетки, носещи аномалията.

Пациенти с ХЛЛ, при които се доказва *del(11q)*, са по-млади мъже, характеризират се с изразена лимфаденомегалия и наличие на неблагоприятни прогностични фактори, като отсъствие на мутации в *IGHV*-гените. Изразената клиничната значимост на *del(11q)* при ХЛЛ се определя от редица фактори: (i) по правило всички пациенти с ХЛЛ с *del(11q)* имат прогресираща болест и на практика отсъстват случаи със стабилно протичане, при които не е необходимо начално лечение; (ii) продължителността на постигната ремисия след използвана първа линия терапия е по-кратка от тази, при пациенти без *del(11q)* [при които отсъства *del(17p)*], (iii) случаи с ХЛЛ с *del(11q)* могат да бъдат асоциирани с непропорционално нарастване на големината на вътрешни лимфни възли, което вероятно е свързано с високата експресия на *INSR*.<sup>9</sup> Смята се, че при част от пациентите с *del(11q)* може да бъде нарушена функцията и на втория *ATM*-алел в резултат на мутации, като това допълнително допринася за неблагоприят-

но клинично протичане; болните с биалелно *ATM*-инактивиране се характеризират с най-слаб отговор към терапия и най-неблагоприятна прогноза.<sup>10</sup> Срещат се и случаи с ХЛЛ и мутации в *ATM*, без *del(11q)*.

**Аналитични методи за изследване.** Интерфазен FISH е рутинен диагностичен подход за изследване на най-важните клинично значими хромозомни аномалии при ХЛЛ, вкл. и *del(11p)*, тъй като доказването им чрез конвенционален хромозомен лентов анализ е затруднено поради ниския пролеферативен потенциал на левкемичните клетки *in vitro* и относително високата честота на фалшив “нормален” кариотип. Според препоръките на National Comprehensive Cancer Network (NCCN) и European Society of Medical Oncology (ESMO) изследването следва да се проведе преди стартиране на първа линия лечение, а не към момента на диагнозата.<sup>11, 12</sup> Желателно е изследванията да се повтарят при промяна в терапевтичното поведение, тъй като е възможна клонална селекция на клетки, носещи аномалиите по време на първоначалния терапевтичен протокол. Същото важи и при стартиране на лечението при рецидив на болестта. Секвенирането на *ATM*-гена не е част от рутинната диагностика поради изключителната му големина (62 кодиращи екзона), вариации в разположението и вида на мутациите.<sup>13</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Наличието на *del(11q)* при почти всички болни с ХЛЛ е асоциирано с бързо прогресираща болест, скъсено време до започване на първо лечение (ВЗПЛ), кратка продължителност на ремисията и скъсена обща преживяемост (ОП) след стандартна химиотерапия в сравнение с пациенти, при които отсъства *del(11q)* и без аномалии, засягащи 17p.<sup>4</sup> Същевременно при определяне на прогнозата при конкретен пациент е важно да се вземат предвид и някои допълнителни фактори. От значение за прогнозата при пациенти с *del(11q)* е и мутационният статус

на *IGHV*-гените – медианната ОП при пациенти с *del(11q)*, но без мутации *IGHV* е 11.26 години, докато при тази с отсъствие на мутации медианната ОП не е достигната. Аналогична тенденция се наблюдава и по отношение на тригодишна преживяемост: при *del(11q)* без мутации тя е 88% срещу 100% при наличие на *del(11q)* и мутации в *IGHV*.<sup>14</sup> Друг фактор с потенциално значение за прогнозата е наличие на съпътстващи мутации в *ATM*-гена, които се срещат в около 20-30% от пациентите с ХЛЛ, носещи *del(11q)*. Някои проучвания показват, че пациенти с биалелно инактивиране на *ATM* имат по-лоша прогноза от тези, носещи само делеция.<sup>15</sup> При интерпретация на прогностичната значимост на аномалията от значение е и относителният брой на клетките, положителни за *del(11q)* при изследване чрез FISH. При проучване, обхващащо 242 пациента с ХЛЛ и *del(11q)*, е установено, че пациенти с  $\geq 40\%$  от клетките с аномалия (74% от всички случаи) имат медианно ВЗПЛ от 19 месеца и ОП – 90 месеца срещу 44 месеца ВЗПЛ и недостигната ОП при пациенти, при които делецията се доказва в  $< 40\%$  от клетките.<sup>13</sup>

Ако се лекуват само с пуринови аналози, прогнозата при пациенти с *del(11q)* е лоша от тази при болни с всички останали хромозомни аномалии, с изключение на *del(17p)*, които се характеризират с най-лоша прогноза.<sup>1</sup> Разработването и навлизането в клиничната практика на терапевтични протоколи, включващи комбинации *fludarabine/cyclophosphamide* (FC) или имунохимиотерапия под форма на *fludarabine, cyclophosphamide* и *rituximab* (FCR), особено при нелекувани преди това пациенти, подобриха прогнозата и в известна степен преодоляха отрицателния ефект на *del(11q)*.<sup>16-18</sup> Друг имунохимиотерапевтичен протокол, предназначен за пациенти с коморбидност, е комбинация *obinutuzumab/chlorambucil*, който в съпоставка с *rituximab/chlorambucil* позволява удължаване на преживяемостта без прогресия (ПБП) и по-висока степен на пълен терапевтичен отговор (20.7% срещу 7.0%).<sup>19</sup> Независимо от постигнатия ефект, наличието на *del(11q)* продължава да бъде асоциирано със скъсена ПБП при използ-



ване на имунохимиотерапия.<sup>11</sup> Съществуват и редица други терапевтични опции, приложими за *del(11q)*-положителни пациенти; например монотерапия с *lenalidomide* при *del(11q)*-положителни по-възрастни пациенти с рецидивирала или рефрактерна ХЛЛ позволява да се постигне терапевтичен отговор в 39-47% от случаите<sup>20, 21</sup>, но поради повишена смъртност не се препоръчва в рутинната практика извън клинични проучвания<sup>11</sup>. Друга терапевтична опция за по-млади пациенти без изразена коморбидност е *bendamustine/rituximab* (BR), чрез която се постиг честота на отговор и честота на пълен отговор съотв. 90% и 40%.<sup>22</sup> През последните години продължителен контрол на болестта при пациенти с висок риск, вкл. и при млади с *del(11q)*, които са в добро общо състояние, се съобщава и при инхибитора на тирозинкиназата на *Bruton-Ibrutinib*<sup>10</sup>; при контраиндикации се използва FCR или високи дози *methylprednisolone/rituximab*<sup>23</sup>.

Според последни препоръки на NCCN (2017) при пациенти с ХЛЛ и *del(11q)* се препоръчва включване в клинични проучвания, а при отсъствие на такива изборът

на терапевтична стратегия се определя както от наличие на специфичната аномалия, така и от възрастта на пациентите и функционалното им състояние (коморбиден индекс, пърформанс статус). Предпочитани опции при пациенти на възраст  $\geq 70$  години или по-млади, но с коморбидност, включват *obinutuzumab/chlorambucil*, *ofatumumab/chlorambucil*, *rituximab/chlorambucil* или *bendamustine  $\pm$  rituximab*. Други възможности са *cyclophosphamide* и *prednison  $\pm$  rituximab*, *chlorambucil* или *rituximab*. При пациенти на възраст  $< 70$  години и без изразена коморбидност за първа линия на лечение се препоръчва FCR, *bendamustine  $\pm$  rituximab* или *pentostatin, cyclophosphamide, rituximab* (PCR). При пълна ремисия на първа линия терапия пациентите могат да се наблюдават до прогресия или да се включат в клинични проучвания. Пациенти с частична ремисия, ако са подходящи, могат да бъдат насочени към аlogenна трансплантация на хемопоеични стволови клетки. *Ibrutinib* или *idalalisib  $\pm$  rituximab* са предпочитани опции при пациенти с рецидив или с рефрактерна ХЛЛ.<sup>11</sup>

С

- При всички пациенти с хронична лимфоцитна левкемия, при които предстои започване или смяна на лечение, се препоръчва изследване чрез FISH на *del(11q)* с оглед определяне на риск и за избор на оптимален терапевтичен протокол.
- При *del(11q)*-положителна хронична лимфоцитна левкемия не се препоръчва монотерапия с пуринови аналози поради по-малка очаквана терапевтична полза в сравнение с всички останали хромозомни аномалии, с изключение на *del(17p)*.
- При *del(11q)*-положителна хронична лимфоцитна левкемия се препоръчва имунохимиотерапия, включваща моноклонални антитела и алкилиращ агент.
- При пациенти с рецидив или с рефрактерна *del(11q)*-положителна хронична лимфоцитна левкемия се препоръчват инхибитори на сигналната трансдукция, свързана с В-клетъчни рецептори (*ibrutinib* или *idalalisib  $\pm$  rituximab*).



**Наличието на *del(11q)* при пациенти с хронична лимфоцитна левкемия дефинира подгрупа с неблагоприятна прогноза, характеризизираща се с бърза прогресия, скъсени време до започване на терапия и обща преживяемост.**

## ЛИТЕРАТУРА

1. Moreno C, Montserrat E. Genetic lesions in chronic lymphocytic leukemia: what's ready for prime time use? *Haematologica* 2010; 95 (1): 12-15
2. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 37-50
3. Балащенко Г, Митев А, Тошков Ст, и съавт. Изследване на генетични аномалии чрез fluorescence in situ hybridization (FISH) при нелекувани пациенти с хронична лимфоцитна левкемия. X Национална конференция по клинична хематология, Варна, 03-06 октомври 2013
4. Puiggras A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 435983
5. Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, et al. *ATM* gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica* 2012; 97 (1): 47-55
6. Ouillette P, Fossum S, Parkin B, et al. Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2010; 16 (3): 835-847
7. Mohr J, Helfrich H, Fuge M, et al. DNA damage-induced transcriptional program in CLL: biological and diagnostic implications for functional p53 testing. *Blood* 2011; 117 (5): 1622-1632
8. Saiya-Cork K, Collins R, Parkin B, et al. A pathobiological role of the insulin receptor in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2011; 17 (9): 2679-2692
9. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 2013; 32 (23): 2805-2817
10. Austen B, Skowronska A, Baker C, et al. Mutation status of the residual *ATM* allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007; 25 (34): 5448-5457
11. Wierda WG, Zelenetz AD, Gordon LI, et al. NCCN Guidelines Insights: Chronic lymphocytic leukemia/Small lymphocytic leukemia, v1.2017. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15 (3): 293-311
12. Eichhorst B, Robak T, Montserrat E, et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO clinical practice guideline. *Ann Oncol* 2015; 26 (Suppl. 5): v78-v84
13. Hernández JÁ, Hernández-Sánchez M, Rodríguez-Vicente AE, et al. A low frequency of losses in 11q chromosome is associated with better outcome and lower rate of genomic mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE* 2015; 10 (11): e0143073
14. Gladstone DE, Blackford A, Cho E, et al. The importance of IGHV mutational status in *del(11q)* and *del(17p)* chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012; 12 (2): 132-137
15. Sutton LA, Rosenquist R. Deciphering the molecular landscape in chronic lymphocytic leukemia: time frame of disease evolution. *Haematologica* 2015; 100 (1): 7-16
16. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 1164-1174

17. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; 25: 793-798
18. Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 230-239
19. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med* 2014; 370 (12): 1101-1110
20. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, et al. Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2006; 24 (34): 5343-5349
21. Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, et al. Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111 (11): 5291-5297
22. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3209-3216
23. Voorhies BN, Stephens DM. What is optimal front-line therapy for chronic lymphocytic leukemia in 2017? *Curr Treat Options Oncol* 2017; 18 (2): 12

### 3.1.3. CD20-експресия

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** Маркерът CD20 е тетра-трансмембарен гликолизирани фосфопротеин и представлява първият антиген, идентифициран в В-клетъчната линия на диференциация. По правило CD20 е силно експресиран от В-клетъчни лимфоцити през тяхното развитие, но отсъства върху хематопоетични стволови клетки, ранни про-В-клетки и плазмоцити.<sup>1</sup> Кодира се от *MS4A1*-ген, разположен на 11q12 хромозома.<sup>2</sup> Играе роля в диференциацията, съзряването и активирането на В-клетки. Протеинът няма познат естествен лиганд и функциите му са свързани с осигуряване на оптимален В-клетъчен имунен отговор срещу Т-независими антигени. Молекулата CD20 остава върху мембраната на В-клетки без дисоциация или интернализация при свързване с CD20-антитяло. Предполага се, че играе роля на калциев канал в клетъчната мембрана. Молекулата може да инициира вътреклетъчни сигнали, активирайки каскада на фосфорилиране на вътреклетъчни протеини чрез свързване към тирозинкинази от Src-семейството, като например Lyn, Fyn и Lck.<sup>3</sup> Има данни за роля на CD20 при взаимодействие на В-клетки с микросредата. Експресията му се регулира от хемокинови сигнали чрез оста CXCR4/SDF1 и може да бъде нарушена от медикаменти, които се намесват във взаимодействия с микросредата.<sup>4</sup>

Експресия на CD20 се установява в широк спектър от неходжкинови лимфоми, в това число – В-клетъчна хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ)/дребноклетъчен лимфоцитен лимфом (ДЛЛ). Почти всички В-клетъчни лимфоми са CD20-положителни, но експресията може да варира както между различните В-клетъчни неоплазии, така и между отделни субтипове или пациенти. Като цяло, ХЛЛ се характеризира със значи-

мо по-ниски нива на експресия на CD20 в сравнение с дифузен В-едроклътъчен лимфом, фоликуларен лимфом и други В-клетъчни лимфоми<sup>9</sup>, но нивата на експресия са хетерогенни при различни пациенти<sup>10</sup>. Налице са данни, че при ХЛЛ клетките, които непосредствено са напуснали микросредата на лимфни възли и са нахлули в периферна кръв (CXCR4<sup>dim</sup> CD5<sup>bright</sup>), имат по-високи нива на CD20 в сравнение с клетки, циркулиращи в кръвта от по-дълго време (CXCR4<sup>bright</sup> CD5<sup>dim</sup>). Установено е, че CD20 се регулира директно от CXCR4-лиганд – стволово-клетъчен фактор 1 (SDF-1 $\alpha$ , CXCL12), продуциран от стромални клетки.<sup>4, 11</sup> В допълнение, нивата на CD20-експресия при ХЛЛ корелират с цитогенетиката, като случаите с трисомия 12 се характеризират с по-високи нива и с по-добър терапевтичен отговор към *rituximab*.<sup>12</sup> От друга страна, *NOTCH1*-мутации са свързани с ниски нива на CD20 при ХЛЛ и са отговорни за дерегулацията на хистон-деацетилаза (HDAC)-медирана епигенетична репресия на експресията на CD20, което е един от възможните механизми за по-ниска чувствителност към имунохимиотерапия на пациенти с *NOTCH1*-мутации.<sup>13</sup>

Експресията може да бъде модулирана в хода на болестта и нейното лечение по различни механизми и това да повлияе на ефективността. Познат е феноменът на транзиторно подтискане на CD20-експресия след лечение с *rituximab*<sup>14</sup> дори загуба върху левкемични клетки в до около 50% от случаите.<sup>15, 16</sup> Вероятни механизми за загуба на CD20 след лечение включват: интернализация на CD20-молекулата след прилагане на *rituximab*<sup>17</sup> и/или трогоцитоза (т.нар. “окосяване”) от клетъчната повърхност на комплекса CD20/*rituximab* посредством Fc $\gamma$ R от моноцити/макрофаги, за която се смята, че настъпва по-бързо и има по-съществено значение.<sup>18</sup> Налице са данни за медираща роля на неутрофилите в процеса на трогоцитоза, която се индуцира в значително по-голяма степен от *rituximab* в сравнение с *obinutuzumab*.<sup>19</sup> Съществуват данни за нама-

лена експресия на антигена и след прилагане на други медикаменти, напр. *lenalidomide*, който може да доведе до интернализирани молекули.<sup>20</sup> В допълнение, *ibrutinib* и СХСR4-инхибиторът *plerixafor* блокират SDF-1 $\alpha$ -медираната CD20-ъпрегулация.<sup>11</sup> В същото време съществуват възможности за възстановяване на експресията на CD20 чрез HDAC-инхибитори (*trichostatin*, *valproic acid*, *rhomidepsine*), деметилиращи агенти (DNMT-инхибиторите *azacitidine*, *decitabine*) и други медикаменти (инхибитори на фарнезил-трансфераза – L-744, 832 или на TGF $\beta$  – LY364947) главно чрез освобождаване на репресията на *MS4A1*-гена.<sup>21</sup>


**Аналитични методи за изследване.** Имунофенотипизацията чрез флоуцитометрия е задължителен компонент в диагностичния процес на ХЛЛ. Флоуцитометрията позволява идентифициране на мембранни епитопи на CD20 и полуколичествено определяне на нивата на експресия на антигена в проби от свеж клиничен материал (най-често периферна кръв) и дефиниране на прагови стойности на средна флуоресцентна интензивност (MFI), брой молекули на еквивалентен разтворим флуорохром (MESF) или количество на свързано антияло/клетка (ABC), които да дискриминират групи пациенти със значими различия в клиничния изход и терапевтичен отговор.<sup>22-24</sup> Към момента са необходими допълнителни проучвания за клинична приложимост. Проведените до момента изследвания показват, че нивата на CD20 mRNA, определени с полимеразна верижна реакция в реално време (Q-RT-PCR), са нормални или близки до нормалните и не корелират добре с експресия на белтъчно ниво, вероятно поради посттранскрипционен дефект при ХЛЛ.<sup>25</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Имунофенотипно изследване с включване на CD20 е задължителен компонент от диагностичния процес на ХЛЛ. Установява-

нето на CD20 е основна предпоставка за включване на анти-CD20-моноклонално антияло към химиотерапевтичния режим, което достоверно подобрява терапевтичния отговор с по-дълга преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП), без допълнителна токсичност. Оценката на степента на експресия чрез определяне на интензитета на имуномаркиране предоставя допълнителна предиктивна информация, но следва да се интерпретира с внимание и на базата на стандартизирани флоуцитометрични подходи.

През последните години са разработени и одобрени за лечение моноклонални антители, насочени срещу антигена. Първото химерно анти-CD20-моноклонално антияло, одобрено за лечение на В-клетъчни злокачествени болести, е *rituximab*, който унищожава В-лимфоидни неоплазии чрез комплемент-зависима цитотоксичност (CDC) и антияло-зависима клетъчна цитотоксичност (ADCC). Следващи поколения анти-CD20-антитела (*ofatumumab*, *ublrituximab*, *obinutuzumab*, *ocaratuzumab*) демонстрират значимо по-висока степен на медирана от макрофаги антияло-зависима фагоцитоза (ADP), която също има съществена роля при ХЛЛ<sup>5</sup>, както и директно подтискане на клетъчния растеж и индуциране на апоптоза, наречени директна клетъчна смърт (DCD)<sup>6</sup>.

Добавяне на *rituximab* към *fludarabine/cyclophosphamide* (R-FC) води до значително подобряване на терапевтичните резултати и постигане на клинично значимо удължаване на ПБП при пациенти с ХЛЛ и схемата R-FC се превръща в “златен” стандарт за лечение.<sup>7,8</sup> Впоследствие са разработени второ и трето поколение антители, в това число *obinutuzumab* и *ofatumumab*, които са одобрени за лечение на пациенти с ХЛЛ. Понастоящем за *velutuzumab*, *ocaratuzumab*, *ublrituximab* и *HuMax-CD20* текат клинични проучвания при ХЛЛ (NCT00546793, NCT00003874, NCT02301156 и NCT00093314).

А	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Имунофенотипно изследване на CD20 се препоръчва като задължителен компонент от диагностичния панел при новодиагностицирани пациенти с хронична лимфоцитна левкемия, както и при рецидив и/или прогресия.</li> <li>■ Препоръчва се установяване на CD20 при хронична лимфоцитна левкемия чрез <math>\geq 4</math>-цветна многопараметърна флоуцитометрия, а в случаи с предимно лимфомна изява – чрез имунохистохимия.</li> <li>■ При установяване на CD20 при хронична лимфоцитна левкемия се препоръчва включване на анти-CD20 моноклонално антитяло към химиотерапевтичния режим.</li> </ul>
В	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Препоръчва се определяне на нивата на експресия на CD20 на базата на средна флуоресцентна интензивност (MFI), брой молекули на еквивалентен разтворим флуорохром (MESF) или количество свързано антитяло/клетка (ABC) само в рамките на клинични проучвания.</li> <li>■ При хронична лимфоцитна левкемия не се препоръчва изследване на нива на CD20 mRNA, определени с полимеразна верижна реакция в реално време (Q-RT-PCR), поради липса на корелация с експресията на белтъчно ниво.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>Диагнозата на хронична лимфоцитна левкемия се основава на интегриран диагностичен подход, включващ морфология на периферна кръв и костен мозък или лимфен възел (в случаи с предимно лимфомна изява) в съчетание с имунофенотипизация.</i></li> <li>■ <i>Диагностиката на хронична лимфоцитна левкемия се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за комуникация между звената, осъществяващи морфологична и имунофенотипна оценка на клиничния материал в сънотставка с основните клинични данни, и годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести годишно през всяко едно от обособените лабораторни направления.</i></li> <li>■ <i>Имунофенотипизацията на левкемии се провежда с многопараметърна флоуцитометрия (не по-малко от 4-цветна) и достатъчно широк панел, който да позволява идентифициране на определените в класификацията на Световната здравна организация (4-та ревизирана версия, 2016) нозологични единици с характеристика на лимфоидни левкемии, включително и хронична лимфоцитна левкемия.</i></li> <li>■ <i>CD20 е задължителен компонент в имунофенотипните панели както към диагноза, така и при рецидив и/или прогресия.</i></li> </ul>



- **Експресията на CD20 може да бъде модулирана (транзиторно подтискане до загуба върху левкемични клетки) в хода на болеста и нейното лечение по различни механизми и това да повлияе на ефективността на лечението.**
- **Пациенти с транзиторно подтискане до загуба на CD20 върху левкемични клетки в хода на болестта и нейното лечение не са показани за анти-CD20-моноклонални антитела. При възможност тези пациенти следва да бъдат включени в клинични проучвания за медикаментозно възстановяване на експресията на CD20.**

## ЛИТЕРАТУРА

1. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 1980; 125 (4): 1678-1685
2. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1988; 85 (1): 208-212
3. Popoff JJ, Savage JA, Blake J, Johnson P, Deans JP. The association between CD20 and Src-family tyrosine kinases requires an additional factor. *Mol Immunol* 1998; 35 (4): 207-214
4. Pavlasova G, Seda V, Borsky M, et al. Microenvironmental Interactions up-Regulate CD20 Expression in CLL B Cells through the CXCR4/SDF-1 Axis: Implications for CD20-Targeting Antibodies and the Use of BCR-Inhibitors in Combination. *Blood* 2015; 126: 4124
5. Church AK, VanDer Meid KR, Baig NA, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody-dependent phagocytosis of chronic lymphocytic leukaemia cells by autologous macrophages. *Clin Exp Immunol* 2016; 183 (1): 90-101
6. Boross P, Leusen JH. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res* 2012; 2 (6): 676-690
7. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. International Group of Investigators. German Chronic Lymphocytic Leukaemia Study Group. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376 (9747): 1164-1174
8. Robak T, Dmoszynska A, Solal-Céligny P, et al. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide prolongs progression-free survival compared with fludarabine and cyclophosphamide alone in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28 (10): 1756-1765
9. Prevodnik VK, Lavrenčak J, Horvat M, Novakovič BJ. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn Pathol* 2011; 6: 33
10. Tefferi A, Bartholmai BJ, Witzig TE, et al. Heterogeneity and clinical relevance of the intensity of CD20 and immunoglobulin light-chain expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1996; 106 (4): 457-461
11. Pavlasova G, Borsky M, Seda V, et al. Ibrutinib inhibits CD20 upregulation on CLL B cells mediated by the CXCR4/SDF-1 axis. *Blood* 2016; 128 (12): 1609-1613
12. Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV, et al. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol* 2008; 141 (1): 36-40
13. Pozzo F, Bittolo T, Arruga F, et al. NOTCH1 mutations associate with low CD20 level in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a NOTCH1 mutation-driven epigenetic dysregulation. *Leukemia* 2016; 30 (1): 182-189

14. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 102 (10): 3514-3520
15. Poirot B, Chedani H, Abbed K, et al. Loss of CD20 expression on CLL cells following treatment with rituximab. *Hématologie* 2010; 16 (1) : 92-95
16. D'Auria F, Guariglia R, Villani O, et al. Modulation of CD20 antigen expression after rituximab treatment: a retrospective study in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Ther* 2010; 32 (11): 1911-1916
17. Beum PV, Peek EM, Lindorfer MA, et al. Loss of CD20 and bound CD20 antibody from opsonized B cells occurs more rapidly because of trogocytosis mediated by Fc receptor-expressing effector cells than direct internalization by the B cells. *J Immunol* 2011; 187 (6): 3438-3447
18. Beum PV, Kennedy AD, Williams ME, et al. The shaving reaction: rituximab/CD20 complexes are removed from mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia cells by THP-1 monocytes. *J Immunol* 2006; 176 (4): 2600-2609
19. Valgardsdottir R, Cattaneo I, Klein C, et al. Human neutrophils mediate trogocytosis rather than phagocytosis of CLL B-cells opsonized with anti-CD20 antibodies. *Blood* 2017. pii: blood-2016-08-735605
20. Lapalombella R, Yu B, Triantafillou G, et al. Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2008; 112 (13): 5180-5189
21. Tomita A. Genetic and epigenetic modulation of CD20 expression in B-cell malignancies: Molecular mechanisms and significance to rituximab resistance. *J Clin Exp Hematop* 2016; 56 (2): 89-99
22. Tembhare PR, Marti G, Wiestner A, et al. Quantification of expression of antigens targeted by antibody-based therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2013; 140 (6): 813-818
23. Wang L, Abbasi F, Gaigal AK, et al. Comparison of fluorescein and phycoerythrin conjugates for quantifying CD20 expression on normal and leukemic B-cells. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70 (6): 410-415
24. Horvat M, Kloboves Prevodnik V, Lavrencak J, Jezersek Novakovic B. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncol Rep* 2010; 24 (4): 1101-1107
25. Sarro SM, Unruh TL, Zuccolo J, et al. Quantification of CD20 mRNA and protein levels in chronic lymphocytic leukemia suggests a post-transcriptional defect. *Leuk Res* 2010; 34 (12): 1670-1673



## 3.2. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ НЕХОДЖКИНОВИ ЛИМФОМИ

### 3.2.1. CD20-експресия при дифузен В-едроклетъчен лимфом

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** Маркерът CD20 е тетра-трансмембарен гликолизиран фосфопротеин и представлява първият антиген, идентифициран в В-клетъчната линия на диференциация. По правило CD20 е силно експресиран от В-клетъчни лимфоцити през тяхното развитие, но отсъства върху хематопоетични стволови клетки, ранни про-В-клетки и плазмодити.<sup>1</sup> Кодира се от *MS4A1*-ген, разположен на 11q12 хромозома.<sup>2</sup> Играе роля в диференциацията, съзряването и активирането на В-клетки. Протеинът няма познат естествен лиганд и функциите му са свързани с осигуряване на оптимален В-клетъчен имунен отговор срещу Т-независими антигени. Молекулата CD20 остава върху мембраната на В-клетки без дисоциация или интернализация при свързване с CD20-антитяло. Предполага се, че играе роля на калциев канал в клетъчната мембрана. Молекулата може да иницира вътреклетъчни сигнали, активирайки каскада на фосфорилиране на вътреклетъчни протеини чрез свързване към тирозинкинази от Src-семейството, като например Lyn, Fyn и Lck.<sup>3</sup> Има данни за роля на CD20 при взаимодействие на В-клетки с микросредата. Експресията му се регулира от хемокинови сигнали чрез оста CXCR4/SDF1 и може да бъде нарушена от медикаменти, които се намесват във взаимодействия с микросредата.<sup>4</sup>

Експресия на CD20 се установява в широк спектър от неходжкинови лимфоми, в това число – дифузен В-едроклетъчен лимфом (ДВЕЛ). През последните години са разработени и одобрени за лечение моноклонални антитела, насочени срещу анти-

гена. Първо химерно анти-CD20-моноклонално антитяло, одобрено за лечение на В-клетъчни злокачествени болести, е *rituximab*, който унищожава В-лимфоидни неоплазии чрез комплемент-зависима цитотоксичност (CDC) и антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност (ADCC). Добавянето на *rituximab* (R) към *cyclophosphamide*, *doxorubicine*, *vincristine*, *prednisone* (CHOP) води до значително подобряване на терапевтичните резултати при пациенти с ДВЕЛ и схемата R-CHOP се превръща в “златен” стандарт за лечение.<sup>5</sup> Впоследствие са разработени второ и трето поколение антитела (*obinutuzumab*, *ibritumomab tiuxetan*, *tositumomab*, *ofatumumab*, *veltuzumab*), за които текат клинични проучвания (NCT00517530, NCT00440583, NCT00110071, NCT01481272, NCT01101581). Свързването на анти-CD20-моноклоналните антитела индуцира спиране на клетъчния цикъл, блок в диференциация или В-клетъчна активация чрез фосфорилиране на CD20, локализация на липидните рафтове и индуциране на вътреклетъчен инфлуks на калций според използваното антитяло.

Почти всички В-клетъчни лимфоми са CD20-положителни, но експресията може да варира както между различни В-клетъчни неоплазии, така и между отделни субтипове или пациенти. По правило CD20-отрицателните лимфоми съставляват около 1-2%. Като цяло, CD20-отрицателните ДВЕЛ показват тенденция за екстранодално засягане, агресивен клиничен ход, резистентност към конвенционална химиотерапия и неблагоприятна прогноза; използване на анти-CD20-моноклонални антитела не би било от полза в тези случаи. Най-чести CD20-отрицателни варианти включват плазмобластен лимфом, първичен ефузионен лимфом, дифузен В-едроклетъчен лимфом на базата Human herpes virus 8 (HHV-8-асоцирана мултицентрична болест на *Castleman*), анапластен ALK-положителен ДВЕЛ. Повечето от наличните данни за CD20-отрицателни ДВЕЛ се състоят от клинични случаи и малки ретроспективни серии, което не по-

волява формулиране на стандарти за поведение.<sup>6</sup> В допълнение, нивата на CD20-експресията варират в широк диапазон при различни пациенти. Клиничните резултати са достоверно по-лоши при ниска интензивност на маркиране на CD20, независимо от метода – имунохистохимия (ИХХ) или флоуцитометрия (ФЦМ).<sup>7,8</sup> Налице са данни за ниска експресия на CD20 при т.нар. double-hit лимфоми, отличаващи се с агресивен клиничен ход и лоши терапевтични резултати.<sup>9</sup> Съществуват съобщения за ДВЕЛ, които показват специфичен CD20-положителен фенотип чрез имунохистохимия, но са отрицателни при флоуцитометрично изследване (ИНС+/FCM-) и се отличават с почти десет пъти по-ниска експресия на CD20-информационна РНК в сравнение с CD20 ИХХ+/ФЦМ+ контролни клетки. Данните за прогнозата при тази категория остават противоречиви.<sup>10,11</sup>

Експресията може да бъде модулирана в хода на лечението на лимфома по различни механизми и това да повлияе на ефективността му. Добре познат феномен е подтискане на CD20-експресия след лечение с *rituximab* в 37-60% от пациентите. Вероятните механизми включват епигенетично подтискане на експресията на *MS4A1*-гена, интернализация на CD20-молекулата, селекция на CD20-отрицателен клон, трогоцитоза (т.нар. окосяване) от клетъчната повърхност на комплекса CD20/*rituximab* от моноцити. Съществуват данни за намалена експресия и след прилагане на други медикаменти, напр. след лечение с *ibrutinib* в резултат на инхибиране на фактори, свързани с NFκB и критични за експресия на CD20, прилагане на *lenalidomide*, който може да доведе до интернализация на молекулата, или прилагане на *bortezomib*, в резултат на което настъпва протеинова деградация. Описани са мутации в *MS4A1*- и *NOTCH1*-гена, които са свързани с намалена експресия или конформационни промени, обуславящи резистентност към терапията с анти-CD20-антитела. В същото време съществуват възмож-

ности за възстановяване на експресията на CD20 чрез HDAC-инхибитори (*trichostatin, valproic acid, rhomidepsine*), деметиларащи агенти (DNMT-инхибитори – *azacitidine, decitabine*) и други медикаменти (инхибитори на фарнезил-трансфераза – L-744, 832 или на TGFβ – Y364947) главно чрез освобождаване на репресията на *MS4A1*-гена.<sup>12</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Имунохистохимичното изследване на имунофенотипа, включително и на CD20, е задължителен компонент в диагностичния процес на ДВЕЛ. Методът е широко достъпен, относително евтин, позволява маркиране на архивни проби. Най-често се използва клон L26 на CD20-моноклонално антитяло, който разпознава интрацелуларен епитоп и се отличава с висока специфичност при изследване на биопсични материали, фиксирани във формалин и включени в парафин. *Mason D, et al.* препоръчват в резултата от изследването да бъде отбелязвано CD20-положителен, независимо от интензитета, поради относително ниска разделителна способност на ИХХ.<sup>13</sup> Прилагането на дигитализирано заснемане на ИХХ-препарати и софтуерна обработка дава възможност за полуколичествена оценка на интензитета.<sup>14</sup>

Флоуцитометрията позволява идентифициране на мембранни епитопи на CD20 и полуколичествено определяне на нива на експресия на антигена в проби от свежа тъкан. Методът дава възможност за дефиниране на прагови стойности на средна флуоресцентна интензивност (MFI) или брой молекули на еквивалентен разтворим флуорохром (MESF), които да дискриминират групи пациенти със значими различия в клиничен изход и терапевтичен отговор.<sup>15,16</sup> Според някои автори ФЦМ е по-чувствителна при идентифициране на CD20, но методът има сериозни недостатъци – изисква свеж материал, какъвто рядко е на разположение към момента на диагноза, необходимо е специализирано оборудване и е с по-висока цена.

**Доказателства за предиктивно значение.** Имунофенотипното изследване на CD20 е задължителен компонент от диагностичния процес на ДВЕЛ. Установяването му е основна предпоставка за включване на анти-CD20-моноклонално антитяло (*rituximab*) към химиотерапевтичния режим, което достоверно подобрява терапевтичния отговор с по-дълга преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП) без допълнителна токсичност.<sup>17</sup> Идентифицирането на CD20-отрицателни ДВЕЛ при първоначална диагноза и при рецидив изисква внимателна интерпретация и оценка на качеството на имуномаркиране. За потвърждаване на В-клетъчна линия на диференциация се използват други В-клетъчни маркери, вкл. PAX-5, CD79a и CD22. Използването на вътрешни и/или външни контроли е задължително. Към момента няма установени стандарти за лечение на тази група пациен-

ти. Новите средства, насочени към В-клетъчни сигнални пътища, например, инхибитори на *Bruton* тирозинкиназа (ВТК) и фосфатидилинозитол-3 киназа (PI3K), имат потенциал за ефективна терапия. От друга страна, PD-1-антитела и Bcl-2-инхибитори също могат да бъдат терапевтични опции, които следва да бъдат проучени.

Оценката на степента на експресия чрез интензитет на имуномаркиране предоставя допълнителна предиктивна информация, но следва да се интерпретира с внимание на база на стандартизирани флуоцитометрични подходи или чрез използване на стандартизирана ИХХ с автоматизирани системи, дигитализирана микроскопия и софтуерен анализ на образи за полуколичествена оценка.

<p><b>A</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Имунофенотипното изследване на CD20 се препоръчва като задължителен компонент от диагностичния панел при дифузен В-едроклетъчен лимфом както при новодиагностицирани пациенти, така и при рецидив и/или прогресия.</li> <li>■ Препоръчва се установяване на CD20 при дифузен В-едроклетъчен лимфом чрез имунохистохимия и само в редки случаи с левкемична изява – чрез многопараметърна флуоцитометрия.</li> <li>■ При установяване на CD20 при дифузен В-едроклетъчен лимфом се препоръчва включване на анти-CD20-моноклонално антитяло към химиотерапевтичния режим.</li> </ul>
<p><b>B</b></p>	<p>При дифузен В-едроклетъчен лимфом определянето на нивата на експресия на CD20 на базата на дигитализирано заснемане на имунохистохимични препарати и софтуерна обработка или флуоцитометрично чрез средна флуоресцентна интензивност (MFI) или брой молекули на еквивалентен разтворим флуорохром (MESF) се препоръчва само в рамките на клинични проучвания.</p>



- При всички пациенти със съмнение за лимфом и/или рецидив задължително се прилага интегриран диагностичен подход, включващ репрезентативна биопсия от лимфен възел (или друга тъкан) в съчетание с имунофенотипизация.
- Необходимо е прилагане на достатъчно широк панел, който да позволява идентифициране на определените в класификацията на Световната здравна организация (4-та ревизирана версия, 2016) лимфони като обособени нозологични единици, вкл. дифузен В-едроклетъчен лимфом.
- Окончателната диагностика на лимфомите, вкл. на дифузен В-едроклетъчен лимфом, се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за интегриране на морфологична и имунофенотипна оценка на клиничния материал (в съпоставка с основни клинични данни) и годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести.
- При клинични съмнения за рецидиви и/или положителни ПЕТ/КТ-данни при оценка на терапевтичния отговор следва при възможност да се осъществи повторна биопсия с имунохистосимия.
- Пациенти с транзиторно подтискане до загуба на CD20 върху лимфомни клетки в хода на болестта и нейното лечение не са показани за анти-CD20-моноклонални антитела. При възможност следва да бъдат включени в клинични проучвания за медикаментозно възстановяване на експресията на CD20.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *Journal of Immunology* 1980; 125 (4):1678-1685
2. Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF, Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1988; 85 (1): 208-212
3. Popoff IJ, Savage JA, Blake J, et al. The association between CD20 and Src-family Tyrosine kinases requires an additional factor. *Mol Immunol* 1998; 35 (4): 207-214
4. Pavlasova G, Borsky M, Seda V, et al. Ibrutinib inhibits CD20 up-regulation on CLL B cells mediated by the CXCR4/SDF-1 axis. *Blood* 2016; 128: 1609-1613
5. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003; 63 (8): 803-843
6. Castillo JJ, Chavez JC, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Montes-Moreno S. CD20-negative diffuse large B-cell lymphomas: biology and emerging therapeutic options. *Expert Rev Hematol*. 2015; 8(3):343-54; Tasleem K, Delong L. Diagnosis and treatment of CD20 negative B cell lymphomas. *Biomarker Research* 2017; 5: 5
7. Choi CH, Park YH, Lim JH, et al. Prognostic implication of semi-quantitative immunohistochemical assessment of CD20 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *J Pathol Transl Med* 2016; 50 (2): 96-103
8. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* 2009; 113 (16): 3773-3780

9. Wu D, Wood BL, Dorer R, Fromm JR. "Double-Hit" mature B-cell lymphomas show a common immunophenotype by flow cytometry that includes decreased CD20 expression. *Am J Clin Pathol* 2010;134 (2): 258-265
10. Tokunaga T, Tomita A, Sugimoto K, et al. De novo diffuse large B-cell lymphoma with a CD20 immunohistochemistry-positive and flow cytometry-negative phenotype: molecular mechanisms and correlation with rituximab sensitivity. *Cancer Sci* 2014; 105: 35-43
11. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* 2009; 113: 3773-3780
12. Tomita A. Genetic and epigenetic modulation of CD20 expression in B-cell malignancies: Molecular mechanisms and significance to rituximab resistance. *J Clin Exp Hematop* 2016; 56 (2): 89-99
13. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, et al. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Pathol* 1990; 136 (6): 1215-1222
14. Choi CH, Park YH, Lim JH, et al. Prognostic Implication of semi-quantitative immunohistochemical assessment of CD20 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *J Pathol Transl Med* 2016; 50 (2): 96-103
15. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood* 2009; 113 (16): 3773-3780
16. Horvat M, Kloboves Prevodnik V, Lavrencak J, Jezersek Novakovic B. Predictive significance of the cut-off value of CD20 expression in patients with B-cell lymphoma. *Oncol Rep* 2010; 24 (4): 1101-1107
17. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346 (4): 235-242

### 3.2.2. Клетъчен произход при дифузен В-едроклетъчен лимфом

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** Дифузният В-едроклетъчен лимфом (ДВЕЛ) е най-честа форма на лимфом в западния свят и съставлява 25-35% от неходжкиновите лимфоми при възрастни.<sup>1</sup> Болестта показва значителна морфологична, клинична и молекулярна хетерогенност. Чрез прилагане на генно експресионно профилиране (GEP) са идентифицирани най-малко два основни молекулярни субтипа с различен клетъчен произход: субтип с GEP, съответстващ на В-клетки на герминативния център (GCB), и субтип с GEP, съответстващ на активирани В-клетки (ABC). Около 10-15% от случаите не могат да бъдат класифицирани по общоутвърдени критерии и остават като *неспецифицирани по друг начин* (NOS).<sup>2-7</sup> От генетична гледна точка обособените по генно-експресионен профил субтипове се различават по активация на различни молекулярни пътища, профили на генетични аберации и соматични мутации. Например случаи с GCB ДВЕЛ се характеризират с активация на PI3K-пътя и свръхекспресия на bcl6, докато при ABC ДВЕЛ е налице конститутивна активация на NFκB, която настъпва по различни механизми, в това число и активация на сигналния път на В-клетъчния рецептор (BCR). Влиянието на тези различия върху клиничния изход се потвърждава в редица проучвания<sup>8</sup>, голяма част от които демонстрират по-неблагоприятна прогноза при ABC ДВЕЛ в сравнение с GCB-субтип, независимо от включване на *rituximab* в терапевтичните схеми. С разработване на нови терапевтични подходи значимостта на разграничаване на субтиповете според *клетъчен произход* нараства и последната ревизирана версия на Класификацията на хематологични неоплазии на Световната здравна организация (2016) изисква в клиничната практика дефиниране на специфичен субтип според *кле-*

*тъчен произход*. Съотношението между честотата на GCB/ABC-типове показва вариации според географски фактори, средна възраст и използвана методология, но обичайно е около 60%/40%, като честотата на GCB-субтип е по-ниска в Азия.<sup>9</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Основополагащите проучвания използват изследване на генно-експресионни профили с висока производителност (high-throughput GEP), което не е приложимо в рутинната лабораторно-диагностична практика по няколко причини: достъпност на технология, необходимост от свеж материал от туморна тъкан, цена и др. Понастоящем практическо дефиниране на специфичен субтип ДВЕЛ според *клетъчен произход* може да се осъществи по два основни подхода: чрез имунохистохимично (ИХХ) маркиране на клетъчни маркери в определен алгоритъм или чрез GEP (високопроизводителен или нископроизводителен) на материали от туморни тъкани, фиксирани във формалин и включени в парафин (FFPE).

За осъществяване на генно-експресионно профилиране се използва РНК, изолирана от FFPE-туморна тъкан. Проучени са както техники с висока<sup>10,11</sup>, така и с ниска производителност<sup>12-18</sup>. Приложимостта и на двата подхода е потвърдена от метаанализ на ретроспективни проучвания. В ход са две фази III клинични проучвания, в които се определя *клетъчен произход* посредством две платформи за GEP на FFPE-проби: REMoDL-V (NCT01324596), в което се използва платформа Illumina DASL (Illumina Inc., San Diego, CA) и ROBUST (NCT02285062), в което се прилага платформа Lymph2Cx, базирана на Nanostring nCounter (NanoString Technologies, Seattle, USA).<sup>19</sup> Като предимство на технологията може да се приеме и възможността за използване на комерсиални чипове, с което се осигурява точност на резултатите. Проблем представлява качеството на РНК, изолирана от FFPE-биопсични материали, но основно ограничение на GEP ос-

тава достъпността на технологията, която към момента е приложима предимно във високоспециализирани лаборатории. Проучена е възпроизводимост на изследванията чрез Nanostring-based Lymph2Cx assay с добри резултати както при последователни изследвания от няколко проби от един биопсичен материал, така и по отношение на междулабораторна възпроизводимост.<sup>18, 20</sup>

В опит да се транслират резултати от GEP-субкласифициране в широкодостъпен подход, проложим в рутинната лабораторно-диагностична практика, са разработени няколко алгоритъма на изследване на панели от ИХХ-маркирани клетъчни антигени на материали от FFPE-туморни тъкани. По-голямата част от алгоритмите са бинарни класификатори, т.е. предиктори от втори клас (Табл. 1). Основните предимства на ИХХ-алгоритми са свързани с широка достъпност и приложимост на метода, който позволява задоволителна възпроизводимост в рамките на отделен клиничен център. Подходът обаче страда от сериозни недостатъци, свързани с незадоволителна корелация между различните алгоритми, и с ниска степен на междулабораторна възпроизводимост, потвърдена и от рандомизирано клинично проучване, и от метаанализ.<sup>29-33</sup> Сравнителният анализ на ИХХ-алгоритъм на *Hans* върху FFPE-проби и транскриптомният алгоритъм на *Wright* върху замразени проби, включени в клинично проучване LYSA LNH03-6B с пациенти, лекувани с R-СНОР, показва висока степен на корелация между двата подхода (91%) и почти перфектна конкордантност според kappa test (0.81).<sup>34</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Клиничната интерпретация е пряко зависима от начина на формулиране на заключението от лабораторното изследване. В тази насока ИХХ-алгоритми имат ясни предимства – резултатите са стандартизирани

в значителна степен, ясно са определени алгоритмите и праговете стойности за всеки един от маркерите. Все още няма стандартизирана система за интерпретация и изготвяне на резултат от GEP-изследвания.

Клинични проучвания демонстрират значима и независима прогностична стойност на определянето на *клетъчен произход* при ДВЕЛ. Пациенти с GCB-фенотип имат висока обща преживяемост (ОП) в сравнение със случаи с ABC-фенотип, независимо от методологичния подход – GEP или ИХХ. Експерти дават предимство на GEP-подходи поради изложените по-горе предимства. От друга страна, едно фаза III проспективно проучване (LYSA LNH03-6B) демонстрира ИХХ-изследване при възрастни, лекувани с R-СНОР, като полезно средство за предсказване на прогноза, когато се извършва под оптимизирани стандартизирани условия. Допълнително изследване на Bcl2-експресия може да помогне за идентифициране на пациенти, изложени на риск от рецидив, които потенциално биха могли да отговорят на анти-Bcl2-терапии.<sup>33-35</sup>

Клинични проучвания доказват определянето на *клетъчен произход* като предиктивен фактор при избор на лечение. Ретроспективно проучване от Датския лимфобен регистър върху всички 245 млади пациенти с ДВЕЛ с висок риск, лекувани между 2004-2012 г., демонстрира, че лечение с R-СНОЕР дава значимо по-добри резултати за преживяемост без прогресия (ПБП) и ОП в сравнение с GCB-фенотип, а ОП е по-добра в сравнение с пациенти с не-GCB-фенотип; това не се наблюдава при болни, лекувани с R-СНОР. Ако резултатите бъдат потвърдени и в други проучвания, прилагането на R-СНОЕР следва да бъде ограничено до пациенти с GCB-фенотип.<sup>36</sup> Определянето на *клетъчен произход* е съществено при оценка на медикаменти, действието на които ангажира различни молекулярни механизми при GCB- и ABC-субтипа. Няколко фаза

I/II проучвания демонстрират предимства на добавянето на *bortezomib*, *lenalidomide* и *ibrutinib* към R-CHOP избирателно в ABC/не-GCB субтипа (NCT00057902, NCT01040871, Nowakowski, Leukemia 2011, NCT00849654, NCT01325701 и др.). По тези причини ревизираната Класификация на хемоетични и лимфоидни неоплазии на

Световната здравна организация (2016) изисква отграничаване на GCB-срещу ABC/не-GCB-субтип при всеки ДВЕЛ към време на диагноза. Ако GEP-технологията не е достъпна, ИХХ се приема за приемлива алтернатива, като използваният алгоритъм следва да бъде конкретно упоменат.<sup>37</sup>

А	<p>При всички новодиагностицирани пациенти с дифузен В-едроклетъчен лимфом се препоръчва към диагнозата определяне на <i>клетъчен произход</i> – GCB или ABC/non-GCB.</p>
В	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ За определяне на <i>клетъчен произход</i> GCB или ABC/non-GCB при дифузен В-едроклетъчен лимфом се препоръчва изследване на генно-експресионен профил (GEP). При липса на достъп до GEP имунохистохимичният подход се приема за задоволителна алтернатива. Препоръчва се резултатът задължително да съдържа информация за използван метод и конкретно използван алгоритъм.</li> <li>■ Определяне на <i>клетъчен произход</i> при всички пациенти с дифузен В-едроклетъчен лимфом се препоръчва за оценка на прогноза и избор на лечение с по-висока терапевтична полза според дефинирания подтип: (i) R-CHOEP при GCB-субтип, (ii) добавяне на <i>bortezomib</i>, <i>lenalidomide</i> и <i>ibrutinib</i> към R-CHOP при ABC/non-GCB субтип.</li> </ul>


	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ При всички пациенти със съмнение за лимфом и/или рецидив задължително се прилага интегриран диагностичен подход, включващ репрезентативна биопсия от лимфен възел (или друга тъкан) в съчетание с имунофенотипизация.</li> <li>■ Необходимо е прилагане на достатъчно широк панел, който да позволява идентифициране на определените в класификацията на Световната здравна организация (4-та ревизирана версия, 2016) лимфому като обособени нозологични единици, вкл. субтипове дифузен В-едроклетъчен лимфом в зависимост от “клетъчен произход”.</li> <li>■ Окончателната диагностика на лимфомите, вкл. определяне на “клетъчен произход” при дифузен В-едроклетъчен лимфом, се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за интегриране на морфологична и имунофенотипна оценка на клиничния материал (в съпоставка с основни клинични данни) и годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести.</li> </ul>
---	---



Таблица 1. Алгоритми за имунохистохимични панели за определяне на “клетъчен произход”.

Автор	Имунохистохимично определени антигени
Алгоритъм на <i>Colomo et al.</i> <sup>21</sup>	MUM1/IRF4, CD10, BCL6
Алгоритъм на <i>Muris et al.</i> <sup>22</sup>	CD10, MUM1/IRF4 + BCL2
Алгоритъм на <i>Nyman et al.</i> <sup>23</sup>	CD10, BCL6, MUM1
Алгоритъм на <i>Meyer (или “Tally”) et al.</i> <sup>24</sup>	CD10, GCET1, MUM1/IRF4, FOXP1, LMO2
Алгоритъм на <i>Hans et al.</i> <sup>25</sup>	CD10, BCL6, MUM1
Алгоритъм на <i>Choi et al.</i> <sup>26</sup>	GCET1, MUM1, CD10, BCL6, FOXP1
Алгоритъм на <i>Natkunam et al.</i> <sup>27</sup>	LMO2
Алгоритъм на <i>Visco et al.</i> <sup>28</sup>	CD10, FOXP1, BCL6

## ЛИТЕРАТУРА

- Stein H, Warnke R, Chan WC et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In SH Swerdlow, E Campo, NL Harris et al. (eds), WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC 2008; 233-237
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503-511
- Monti S, Savage KJ, Kutok JL, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005; 105: 1851-1861
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68-74
- Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008; 359: 2313-2323
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-1947
- Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9991-9996

8. Balagué O, Campo E. Refining The Prognostic Impact of the Cell Of Origin in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Ann Oncol* mdx133. Available at: [https:// doi.org/ 10.1093/annonc/mdx133](https://doi.org/10.1093/annonc/mdx133)
9. Stein H, Gascoyne R, Chan WC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In SH Swerdlow, E Campo, NL Harris et al. (eds), WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC 2016 [in press]
10. Barrans SL, Crouch S, Care MA, et al. Whole genome expression profiling based on paraffin embedded tissue can be used to classify diffuse large B-cell lymphoma and predict clinical outcome. *Br J Haematol* 2012; 159: 441-453
11. Williams PM, Li R, Johnson NA, et al. A novel method of amplification of FFPET- derived RNA enables accurate disease classification with microarrays. *J Mol Diagn* 2010; 12: 680-686
12. Collie AM, Nölling J, Divakar KM, et al. Molecular subtype classification of formalin- fixed, paraffin- embedded diffuse large B-cell lymphoma samples on the ICEPlexVR system. *Br J Haematol* 2014; 167: 281-285
13. Masqué-Soler N, Szczepanowski M, Kohler CW, et al. Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. *Blood* 2013; 122: 1985-1986
14. Roberts RA, Sabalos CM, LeBlanc ML, et al. Quantitative nuclease protection assay in paraffin-embedded tissue replicates prognostic microarray gene expression in diffuse large-B-cell lymphoma. *Lab Invest* 2007; 87: 979-997
15. Scott DW, Wright GW, Williams PM, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 2014; 123: 1214-1217
16. Veldman-Jones MH, Lai Z, Wappett M, et al. Reproducible, quantitative, and flexible molecular subtyping of clinical DLBCL samples using the NanoString nCounter System. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2367-2378
17. Xue X, Zeng N, Gao Z, Du MQ. Diffuse large B-cell lymphoma: sub-classification by massive parallel quantitative RT-PCR. *Lab Invest* 2015; 95: 113-120
18. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, et al. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2848-2856
19. Scott DW. Cell-of-origin in diffuse large B-cell lymphoma: are the assays ready for the clinic? *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015; 35: e458-e466
20. Scott DW, Wright GW, Williams PM, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 2014; 123: 1214-1217
21. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101: 78-84
22. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 2006; 208: 714-723
23. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 2007; 109: 4930-4935
24. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol* 2011; 29: 200-207
25. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275-282

26. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5494-5502
27. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 447-454
28. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia* 2012; 26: 2103-2113
29. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications – a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 2007; 25: 805-812
30. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 6686-6695
31. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117: 4836-4843
32. Ott G, Ziepert M, Klapper W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood* 2010; 116: 4916-4925
33. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, et al. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14: 460-467
34. Petrella T, Copie-Bergman C, Brière J, et al. BCL2 expression but not MYC and BCL2 coexpression predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma independently of cell of origin in the phase 3 LNH03-6B trial. *Ann Oncol* 2017. doi: 10.1093/annonc/mdx022
35. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol* 2011; 29 (31): 4079-4087
36. Gang AO, Pedersen MØ, Knudsen H, et al. Cell of origin predicts outcome to treatment with etoposide-containing chemotherapy in young patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2015; 56 (7): 2039-2046
37. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391-2405

### 3.2.3. *ALK1*-аберации при едроклетъчни лимфоми

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** Киназата на анапластичния лимфом (anaplastic lymphoma kinase, ALK) е известна като ALK-рецепторна тирозинкиназа и е определена като CD246 в клъстерите на диференциация. Кодира се от *ALK*-гена, разположен на късо (p) рамо на 2-ра хромозома в позиция 2p23.2-p23.1. Притежава екстрацелуларен домейн, един трансмембранен домейн и вътреклетъчен домейн с тирозинкиназна активност.<sup>1</sup> Част е от семейството на протеини, наречени рецепторни тирозинкинази (ТКРи), които предават сигнали от клетъчната повърхност към клетката чрез сигнална трансдукция. При стимулация на киназата върху клетъчната повърхност настъпва димеризация и активация чрез процес на фосфорилиране. Следва поредица от прехвърляне на фосфатна група на друг следващ интрацитоплазмен протеин с последваща активация на определен сигнален път. Сигналната трансдукция е ключов механизъм при редица клетъчни процеси, вкл. клетъчен растеж и пролиферация или съзряване и диференциация. Нормално ALK е експресиран само в нервната система (таламус, хипоталамус, среден мозък, *bulbus olfactorius* и др.) и играе роля в развитието и диференциацията на невроните.<sup>2</sup>

Различни механизми могат да доведат до абнормно активиране на киназата и конститутивно фосфорилиране на последващите компоненти от сигналната верига, вкл. мисенс-мутации, гenna амплификация и хромозомни транслокации. Най-често абнормната експресия на ALK в лимфомни клетки е резултат от хромозомни транслокации, които водят до образуване на онкогенни ALK-съдържащи фузионни протеини.<sup>3</sup> Възщност *ALK* е идентифициран за първи път през 1994 г. в резултат на установяване на

фузията му с най-честия партниращ ген – нуклеофосмин 1 (NPM1):NPM1-ALK – при анапластен едроклетъчен лимфом (ALCL) в резултат на t(2; 5) (p23; q25).<sup>4,5</sup> Към настоящия момент са известни около 15 различни транслокации, в които участва *ALK*-генът, част от които са доказани при едроклетъчни лимфоми (Табл. 1). *ALK*-транслокациите водят до активиране на каталитичния домейн и обуславят онкогенни свойства на ALK-протеина чрез самоасоциране и образуване на хомодимери. На свой ред, активирането на *ALK*-каталитичния домейн води до активиране на многобройни сигнални каскади, като RAS-ERK, JAK-STAT и PI3K-AKT-mTOR.<sup>6,7</sup>

*ALK*-генът може да е обект и на мутации. Настъпването на “gain-of-function” точкови мутации е критично за активиране на киназния домейн и може да бъде причина за вторична лекарствена резистентност. Мутации рядко настъпват преди формиране на NPM-ALK при пациенти с анапластен едроклетъчен лимфом. Те водят до заместване на единични аминокиселини или по-сложни структурни преустройства на NPM-ALK-киназата. Все още не е известно дали тези субклонални мутации съжителстват с “дивия” тип (WT) алел в едни и същи клетки, дали подлежат на експанзия, или на загуба в резултат на естествен подбор. Идентифицирането и характеризирането им вероятно би могло да е полезно за определяне на най-подходяща терапия за отделен пациент и предотвратяване на ненужно свръхлечение или настъпване на рецидив.<sup>8</sup>

Все още не е ясно дали завишеният брой копия на *ALK*-гена може да допринесе за туморна патогенеза, макар че има отделни съобщения за амплификация на абнормни форми на *ALK* при солидни тумори, най-често в съчетание с амплификация на *MYCN* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*). Приема се, че *ALK*-амплификациите (без наличие на мутации или формиране на фузионни

гени) нямат съществена роля в туморната патогенеза и по този начин не представляват добра мишена за приложение на ALK-инхибитори.<sup>9</sup>

Проучвания със сравнителна геномна хибридизация (CGH) показват, че случаи с ALK+ ALCL носят вторичен хромозомен дисбаланс със загуба на генетичен материал в хромозома 4, 4q13-q21 и 11q14 или допълнителен генетичен материал върху хромозома 7, 17q24 и 17p, независимо от вида на транслокация.<sup>10</sup> В допълнение, изследванията показват съществени различия във вторичните генетични изменения при ALK-положителни и отрицателни ALCL в подкрепа на концепцията, че те представляват различни биологично обусловени нозологични единици. Генно-експресионното профилиране, от една страна, ясно отграничава ALCL от останалите периферни Т-клетъчни лимфоми, но от друга, идентифицира различни молекули профили при ALK-положителни в сравнение с отрицателни случаи, най-често по отношение на гени от ALK-сигналния път.<sup>11</sup> При ALK+ ALCL най-често свръхекспресирани гени са *BCL6*, *PTPN12*, *SEPRIN1* и *CEBPB*, регулатори на STAT3 (IL-6, IL31RA), цитотоксични и Th17-асоциирани молекули.<sup>12</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Транслокации с участието на *ALK*-гена водят до повишена регулация и абнормно повишена експресия на ALK-протеин, като на субклетъчно ниво разпределението на имунохистохимичното (ИХХ) оцветяване варира според генетичното преустройство. ALK-експресия отсъства от всички нормални постнатални човешки тъкани, с изключение на отделни мозъчните клетки.<sup>13</sup> По тази причина ИХХ-изследване с анти-ALK-специфични моноклонални антитела измества молекулните тестове за диагноза на ALK+ ALCL. В повечето от случаите с t(2;5)/NPM-ALK ALK-оцветяването на неопластични клетки е както ядрено, така и цитоплазмено

в резултат на транспортиране на фузионния протеин NPM-ALK в ядрото чрез образуване на хетеродимери между “дивия” тип NPM и NPM-ALK.<sup>14, 15</sup> Дребноклетъчният морфологичен вариант се характеризира с ограничено ядрено ALK-имуномаркиране.<sup>16</sup> В случаи с вариантни транслокации, при които партниращия на *ALK* ген е различен от *NPM*, оцветяването на ALK обикновено е цитоплазмено и рядко – мембранно.<sup>17</sup> Комбинираното ИХХ-изследване с анти-NPM-моноклонално антитяло е в състояние да предостави допълнителна информация за вида на транслокация. Случаи с t(2;5)/NPM-ALK показват абнормно цитоплазмено имуномаркиране за NPM, докато при ALK+ ALCL с вариантни транслокации се установява очаквана ядрена експресия на NPM.<sup>18</sup> Съществува рядък дифузен едроклетъчен В-клетъчен лимфом с имунобластна/плазмобластна морфология, който експресира ALK-протеин и се характеризира често с интрасинусоидална локализация в лимфните възли, поради което може да наподобява ALK+ ALCL. Тези ALK+ едроклетъчни В-клетъчни лимфоми експресират ЕМА (епителен мембранен антиген) и транскрипционни фактори BOB1 и OCT2, но са отрицателни за класически В-клетъчни маркери (CD20, CD79a, PAX5) и за CD30, като в повечето случаи ALK-имуномаркирането е с характерна гранулирана цитоплазмена характеристика.<sup>19, 20</sup> В случаите, при които ИХХ-изследване е положително за ALK1-протеин, не е необходимо провеждане на FISH или кариотипизация. Молекулярно изследване на фузионни гени с RT-PCR се провежда за оценка на минимална резидуална болест в кръв или костен мозък, най-често при деца.<sup>21</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Имунофенотипното изследване на ALK1 чрез ИХХ е задължителен компонент от диагностичния процес на CD30+ едроклетъчни лимфоми. Установяването му е база за формулиране на окончателната диагноза в съответствие с критериите на WHO класификацията на хемопоеични и лимфоидни не-

оплазии и отидиференциране от другите субтипове периферни Т-клетъчни лимфоми и дифузен В-едроклътъчен лимфом. По правило ALK+ анапластен едроклетъчен лимфом се характеризира с по-благоприятна прогноза в сравнение с останалите периферни Т-клетъчни лимфоми. Диагностицирането на нозологичната категория е предпоставка за лечение в по-малък обем и интензивност. При пациенти под 60-годишна възраст с ALK+ ALCL и нисък/нисък-междинен риск според международния прогностичен индекс (IPI) петгодишната преживяемост без рецидив (ПБР) е 60-80%<sup>22</sup> и не е необходима консолидация с автоложна трансплантация на хемопоеитични стволови клетки. В допълнение, прилагането на редуциран брой (3 броя срещу  $\geq 6$ ) курсове химиотерапия, последвани от локално лъчелечение, дава добри резултати при пациенти с локализиран стадий I.<sup>23</sup>

Назависимо от добрите терапевтични резултати с конвенционална химиотерапия, ALK е добър кандидат за прилагане на таргетно лечение. През последните години са разработени няколко ALK-инхибитора. Липсата на широко разпространена експресия на протеина в нормални тъкани предполага ниска честота на токсични ефекти от блокиране на ALK-функцията.<sup>24</sup> Потенциалните стратегии, насочени към ALK, включват имунотерапия, генно заглушаване, инхибиране на сигнални пътища по веригата и директно инхибиране на каталитичната активност чрез инхибиторни малки молекули.<sup>25</sup> Няколко ALK-инхибитора са показали активност върху NPM1-ALK и EML4-ALK-кле-

тъчни линии в предклинични проучвания.<sup>26</sup> В ход са няколко клинични проучвания (NCT01524926, NCT01449461, NCT02419287, NCT01606878). До момента са публикувани резултати от фаза I отворено проучване за увеличаване на дозата на *crizotinib* в педиатрична популация с различни рецидивиращи тумори, асоциирани с ALK-промени, вкл. девет случая на ALK+ ALCL; постигната е 88% обща степен на терапевтичен отговор (COO), вкл. пълни ремисии (CR) при 7 пациенти, частичен отговор (PR) – при един и стабилна болест (SD) – при един, останал на терапия за повече от 30 курса.<sup>27</sup>

Молекулата *ceritinib* е нов селективен ALK-инхибитор, който индуцира пълна туморна регресия на резистентни на *crizotinib* модели на ALK+ ALCL.<sup>28</sup> Проведено е фаза I проучване (NCT01283516) за повишаване на дозата на *ceritinib* при пациенти с напреднали или метастатични ALK+ тумори, вкл. три случая с ALK+ ALCL<sup>29</sup>; при двама е постигнат пълнен отговор, а при един – частичен отговор с максимално намаляване на тумора с 94.8% спрямо изходното ниво. Продължителността на отговор варира от  $\geq 20$  до  $\geq 26$  месеца.<sup>30</sup> В ход са две проспективни клинични проучвания за оценка на активността на *ceritinib* при хематологични неоплазии, вкл. ALCL (NCT02343679 и CLDK378A2407).

Налице са експериментални данни, които показват, че ALK-инхибиторите могат да бъдат ефективни също и при ALK+ дифузни В-едроклътъчни лимфоми.<sup>31, 32</sup>

A

- Иммунофенотипно изследване на *ALK1* се препоръчва като задължителен компонент от диагностичния панел при новодиагностицирани пациенти с CD30+ Т-клетъчни лимфоми.
- Препоръчва се установяване на *ALK1* чрез имунохистохимия върху биопсичен материал. В случаи, при които имунохистохимичното изследване е положително за *ALK1*-протеин, не се препоръчва провеждане на FISH или кариотипизация.

**В**

При пациенти под 60-годишна възраст с ALK-позитивен анапластен едроклетъчен лимфом и нисък/нисък-междинен риск според международния прогностичен индекс (IPI) не се препоръчва консолидация с автоложна трансплантация на хемопоеични стволови клетки.



- При всички пациенти със съмнение за лимфом и/или рецидив задължително се прилага интегриран диагностичен подход, включващ репрезентативна биопсия от лимфен възел (или друга тъкан) в съчетание с имунофенотипизация.
- Необходимо е прилагане на достатъчно широк панел, който да позволява идентифициране на определените в класификацията на Световната здравна организация (4-та ревизирана версия, 2016) лимфопии като обособени нозологични единици, вкл. ALK1-позитивен анапластен едроклетъчен лимфом и ALK-позитивен дифузен В-едроклетъчен лимфом.
- ALK-позитивните лимфопии представляват рядко срещани Т-клетъчни анапластни едроклетъчни лимфопии или много редки форми на дифузен В-едроклетъчен лимфом, чието диагностициране следва да се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за интегриране на морфологична и имунофенотипна оценка на клиничния материал (в съпоставка с основни клинични данни) и годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести.
- Прилагането на нови таргетни терапии, включително ALK1-инхибитори или анти-CD30-моноклонални антитела, самостоятелно или в комбинация с други противотуморни агенти, се очаква да промени клиничния ход на болестта.

Таблица 1. Транслокации, формиращи фузионни гени с участие на ALK.

Партниращ ген	Транслокация	Честота при ALCL	Локализация на фузионния протеин	Източник
NPM	t(2;5)(p23,q35)	75-80%	ядрена/цитоплазмена	13
AT1C	Inv(2)(p23,q35)	2%	цитоплазмена	33

<i>AL017</i>	t(2;17)(p23;q25)	1%	цитоплазмена	34
неизвестен	ins(3'ALK)(4q22-24)	< 1% от дифузен В-едроклетъчен лимфом	грануларна цитоплазмена	35
<i>CTLC</i>	t(2;17)(p23;q23)	2%	цитоплазмена	36
<i>MYH-9</i>	t(2;22)(p23;q11.2)	1%	цитоплазмена	37
<i>MSN</i>	t(2,X)(p23,q1)	1%	върху клетъчна мембрана	38
<i>TFG</i>	t(2,3)(p23,q21)	1-2%	цитоплазмена	39
<i>TRM3</i>	t(1,2)(q25,p23)	12-18%	цитоплазмена	40
<i>TRM4</i>	t(2,19)(p23,p13)	1%	цитоплазмена	41

## ЛИТЕРАТУРА

1. Stoica GE, Kuo A, Aigner A, et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin. *J Biol Chem* 2001; 276 (20): 16772-16779
2. Powers C, Aigner A, Stoica GE, et al. Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *J Biol Chem* 2002; 277 (16): 14153-14158
3. Ladanyi M. The NPM/ALK gene fusion in the pathogenesis of anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Surv* 1997; 30: 59-75
4. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, et al. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene* 1994; 9 (6): 1567-1574
5. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1995; 267 (5196): 316-317
6. Pulford K, Lamant L, Espinos E, et al. The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61 (23): 2939-2953
7. Boi M, Zucca E, Inghirami G, Bertoni F. Advances in understanding the pathogenesis of systemic anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol* 2015; 168 (6): 771-183
8. Lovisa F, Cozza G, Cristiani A, et al. ALK kinase domain mutations in primary anaplastic large cell lymphoma: consequences on NPM-ALK activity and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *PLoS ONE* 2015; 10 (4): e0121378



9. Farina F, Stasia A, Gambacorti-Passerini C. Developments in anaplastic large-cell lymphoma: targeting the anaplastic lymphoma kinase. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy* 2014; 4: 69-79
10. Salaverria I, Beà S, Lopez-Guillermo A, et al. Genomic profiling reveals different genetic aberrations in systemic ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol* 2008; 140 (5): 516-526
11. Lamant L, de Reyniès A, Duplantier MM, et al. Gene-expression profiling of systemic anaplastic large-cell lymphoma reveals differences based on ALK status and two distinct morphologic ALK+ subtypes. *Blood* 2007; 109 (5): 2156-2164
12. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 2010; 115 (5): 1026-1036
13. Pulford K, Lamant L, Morris SW, et al. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood* 1997; 89 (4): 1394-1404
14. Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, et al. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol* 1998; 153 (3): 875-886
15. Stein H, Foss HD, Dürkop H, et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 2000; 96 (12): 3681-3695
16. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998; 91 (6): 2076-2084
17. Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002; 99 (2): 409-426
18. Falini B, Pulford K, Pucciarini A, et al. Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood* 1999; 94 (10): 3509-3515
19. Jiang XN, Yu BH, Wang WG, et al. Anaplastic lymphoma kinase-positive large B-cell lymphoma: Clinico-pathological study of 17 cases with review of literature. *PLoS ONE* 2017; 12 (6): e0178416
20. Pan Z, Hu S, Li M, et al. ALK-positive large B-cell lymphoma: A clinicopathologic study of 26 cases with review of additional 108 cases in the literature. *Am J Surg Pathol* 2017; 41 (1): 25-38
21. Damm-Welk C, Mussolin L, Zimmermann M, et al. Early assessment of minimal residual disease identifies patients at very high relapse risk in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 2014; 123 (3): 334-337
22. Savage KJ, Harris NL, Vose JM, et al. International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* 2008; 111 (12): 5496-5504
23. Zhang XM, Li YX, Wang WH, et al. Favorable outcome with doxorubicin-based chemotherapy and radiotherapy for adult patients with early stage primary systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2013; 90 (3): 195-201
24. Piva R, Chiarle R, Manazza AD, et al. Ablation of oncogenic ALK is a viable therapeutic approach for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood* 2006; 107 (2): 689-697
25. Coluccia AM, Gunby RH, Tartari CJ, et al. Anaplastic lymphoma kinase and its signalling molecules as novel targets in lymphoma therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9 (3): 515-532
26. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6 (12 Pt 1): 3314-3322
27. Mossé YP, Lim MS, Voss SD, et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol* 2013; 14 (6): 472-480

28. Marsilje TH, Pei W, Chen B, et al. Synthesis, structure-activity relationships, and in vivo efficacy of the novel potent and selective anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor 5-chloro-N2-(2-isopropoxy-5-methyl-4-(piperidin-4-yl)phenyl)-N4-(2-(isopropylsulfonyl)phenyl)pyrimidine-2,4-diamine (LDK378) currently in phase 1 and phase 2 clinical trials. *J Med Chem* 2013; 56 (14): 5675-5690
29. Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 370 (13): 1189-1197
30. Richly H, Kim TM, Schuler M, et al. Ceritinib in patients with advanced anaplastic lymphoma kinase-rearranged anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 2015; 126 (10): 1257-1258
31. Gambacorti Passerini C, Farina F, Stasia A, et al. Crizotinib in advanced, chemoresistant anaplastic lymphoma kinase-positive lymphoma patients. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106 (2): djt378
32. Cerchietti L, Damm-Welk C, Vater I, et al. Inhibition of anaplastic lymphoma kinase (ALK) activity provides a therapeutic approach for CLTC-ALK-positive human diffuse large B cell lymphomas. *PLoS ONE* 2011; 6 (4): e18436
33. Ma Z, Cools J, Marynen P, et al. Inv(2)(p23q35) in anaplastic large-cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis. *Blood* 2000; 95 (6): 2144-2149
34. Cools J, Wlodarska I, Somers R, et al. Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34 (4): 354-362
35. Stachurski D, Miron PM, Al-Homsi S, et al. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma with a complex karyotype and cryptic 3' ALK gene insertion to chromosome 4 q22-24. *Hum Pathol* 2007; 38 (6): 940-945
36. Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, et al. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood* 2003; 102 (7): 2568-2573
37. Lamant L, Gascoyne RD, Duplantier MM, et al. Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): a new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37 (4): 427-432
38. Tort F, Campo E, Pohlman B, Hsi E. Heterogeneity of genomic breakpoints in MSN-ALK translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol* 2004; 35 (8): 1038-1041
39. Hernández L, Pinyol M, Hernández S, et al. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood* 1999; 94 (9): 3265-3268
40. Lamant L, Dastugue N, Pulford K, et al. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood* 1999; 93 (9): 3088-3095
41. Meech SJ, McGavran L, Odom LF, et al. Unusual childhood extramedullary hematologic malignancy with natural killer cell properties that contains tropomyosin 4-anaplastic lymphoma kinase gene fusion. *Blood* 2001; 98 (4): 1209-1216

### 3.3. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ПЛАЗМОКЛЕТЪЧЕН МИЕЛОМ

#### 3.3.1. Цитогенетика [t(4;14)-, t(14;16)- и del17p-статус]

*Маргарита Генова, Георги Балаценко*

**Молекулярна биология.** Развитието на мултиплен миелом (ММ) е свързано с последователно натрупване на разнообразни нарушения, засягащи цели хромозоми, части от тях или отделни гени. Честотата и видът на нарушенията корелира със стадия на болестта, вида и продължителността на отговора към провежданата терапия. Посредством конвенционална кариотипизация клонални хромозомни нарушения се установяват в около 40% от случаите, от които само 20-35% към момента на диагнозата, като честотата на доказването на различни хромозомни аберации достига 80% при пациенти в напреднал стадий.<sup>1</sup> Спектърът на хромозомните аберации е изключително хетерогенен, като най-общо те разделят миелома на 2 основни групи: (1) нехипердиплоиден миелом – с транслокации, засягащи локуса на тежките вериги на имуноглобулините на хромозома 14q32 - t(4;14)(p16;q32), t(6;14)(p21;q32), t(11;14)(q13;q32), t(14;16)(q32;q23), t(14;20)(q32;q12) и др., и (2) хипердиплоиден миелом – с тризомии, засягащи по правило нечетни хромозоми 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 и 21. Всички тези аномалии се смятат като инициращи и са в основата на патогенезата на болестта. Разграничават се също така и редица аномалии, за които се смята, че са свързани с прогресията – монозомия 13, делеции, засягащи хромозоми 1p, 11q22, 17p, 14q32, 16q, амплификация на 1q21 и др.<sup>2</sup>

По правило t(4;14)(p16;q32) е криптична аномалия, неустановима чрез конвенционален цитогенетичен анализ, заемаща второ място по честота след t(11;14). Транслокацията се среща при плазмоклетъчни неоплазии – плазмоклетъчна левкемия, ММ и мо-

ноклонална гамопатия с неизяснена значимост [monoclonal gammopathy of unknown significance, MGUS], като честота ѝ при ММ е около 15%, често в съчетание с -13/13q-. Счупването на хромозома 4p16.3 се разполага в област с големина 110 кб, разположена между гените *MMSET* (центромерно) и *FGFR3* (теломерно). Счупването в хромозома 14q32 е разположено в областта на превключване (“switch”) на тежките вериги на имуноглобулините, като се разграничават две форми на фузии – при едната *FGFR3*-генът попада под контрола на *Ea* енхансера на *Ig* гена на хромозома der(14), а при другата – *MMSET*-генът попада под контрола на *Eu* енхансера на der(14). Крайният резултат е дерегулиране на експресията на двата гена и формиране на *IgH-MMSET* фузионни транскрипти, които могат да бъдат доказани чрез полимеразно-верижна реакция след обратна транскрипция [Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)]. Активирването и свърхекспресията на *FGFR3* предоставя онкогенни стимули, водещи до засилен клетъчна пролиферация и удължена клетъчна преживяемост. Функционалните последствия от дерегулацията на *MMSET*-гена не са добре проучени.<sup>3</sup>

По правило t(6;14)(p21.1;q32.3) се доказва основно (около 4%) при ММ/плазмоклетъчна левкемия, но се среща и при дифузен В-едроклетъчен лимфом и маргинално-зонен В-клетъчен лимфом. Счупването на хромозома 6p21.1 се разполага центромерно на *CCND3*-гена, а това на 14q32.3 – в областта на превключване (“switch”) на тежките вериги на имуноглобулините, в резултат на което настъпва дерегулация и свърхекспресия на *CCND3*-гена на der(14).<sup>4</sup>

По правило Del(17p13) се доказва при напреднали стадии на болестта. Моноалелни делеции на хромозома 17p13, където е разположен локуса на *TP53*-гена, се срещат при около 10% от нелекуваните пациенти с ММ, като честотата нараства значимо до 35-75% при

плазмоклетъчна левкемия. Аномалията проявява изразена асоциация с отговора към лечение и цялостната прогноза, като се смята, че основният механизъм, чрез който се опосредства неблагоприятното прогностично значение на  $del(17p)$ , е загуба на *TP53*-гена.<sup>5</sup> Според някои автори в 37% от пациентите с  $del(17p)$  се доказват в допълнение и мутации в *TP53*, липсващи при пациенти, при които делецията отсъства.<sup>6</sup> Според други около 40% от пациентите с *TP53*-мутации са отрицателни за  $del(17p)$ .<sup>5</sup> Общо инактивиране на *TP53* в резултат на делеция и/или мутация се среща в 7% от ММ, 37.5% от първичната плазмоклетъчна левкемия и 44% от вторичните плазмоклетъчни левкемии, от които билелното инактивиране на gena се среща съотв. в 0.8%, 16.7% и 22.2% от случаите.<sup>5</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Конвенционалният цитогенетичен анализ не е от най-информативните подходи за изследване на хромозомни аберации при ММ.<sup>7</sup> Приложимостта на метода се ограничава от ниския пролиферативен индекс на малигнените клетки и наличието на криптични аберации, както и от често ниския процент на инфилтрация с плазмоцити на костния мозък, поради което използването му е възможно само когато този процент е > 15-30%.<sup>8</sup> Поради тези причини предпочитан подход за доказване на клинично значими хромозомни аномалии е флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH), която е включена в задължителния набор от диагностични изследвания при новодиагностицирани пациенти с ММ. За постигане на оптимална ефективност се препоръчва материалът за изследване да бъде от първото теглене на аспирата, плазмоцитите да са CD138-селектирани или маркирани за цитоплазмени леки вериги на имуноглобулини, анализът да бъде направен върху не по-малко от 100 плазмоцита.<sup>9</sup> Изследването следва да се провежда и при всички болни с рецидив, тъй като е възможно поява на нови аномалии<sup>10, 11</sup>, както и изчезване на съществуващи към момента на диагнозата, както се съобщава и по отношение на  $t(4;14)(p16;q32)$ <sup>12</sup>.

За доказване на  $t(4;14)(p16;q32)$  може да се използва и полимеразно-верижна реакция [Polymerase Chain Reaction, PCR].<sup>3</sup>

От трите аномалии в актуалните препоръки, разработени от експерти в областта, само  $t(4;14)(p16;q32)$  и  $del(17p13)$  са включени в задължителния набор от диагностични изследвания чрез FISH, който, освен тях, може да включва и  $del(13q)$ ,  $t(11;14)$ ,  $t(14;16)$ ,  $del(1p)$  и амплификация на  $1q21$ . Изследването на  $t(6;14)(p21;q32)$  не е задължителен елемент на този панел.<sup>12-14</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Хромозомните аномалии са едни от най-важните прогностични фактори при ММ. Някои от тях, като  $t(4;14)(p16;q32)$ ,  $del(17p13)$  и др., са включени в Ревизираната международна стадираща система [Revised International Staging System, R-ISS]<sup>15</sup>. По правило  $t(6;14)(p21;q32)$  е асоциирана при тлеещ (smoldering) миелом със стандартен риск и медианно време до прогресия от 5 години. При пациенти с ММ  $t(6;14)(p21;q32)$  дефинира група със стандартен риск и относително благоприятна прогноза с медианна обща преживяемост от 7-10 години.<sup>16</sup> От друга страна,  $t(4;14)(p16;q32)$  е асоциирана при тлеещ (smoldering) миелом с висок риск и медианно време до прогресия от 2 години.<sup>16</sup> Въз основа на мета анализ, обхващащ 10 276 болни с ММ, се доказва, че пациенти, носещи аномалията, имат неблагоприятна прогноза с кратка обща преживяемост (ОП) и преживяемост без прогресия (ПБП).<sup>17</sup> Смята се, че прогностичната значимост на  $t(4;14)$  е по-изразена при новодиагностицирани пациенти, отколкото при тези с рецидив или рефрактерна болест, като от значение за прогнозата е и наличие на други допълнителни аномалии. Например наличието на  $del(1p32)$ ,  $del(22q)$  и > 30 хромозомни структурни нарушения повлиява в неблагоприятна насока ПБП. По отношение на ОП  $del(13q14)$ ,  $del(1p32)$ , както и броят

на хромозомни структурни промени влошават прогнозата.<sup>18</sup> През последните години t(4;14) се асоциира с интермедиерна прогноза<sup>19, 20</sup> и медианна ОП от 5 години<sup>16</sup>, което вероятно е свързано с вариации в използваните терапевтични протоколи<sup>20</sup>.

От друга страна, del(17p13) е асоциирана при тлеещ (smoldering) миелом с висок риск и медианно време до прогресия от 2 години.<sup>16</sup> При ММ аномалията дефинира група с висок риск<sup>17</sup> с медианна обща преживяемост от 3 години<sup>16</sup>. Редица допълнителни хромозомни аномалии могат да модулират прогностичната значимост на аномалията. Например del(6q) допълнително влошава прогнозата, докато +15 и -14 имат протективен ефект върху ПБП. По отношение на ОП del(1p32) влошава прогнозата, докато наличието на > 8 бройни аберации има протективно действие.<sup>18</sup>

Пациенти с t(6;14)(p21;q32), аналогично на всички останали в групата със стандартен риск, отговарят добре на рутинно използваните протоколи, като се препоръчва начално лечение с *lenalidomide/dexamethasone* или с *cyclophosphamide/bortezomib/dexamethasone*, последвано от автоложна трансплантация на хемопоеични стволови клетки (АТХСК). При пациенти, при които не може да се проведе трансплантация, се препоръчва комбинация от *melfalan/prednisone/thalidomide* или *lenalidomide/dexamethasone*.<sup>19</sup>


Пациенти с t(4;14) и del(17p) не отговарят добре на протоколи, включващи химиотерапия и трансплантация на хемопоеични стволови клетки. Прилагането на протоко-

ли, включващи имуномодулатори и протеозомни инхибитори, подобряват в известна степен прогнозата при пациенти с t(4;14), докато при тези с del(17p) ефективността е значително по-слабо изразена.<sup>16, 21</sup> Лечение с *thalidomide* не променя неблагоприятната прогноза при пациенти с t(4;14) и del(17)/del(17p).<sup>21</sup> *Bortezomib* отчасти преодолява неблагоприятната прогноза на t(4;14), като вероятно има ефект и при пациенти с del(17p). При пациенти, които не са подходящи за АТХСК, използването на *melfalan/prednisone + bortezomib* (VMP) може частично да повлияе продължителността на ПБП.<sup>13, 19, 21</sup> При пациенти, подходящи за АТХСК, *lenalidomide* отчасти подобрява неблагоприятния ефект на t(4;14) и del(17p) по отношение на ПБП, но не и ОП.<sup>13, 19</sup> При пациенти, които не са подходящи за АТХСК, липсват данни, които да променят прогнозата. Потенциална ефективност се съобщава за *pomalidomide* с *dexamethasone* при рецидивирал/рефрактерен ММ с del(17p).<sup>21</sup> Използването на комбинация от протеазомен инхибитор с *lenalidomide* и *dexamethasone* в значителна степен повлиява неблагоприятния ефект на t(4;14) и del(17p) по отношение на ПБП.<sup>13, 19</sup> Някои предварителни данни очертават ефективността на *carfilzomib* с *lenalidomide* и *dexamethasone*.<sup>21</sup> Високодозовата терапия и АТХСК е стандартен подход за новодиагностициран ММ, при който може да се извърши трансплантация, вкл. и при този с (4;14) и del(17p), като ефектът е особено добър при двойна АТХСК, дори и в случаи с едновременно носителство и на двете аномалии.<sup>21, 22</sup> Счита се, че алогенната ТХСК или тандемната ало/авто ТХСК може да подобри ПБП при тези пациенти.<sup>21</sup>

**A**

■ Изследване на t(4;14)(p16;q32) и del(17p13) се препоръчва като задължителен елемент от диагностичния панел при новодиагностицирани пациенти с плазмоклетъчен миелом. Изследване на t(6;14)(p21;q32) не е задължително.

А	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Препоръчва се изследване на <math>t(4;14)(p16;q32)</math> и <math>del(17p13)</math> да се провежда чрез FISH, като <math>t(4;14)(p16;q32)</math> може да се докаже и чрез RT-PCR. Препоръчва се FISH да се провежда върху CD138 селектирани плазмоцити или маркирани за цитоплазмени леки вериги на имуноглобулини.</li> </ul>
В	<p>Препоръчва се прилагане на протеазомни инхибитори в комбинация с <i>lenalidomide/pomalidomide</i>, тандемна автоложна трансплантация на хемопоеични стволови клетки плюс <i>bortezomib</i>, или комбинация на имунотерапия с <i>lenalidomide</i> или <i>pomalidomide</i> при пациенти с <math>t(4;14)(p16;q32)</math> и <math>del(17p13)</math>.</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ При всички пациенти със съмнение за плазмноклетъчна неоплазия и/или рецидив задължително се прилага интегриран диагностичен подход, включващ морфологични, имунологични, генетични и образни изследвания.</li> <li>■ В повечето проучвания <math>t(4;14)(p16;q32)</math> и <math>del(17p13)</math> са асоциирани с неблагоприятна прогноза и висок риск, докато <math>t(6;14)(p21;q32)</math> корелира със стандартен риск.</li> <li>■ Прогнозата при пациенти с <math>t(4;14)(p16;q32)</math> и <math>del(17p13)</math> отчасти може да варира според използваната терапия.</li> <li>■ Окончателната диагностика на плазмноклетъчни миеломи се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за интегриране на морфологична, имунологична и генетична оценка на клиничен материал в съпоставка с основни клинични и образни данни и годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести годишно през всяко едно от лабораторните направления.</li> </ul>
---	---

## ЛИТЕРАТУРА

1. Pratt G. Molecular aspects of multiple myeloma. *Mol Pathol* 2002; 55 (5): 273-283
2. Boyd KD, GJ, et al. Understanding the molecular biology of myeloma and its therapeutic implications. *Expert Rev Hematol* 2012; 5 (6): 603-617
3. Vigiúé F.  $t(4;14)(p16;q32)$ . Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 2005; 9 (3): 246-247
4. Vigiúé F.  $t(6;14)(p21;q32)$ . Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 2005; 9 (3): 248-249
5. Lionetti M, Barbieri M, Manzoni M, et al. Molecular spectrum of TP53 mutations in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget* 2016; 7 (16): 21353-21361
6. Lodé L, Eveillard M, Trichet V, et al. Mutations in TP53 are exclusively associated with  $del(17p)$  in multiple myeloma. *Haematologica* 2010; 95 (11): 1973-1976
7. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *Br J Haematol* 2011; 154 (1): 32-75

8. Quach H, Prince M, Medical Scientific Advisory Group (MSAG) to the Myeloma Foundation of Australia (MFA). Clinical Practice Guideline Multiple Myeloma. v.3 – August 2015
9. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2012; 97 (8): 1272-1277
10. Palumbo A, Sezer O, Kyle R, et al. International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 2009; 23 (10): 1716-1730
11. San-Miguel JF, Paiva B, Gutiérrez NC. New tools for diagnosis and monitoring of multiple myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013
12. Hébraud B, Caillot D, Corre J, et al. The translocation t(4;14) can be present only in minor subclones in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2013; 19 (17): 4634-4637
13. Kumar SK, Callander NS, Alsina M, et al. Multiple Myeloma, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15 (2): 230-269
14. Pratt G, Morris TC. Review of the NICE guidelines for multiple myeloma. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 (1): 3-13
15. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015; 33 (26): 2863-2869
16. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016; 35: e418-23
17. Yu W, Li J, Chen L. Prognostic value and efficacy evaluation of novel drugs for cytogenetic aberrations in multiple myeloma: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7 (11): 4051-4062
18. Hébraud B, Magrangeas F, Cleynen A, et al. Role of additional chromosomal changes in the prognostic value of t(4;14) and del(17p) in multiple myeloma: the IFM experience. *Blood* 2015; 125 (13): 2095-2100
19. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013; 88 (4): 360-376
20. Kalf A, Spencer A. The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer J* 2012; 2: e89
21. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 2016; 127 (24): 2955-2962
22. Michele Cavo M, Salwender H, Rosiñol L, et al. Double vs single autologous stem cell transplantation after bortezomib-based induction regimens for multiple myeloma: An integrated analysis of patient-level data from phase european III studies. *Blood* 2013; 122: 767

### 3.4. ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ ПРИ ЛИМФОМ НА *HODGKIN*

#### 3.4.1. CD30-експресия

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** Маркерът CD30 е член на суперсемејството на рецептора на тумор-некротизиращия фактор (TNF-R). Неопластичните клетки на *Hodgkin-Reed-Sternberg* (HRS) при лимфом на *Hodgkin* се характеризират със силна експресия на антигена, в резултат на което се осъществява CD30-медирана активация на NF- $\kappa$ B.<sup>1,2</sup> Моделът на имунореактивност за CD30 е предимно мембранен и/или в зоната на *Golgi*. Молекулата може да се освобождава от клетъчната мембрана в разтворима форма в телесните течности и да се установи в серум (sCD30).<sup>3</sup> По правило CD30 има ограничена експресия в нормални тъкани – върху активирани T- и B-клетки, което прави молекулата оптимална мишена за селективно елиминиране на CD30-експресиращи неопластични клетки чрез специфични моноклонални антители.<sup>4</sup>

През 2011 г. Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) и Европейската лекарствена агенция (EMA) регистрират *brentuximab vedotin* за лечение на рецидивирал лимфом на *Hodgkin*. Медикаментът се състои от химерно моноклонално анти тяло *brentuximab* (sAC10), насочено към мембрания протеин CD30 и свързано с антимиотичен агент *monomethyl auristatin E* (MMAE) – *vedotin* по начин, който не позволява при физиологични условия лекарството да се отдели лесно от анти тялото. По този начин се предотвратява токсична увреда на здрави клетки и се осигурява ефективна доза. Връзката между анти тяло и токсин е пептидна, което улеснява бързо и ефективно отделяне на активна субстанция вътре в прицелната туморна клетка, след като анти тялото sAC10 се свърже с CD30 предимно върху малигнени и рядко върху нормални клетки.

След свързване *brentuximab vedotin* се интернализира чрез ендоцитоза и по този начин селективно поражда таргетните клетки. Везикулите, съдържащи медикамента, се сливат с лизозомите, където протеази разграждат пептидната връзка и MMAE се освобождава директно в тумора.<sup>5</sup>

**Аналитични методи за изследване.** Откриване на CD30 може да се осъществи чрез три метода, използвани самостоятелно или в комбинация: имунохистохимия (ИХХ), флоуцитометрия и ензим-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) (в случай на разтворим CD30).<sup>6</sup> Имунохистохимичното изследване на имунофенотипа на HRS, включително и на CD30, е задължителен компонент в диагностичния процес на лимфом на *Hodgkin*. Методът е широко достъпен, относително евтин, позволява маркиране на архивни проби. Най-често се използва клон Ber-H2 на CD30-моноклонално анти тяло, който се отличава с висока специфичност при изследване на биопсични материали, фиксирани във формалин и включени в парафин.<sup>7</sup> Клоновете 1G12, 15B3, CON6D/ B5 и JCM182 също дават възпроизводими резултати.<sup>8</sup> Прилагане на компютър-асистиран анализ на ИХХ-препарати чрез пиксел-базирана софтуерна обработка или мултиспектрални изображения (MSI) дава възможност за по-висока чувствителност при идентифициране на положително маркирани клетки.<sup>9,10</sup>

Флоуцитометрията е мощен аналитичен инструмент за анализ на хетерогенни клетъчни популации с едно особено предимство, че подлежи в голяма степен на стандартизация. В допълнение, методът открива и слабо изразени антигени на клетъчната повърхност. Основни недостатъци са свързани с необходимост от свежа тъкан, каквато рядко е на разположение към момента на диагноза, необходимост от специализирано оборудване, по-висока цена и невъзможност за оценка на пространствено разположение на изслед-



ваните клетъчни компоненти. Методът има ограничено приложение при лимфом на *Hodgkin*, независимо от отделни съобщения за разработване на многоцветни подходи.<sup>11</sup>

Методът ELISA е количествено определяне на серумни нива на разтворим CD30.<sup>12</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Имунотипното изследване на CD30 чрез ИХХ е задължителен компонент от диагностичния процес на лимфом на *Hodgkin*. Установяването му е основна предпоставка за прилагане на анти-CD30-моноклонално анти тяло (*brentuximab vedotin*), което достоверно подобрява терапевтичния отговор при рецидиви.<sup>13, 14</sup> Допълнителното определяне на положително маркирани чрез ИХХ

клетки (процент от общ клетъчен състав или от туморни клетки) не показва корелация с отговор към *brentuximab vedotin*, дори и след повишаване на прецизността чрез компютър-асистирани методи. Наблюдавана е известна тенденция за по-добър терапевтичен отговор в случаи с по-силно оцветяване, без да е потвърдена статистически.<sup>15</sup> От друга страна, проучвания при CD30+ кожни лимфоми и дифузен В-едроклетъчен лимфом установяват по-високи серумни нива на разтворим CD30 при пациенти с по-добър отговор към *brentuximab*.<sup>16</sup> *In vitro* проучвания демонстрират загуба на CD30-експресия като възможен механизъм за резистентност към *brentuximab vedotin*, което не е потвърдено при пациенти.<sup>17</sup>

**A**

- Имунотипно изследване на CD30 се препоръчва като задължителен компонент от диагностичния панел при suspectен лимфом на *Hodgkin* както при новодиагностицирани пациенти, така и при рецидив и/или прогресия.
- При лимфом на *Hodgkin* се препоръчва изследване на CD30 чрез имунохистохимия. Флоуцитометрично изследване не се препоръчва.
- При установена експресия на CD30 при лимфом на *Hodgkin* се препоръчва прилагане на анти-CD30 моноклонално анти тяло (*brentuximab vedotin*) след неуспех на автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки или след неуспех на най-малко две предходни схеми на полихимиотерапия при пациенти, които не са кандидати за трансплантация на стволови клетки.



- При всички пациенти със съмнение за лимфом и/или рецидив задължително се прилага интегриран диагностичен подход, включващ репрезентативна биопсия от лимфен възел (или друга тъкан) в съчетание с имунофенотипизация.
- Необходимо е прилагане на достатъчно широк панел, който да позволява идентифициране на имунофенотипна конституция на лимфом на *Hodgkin* според класификацията на Световната здравна организация (4-та ревизирана версия, 2016).



- **Окончателната диагностика на лимфомите, вкл. на лимфом на Hodgkin, се осъществява в специализирани лаборатории, които имат добре функциониращ механизъм за интегриране на морфологична и имунофенотипна оценка на клиничния материал (в съпоставка с основни клинични данни) и годишна натовареност не по-малка от 200 преминали пациенти с хематологични болести.**
- **При клинични съмнения за рецидиви и/или позитивни ПЕТ/КТ-данни при оценка на терапевтичен отговор следва да се осъществи при възможност повторна биопсия с имунохистохимия.**

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 151-174
2. Horie R, Higashihara M, Watanabe T. Hodgkin's lymphoma and CD30 signal transduction. *Int J Hematol* 2003; 77 (1): 37-47
3. Pizzolo G, Vinante F, Chilosi M, Dallenbach F, Josimovic-Alasevic O, Diamantstein T, Stein H. Serum levels of soluble CD30 molecule (Ki-1 antigen) in Hodgkin's disease: relationship with disease activity and clinical stage. *Br J Haematol* 1990; 75 (2): 282-284
4. de Bruin PC, Gruss HJ, van der Valk P, et al. CD30 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue: biological aspects and clinical implications. *Leukemia* 1995; 9 (10): 1620-1627
5. Vakilav C, Forero-Torres A. Safety and efficacy of brentuximab vedotin in patients with Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Therapeutic Advances in Hematology* 2012; 3 (4): 209-225
6. Wasik MA, Jimenez GS, Weisenburger DD. Targeting CD30 in malignant tissues: challenges in detection and clinical applications. *Pathobiology* 2013; 80 (5): 252-258
7. Schwarting R, Gerdes J, Dürkop H, et al. BER-H2: a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope. *Blood* 1989; 74 (5): 1678-1689
8. Nordi QC. Assessment Run 31 2011: CD30. Available at: [www.nordiqc.org/Run-31-G1/Assessment/assessment-31-CD30.htm](http://www.nordiqc.org/Run-31-G1/Assessment/assessment-31-CD30.htm)
9. Jacobsen ED, Sharman JP, Oki Y, et al. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD30 expression. *Blood* 2015; 125 (9): 1394-1402
10. Kim YH, Tavallaee M, Sundram U, et al. Phase II Investigator-Initiated study of brentuximab vedotin in mycosis fungoides and sézary syndrome with variable CD30 expression level: A multi-institution collaborative project. *J Clin Oncol* 2015; 33 (32): 3750-3758
11. Fromm JR, Wood BL. A six-color flow cytometry assay for immunophenotyping classical Hodgkin lymphoma in lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 2014; 141 (3): 388-396
12. Casasnovas RO, Mounier N, Brice P, et al.; Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2007; 25 (13): 1732-1740
13. Diefenbach CS, Leonard JP. Targeting CD30 in Hodgkin lymphoma: antibody-drug conjugates make a difference. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2012; 162-166. doi: 10.14694/EdBook\_AM.2012.32.162
14. Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2014; 165 (3): 287-299

15. Xu ML, Acevedo-Gadea C, Seropian S, Katz SG. Expression of CD30 as a biomarker to predict response to brentuximab vedotin. *Histopathology* 2016; 69 (1): 155-158
16. Kim YH, Tavallae M, Sundram U, et al. Phase II investigator-initiated study of brentuximab vedotin in mycosis fungoides and Sézary syndrome with variable CD30 expression level: A multi-institution collaborative project. *J Clin Oncol* 2015; 33 (32): 3750-3758
17. Chen R, Hou J, Newman E, et al. CD30 downregulation, MMAE resistance, and MDR1 upregulation are all associated with resistance to brentuximab vedotin. *Mol Cancer Ther* 2015; 14 (6): 1376-1384

### 3.4.2. PD-L1/PD-1-експресия

Маргарита Генова, Георги Балаценко

**Молекулярна биология.** CD279, познат като протеин на програмираната клетъчна смърт-1 (PD-1), принадлежи към суперсемейството на имуноглобулините и представлява рецептор на клетъчната повърхност, който играе важна роля в подтискане на имунната система и подпомага толеранса към собствени структури посредством подтискане на възпалителната активност на Т-клетките. Кодира се от *PDCD1*-гена. Експресира се върху Т-клетки и про-В-клетки, свързвайки два лиганда – PD-L1 и PD-L2. Първият, PD-1, представлява т.нар. имунна контролна точка (чекпоинт) и предпазва от възникване на автоимунитет чрез двоен механизъм. От една страна, повишава апоптозата (т.нар. програмирана клетъчна смърт) в антиген-специфични Т-клетки в лимфните възли, като в същото време води до намаляване на апоптозата в регулаторните Т-клетки.<sup>1-3</sup> От друга страна, CD274 е лиганд на програмирана смърт-1 (PD-L1), синоним на B7-H1, и представлява трансмембранен протеин, който се експресира върху широк спектър от клетъчни видове, включително върху антиген-представящи клетки, основно дендритни клетки и макрофаги в сърце, бял дроб и др. Свързването на PD-1 и PD-L1 предава инхибиторен сигнал, в резултат на който намалява пролиферацията и индуцира апоптоза на автореактивни CD8+ Т-клетки и/или CD4+ хелпери като осигурява имунен толеранс. Повишена експресия на PD-L1-протеин се установява при редица малигнени болести, като се смята, че играе важна роля за подтискане на противотуморния имунитет.<sup>4,5</sup>

Лимфомътна *Hodgkin* е лимфоидна неоплазия, характеризираща се с малко на брой злокачествени клетки на *Hodgkin-Reed-Sternberg* (HRS), заобиколени от обилен, но

неефективен реактивен имунен инфилтрат. Туморните клетки активно избягват имунния надзор и този процес играе централна роля в прогресията на тумора. Генетичните промени в 9p24.1-локуса на 9-та хромозома, свързани с повишена експресия на PD-L1 посредством JAK-STAT-сигналния път, вероятно са определящ фактор за този биологичен феномен, за възникване и развитие на болестта.<sup>6,7</sup> Имунохистохимично (ИХХ) повишена експресия в  $\geq 5\%$  от туморните клетки се установява в 71-97% от случаите с класически лимфом на *Hodgkini* и в 54% с нодуларен вариант с лимфоцитно преобладаване.<sup>8</sup> При пациенти без промяна в броя на 9p24.1-копия повишената експресия на PD-L1 все още може да се дължи на инфекция с Epstein-Barr virus (EBV).<sup>9</sup>

Наблюдения върху противотуморния имунитет дават основания на опити за възстановяване на антитуморната активност на цитотоксичните Т-клетки чрез намеса в PD-1-оста посредством използване на анти-PD-1- и анти-PDL-1-моноклонални антители при редица злокачествени тумори, включително и лимфом на *Hodgkin*.<sup>10,11</sup>

**Аналитични методи за изследване.** В клинични проучвания експресията на PD-L1 е определяна с ИХХ върху хистологични срезове от фиксирани във формалин и включени в парафин биопсични тъкани. За положителен резултат се приема наличие на  $\geq 1\%$  клетки на *Hodgkin-Reed-Sternberg* и варианти с поне частично мембранно оцветяване със средна или силна интензивност. Методът дава възможност за оценка на интензивност на маркиране (по скала от 0 до 3), определяне на процент мембранно маркирани туморни клетки (в четири категории: 0%, 0-50%, 50-100% или 100%) и полуколичествена оценка на маркирани хистиоцити (по скала от 0-3).<sup>13,17</sup> Имунохистохимичното идентифициране на PD-1-положително имуномаркирани клетки от микросредата не е патогномоничен белег на лимфом на *Hodgkin*, но установяването на розетки от поло-

жително маркирани лимфоцити около туморните клетки е характерна находка за нодуларния вариант с лимфоцитно преобладаване и подкрепя диференциалната диагноза за други неходжкинови лимфоми.<sup>18</sup>


Абнормно повишената експресия на CD274(PD-L1)/CD279(PD-1) се дължи на подлежащо генетично нарушение в 9p24.1-локуса в значителната част от случаите, но основното методологично ограничение за идентифицирането му е изключително малкият дял на туморни клетки. Разработени са *in situ* хибридационни подходи за идентифициране на 9p24.1/PD-L1/PD-L2 нарушения, включително и полизомии, по-висок брой копия, амплификации и транслокации.<sup>7</sup>

**Доказателства за предиктивно значение.** Високият процент на отговор към медикаментозно блокиране на PD-1 при класически лимфом на *Hodgkin* подкрепя хипотезата, че за своето оцеляване болестта е силно зависима от PD-1-пътя. Генетично дефинираната чувствителност към PD-1-инхибитори, свързана с промени в 9p24.1-локуса на 9-та хромозома в значителната част от пациентите, отличава лимфома на *Hodgkin* от другите солидни тумори и злокачествени хематологични болести, както и обяснява защо терапевтичният резултат е по-висок в сравнение с всяко едно от тях.

Имунохистохимичното изследване идентифицира PD-1 като независим неблагоприятен прогностичен фактор по отношение на обща преживяемост (ОП).<sup>19,20</sup> Идентифицирането на PD-L1-експресия в клетките на туморната микросреда безспорно идентифицират пациенти, за които се очаква положителен терапевтичен резултат от прилагане на чекпойнт-инхибитори, но изследването на експресията нито гарантира сигурен резултат, нито изключва възможност за успешно лечение при отрицателно маркиране.<sup>21,22</sup>

На 17 май 2016 г. Американската Агенция за храни и лекарства (FDA) дава ускорено одобрение за приложението на анти-PD-1-инхибитора *nivolumab* за лечение на пациенти с класически лимфом на *Hodgkin* с рецидив или прогресия след автоложна трансплантация на хематопоетични стволови клетки (ТХПСК) и *brentuximab vedotin*, приложен посттрансплантационно. Приложението на *nivolumab* във фаза I (NCT01592370) и фаза II (NCT02181738) проучвания води до постигане на обективен терапевтичен отговор съотв. в 87% и в 66%, от които частична ремисия се регистрира в 58% и пълна ремисия – в 7%, със средна продължителност 8.7 месеца. Категоризиран като „пробив в терапията“, *nivolumab* е първият одобрен чекпойнт-инхибитор в хематологията.<sup>12-14</sup> На 14 март 2017 FDA дава ускорено одобрение за приложение и на анти-PD-1-моноклонално антитяло *pembrolizumab* за възрастни и деца с рефрактерен класически лимфом на *Hodgkin* или при рецидив след три или повече предходни линии терапия. Одобрението се базира на данни от многоцентрово нерандомизирано отворено клинично изпитване (NCT02453594) при пациенти с рефрактерна болест или рецидив след автоложна ТХПСК и/или *brentuximab vedotin*, като са получили средно четири предходни линии системна терапия. Постигнат е обективен терапевтичен отговор в 69%, от които частичен отговор – в 47%, пълн – в 22%, със средна продължителност на отговора от 11.1 месеца.<sup>15,16</sup> Към момента са в ход и други фаза I и фаза II клинични проучвания при класически лимфом на *Hodgkin*, при който *nivolumab* се прилага в комбинация с *brentuximab*, *ipilimumab* и *ibrutinib* (NCT02572167, NCT01896999, NCT02940301), заедно с епигенетични модулатори. Терапевтичната ефективност на *pembrolizumab* се тества в директна съпоставка с *brentuximab* (NCT02684292).<sup>11</sup>

<b>A</b>	Имунохистохимично изследване на PD-1 се препоръчва за диагноза при съмнение за нодуларен лимфом на <i>Hodgkin</i> с лимфоцитно преобладаване и диференциална диагноза с други неходжкинови лимфоми.
<b>B</b>	Изследване на PD-1 и/или PD-L1 към момента не се препоръчва за приложение на чекпойнт-инхибитори при лимфом на <i>Hodgkin</i> , освен в клинични проучвания.

	<i>Класическият лимфом на Hodgkin е болест, силно зависима за своето оцеляване от PD-1-пътя поради висока честота на генетични промени в 9p24.1-локуса на 9-та хромозома, което обуславя по-висок процент на терапевтичен отговор към PD-1-инхибитори.</i>
---	--

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1217: 45-59
2. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front Immunol* 2016; 7: 550
3. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, et al. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 1994; 23 (3): 704-706
4. Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 2010; 116 (8): 1291-1298
5. Quezada SA, Peggs KS. Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer* 2013; 108 (8): 1560-1565
6. Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010; 116 (17): 3268-3277
7. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, et al. PD-L1 and PD-L2 genetic alterations define classical Hodgkin lymphoma and predict outcome. *J Clin Oncol* 2016; 34 (23): 2690-7269
8. Menter T, Bodmer-Haecki A, Dirnhofner S, Tzankov A. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Hum Pathol* 2016; 54: 17-24
9. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, et al. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2012; 18 (6): 1611-1618
10. Ok CY, Young KH. Checkpoint inhibitors in hematological malignancies. *J Hematol Oncol* 2017; 10 (1): 103
11. Pianko MJ, Liu Y, Bagchi S, Lesokhin AM. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig* 2017; 4: 32
12. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372 (4): 311-931

13. Younes A, Santoro A, Shipp M, et al. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17 (9): 1283-1294
14. Kasamon YL, de Claro RA, Wang Y, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab for the treatment of relapsed or progressive classical Hodgkin lymphoma. *Oncologist* 2017; 22 (5): 585-591
15. Chen R, Zinzani PL, Fanale MA, et al. KEYNOTE-087. Phase II study of the efficacy and safety of pembrolizumab for relapsed/refractory classic Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2017; 35 (19): 2125-2132
16. Pembrolizumab approved for Hodgkin lymphoma. *Cancer Discov* 2017; 7 (5): OF1
17. Armand P, Shipp MA, Ribrag V, et al. Programmed death-1 blockade with pembrolizumab in patients with classical Hodgkin lymphoma after brentuximab vedotin failure. *J Clin Oncol* 2016; pii: JCLIN ONCOL673467
18. Nam-Cha SH, Roncador G, Sanchez-Verde L, et al. PD-1, a follicular T-cell marker useful for recognizing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2008; 32 (8): 1252-1257
19. Koh YW, Jeon YK, Yoon DH, et al. Programmed death 1 expression in the peritumoral microenvironment is associated with a poorer prognosis in classical Hodgkin lymphoma. *Tumour Biol* 2016; 37 (6): 7507-7514
20. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol* 2009; 40 (12): 1715-1722
21. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 2016; 17 (12): e542-e551
22. Mahoney KM, Atkins MB. Prognostic and predictive markers for the new immunotherapies. *Oncology (Williston Park)* 2014; 28 (Suppl. 3): 39-48

### 3.4.3. Междинна ПЕТ-2 (iPET-2)

Павел Бочев, Ирена Костадинова

**Метаболитни принципи и биология.** Позитронноемисионната томография, комбинирана с компютър-томография (ПЕТ/КТ) и маркирана с 18F-глюкоза-(FDG), е утвърден метод в съвременната онкология със специфични показания според произхода и хистологията на съответната болест. Полученият хибриден образ е функционално-морфологичен и представлява карта на глюкозния метаболизъм, който е повишен при повечето малигнени тумори; така е възможна ранната им детекция и оценка на биологичната им активност. Освен при тумори, FDG ПЕТ/КТ може да се позитивира и при инфламаторни промени и бенигнени процеси/тумори с повишена глюкозна утилизация; в този смисъл методът не е строго специфичен за визуализация само на онкологични болести. В последните години прийомът се наложи като маркер за оценка на терапевтичен отговор в рамките на системно лечение, като опит да се предвиди морфологичната промяна и отговорът към лечение в съвсем ранен метаболитен стадий при някои видове тумори. При солидни тумори ролята на метода като маркер за ранен терапевтичен отговор е най-малко дискусабилна, но при лимфоми, в частност – при лимфом на *Hodgkin* (ЛХ) и донякъде при дифузен В-едроклътъчен лимфом (DLBCL), предизвика истинска промяна в парадигмата при ранна оценка на терапевтичен отговор до степен, че към момента е средство на избор за ранна предикция към отговора на терапия (т.нар. Interim PET, iPET).

Лимфомът на *Hodgkin* е един от най-категоричните примери за успех на съвременната системна терапия в онкологията. Болестта като цяло е с добра прогноза и сравнително индолентен ход, като след лечение с първа линия химиотерапия (ХТ) ABVD (*adriamycin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine*) петгодишната преживяемост е над 90%.<sup>1</sup> Уникална

особеност на ЛХ е фактът, че малигнената клетъчна популация, представена от клетки на *Hodgkin-Reed-Sternberg*, е много малка част (на практика 1%) от това, което се презентира като малигнена формация или малигнено ангажиран лимфен възел. Основна роля в хистологичната структура и биологията на тумора играе немалигнената клетъчна популация, представена от мононуклеарни клетки, която се явява пазител на туморните клетки и в рамките на сложна система от хемокини и цитокини взаимодействия на практика превръща неопластичните клетки в безсмъртни.<sup>1,2</sup> Ненеопластичните клетъчни популации структурират микросреда, която протектира тумора. Особеното в приложението на FDG ПЕТ/КТ при ЛХ, което позволява ранен терапевтичен отговор и го отличава от приложението му при всички други тумори, е това, че *in vivo* детектираната активност не е функция на неопластични, а на инфламаторни клетки на микросредата, които се характеризират с изключително висока метаболитна активност.<sup>1,4</sup>

Като най-оптимален и широко приет интервал за ранна оценка на терапевтичен отговор се счита времето между втори и трети курс ABVD (iPET2), но съществуват данни, че негативирането на FDG ПЕТ/КТ-образа при отговарящи на ХТ пациенти може да се предиктира още след първи курс и дори 7 дни след стартиране на ХТ.<sup>5,6</sup> Уникалният механизъм за оценка на терапевтичния отговор отразява прекратяване на инфламаторната каскада и деактивиране на клетките от микросредата като най ранен белег за терапевтично въздействие върху тумора. В този смисъл механизъмът на предикция с FDG ПЕТ/КТ при БХ е индиректен и отразява прекъсване на връзката между туморна клетка и протектиращи я клетки на микросредата.

За разлика от ХЛ, при DLBCL активността от FDG ПЕТ/КТ е пряка функция на виталния туморен обем и резултатите от оценката на ранния терапевтичен отговор не



са така впечатляващи. В този случай сензитивността на метаболитното сканиране се базира на екстремно висока метаболитна активност при този тип лимфоми. При всички останали типове, извън ALX и DLBCL, iPET2 не е категоричен предиктор за терапевтичен отговор и приложението му за тази индикация, особено като база за промяна на провеждано лечение, следва да се обсъжда много внимателно.

**Индикации и доказателства за предиктивно значение.** В литературните данни FDG PET/КТ при ALX се определя като най-мошен предиктор на преживяемост без прогресия (ПБП) и обща преживяемост (ОП), особено при пациенти с висок начален стадий, значително надвишаващ претерапевтичната оценка по т.нар. International Prognostic index (PI).<sup>7,9</sup> В метаанализ на общо 13 проучвания *Terasawa et al.* демонстрират, че ПБП при iPET2-негативни е значително по-дълга срещу iPET2-позитивни пациенти, което е свързано и със значително по-добра ОП. Неуспех на лечението при iPET2-негативни случаи авторите отчитат в диапазон от 12-30%, сравнено с впечатляващите 90-95% при iPET2-позитивни.<sup>10</sup> В по-скорошен метаанализ *Adams et al.* обаче поставят под въпрос безусловната тежест на iPET2, като демонстрират сравнително по-ниска негативна предсказваща стойност от отчетеното в предишния метаанализ, но отново при висока позитивна предсказваща стойност. Основният извод е нуждата от допълнителна оценка на риска при iPET2-негативни пациенти, която да посочи малка субгрупа на рецидивиращи iPET2-негативни. Докато в субгрупата с висок начален стадий III и IV прогнозата корелира строго с резултатите от iPET2, не така ясна е прогностичната ѝ стойност при нисък начален стадий (и non-bulky disease), където петгодишната ПБП е висока и при iPET-позитивни, и при iPET-негативни пациенти: 98% срещу 84% при Deauville score (DS) > 3 и 98% срещу 79% при DS > 4-5. Последното, разбира се, е свързано с благоприятния ход на болестта при тези субгрупи.<sup>12</sup>

Съществен момент в ранната оценка са критериите за отговор. Оценка на терапевтичния отговор еволюира през последните години, като от препоръки, базирани изцяло на КТ<sup>13</sup>, се премина към първично инкорпориране на FDG PET/КТ в т.нар. критерии на International Harmonization Project (IHP)<sup>14-15</sup>, приемащи медиастиналния кръвен пул като референтна активност, за да се достигне до т.нар. критерии на *Deauville*<sup>16</sup> (петстепенна скала, представена на *Табл. 1*). Последните бяха допълнително въведени и за цялостна оценка при лимфоми в т.нар. Луганска класификация<sup>17</sup>, която за момента е стандарт в оценката на терапевтичния отговор при лимфоми. Оценка, макар и опростена, изисква специализирана подготовка на разчитания, което е демонстрирано в поданализ към проучване RATHL.<sup>21</sup> Полуколичествена оценка по стандартизирано отношение на натрупване (SUV) на този етап не се препоръчва при ALX, въпреки че съществуват софтуерни пакети, подпомагащи визуалната оценка върху нея.

Въз основа на така валидираните критерии за оценка са проведени редица проучвания, целящи интензификация или деинтензификация на лечението при ALX (iPET-адаптирани стратегии). В проучване RAPID е тестван особено щадящ режим на приключване на лечението само след 3 курса ABVD при iPET-негативни пациенти, сравнено с ABVD плюс лъчелечение. Въпреки че проучването не постига началната си цел, интерес представлява дългосрочното проследяване на ОП, която е по-продължителна при необлъчвани пациенти.<sup>18</sup> Характерна особеност е снижението на границата за iPET-позитивност до *Deauville score* 3, когато начална цел е деескалация на терапията. Към момента някои експертни бордове, напр. NCCN, приемат деинтензификацията по протокола на RAPID за допустима алтернатива при пациенти с нисък начален стадий и липса на неблагоприятни фактори. Друго рандомизирано проучване (H10) тества алтернативни режими със или без лъчелечение на база iPET2, но резултатите са в полза на лъчеле-

чение, специално при iPET-негативна група.<sup>19</sup> В поданализ на същото проучване обаче при iPET-позитивни пациенти е въведена ескалация към BEACOPP, което резултира във впечатляващо повишение на ПБП.<sup>20</sup> В друго рандомизирано проучване с FDG PET/КТ-адаптирана стратегия (LYSA study group AHL2011) се постига деескалация от BEACOPP към ABVD на база на iPET2 без разлики в показателите на двете групи.<sup>22</sup>

За разлика от оценката при начално лечение по протокол ABVD, при алтернативни протоколи от първа линия, каквито са режими Stanford V и екалиран BEACOPP, ранна-

та оценка всъщност е оценка на лечение след приключване на ХТ и методът се използва за селекция на кандидати за лъчелечение и дефиниране на пациентите с рефрактерна болест.<sup>23-24</sup>

В заключение, провеждането на iPET2 позволява FDG PET/КТ-адаптирана лечебна стратегия, която обаче следва да се базира не само на резултати от самото сканиране, но и на претерапевтично определяне на риска и съобразяване с особеностите и стадиянето на конкретния случай.

<b>A</b>	FDG PET/КТ се препоръчва като предиктивен маркер за ефект от първа линия химиотерапия при лимфом на <i>Hodgkin</i> след първите два терапевтични курса по протокол ABVD (iPET2) с последващо обсъждане за модификация на терапевтичния режим, базирана на междинна PET/КТ-оценка.
<b>B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Междинна PET/КТ-оценка при лимфом на <i>Hodgkin</i> се извършва задължително по визуална петстепенна скала (Deauville criteria/Deauville score) с дефиниране на пациенти с различна степен на отговор към лечение.</li> <li>■ Препоръчва се дефинирането на iPET2 като позитивен или негативен да се извършва според намеренията за модификация (деескалация/деинтензификация или ескалация/интензификация ± лъчелечение) на терапията (Deauville score 3 да се счита позитивен при намерение за деескалация).</li> <li>■ FDG PET/КТ се препоръчва като предиктивен маркер за ефект от първа линия химиотерапия по протоколи, различни от ABVD (BEACOPP, Stanford V): (i) FDG PET/КТ се препоръчва за оценка на терапевтичен отговор по протокол Stanford V след приключване на предвидения обем химиотерапия като селектор на кандидати за лъчелечение и дефиниране на пациенти с рефрактерна болест; (ii) FDG PET/КТ се препоръчва за оценка на терапевтичен отговор по протокол (e)BEACOPP след приключване на предвидения обем химиотерапия като селектор на кандидати за лъчелечение и дефиниране на пациенти с рефрактерна болест или след втори курс, когато се цели ранна деескалация към ABVD.</li> <li>■ FDG PET/КТ се препоръчва като предиктивен маркер за ефект от химиотерапия при резистентен/рефрактерен лимфом на <i>Hodgkin</i>.</li> </ul>
<b>C</b>	При Deauville score 5 след лечение се препоръчва контролна биопсия за дефиниране на рефрактерна болест.



- *При деца и подрастващи, както и при млади пациенти с астеничен хабитус, особено през есенно-зимен сезон и пролет, преди провеждане на ПЕТ/КТ се препоръчват мероприятия за избягване на ефекта на активиране на кафявата мастна тъкан – топли дрехи, затоплено помещение, претретиране с бета-блокери.*
- *При пациенти с диабет на инсулинолечение е от критично значение да се осигури минимален интервал от поне 4 часа след приложение на инсулина, защото хиперинсулинемията е почти единствен фактор, повлияващ чернодробната активност, която пък е основен критерий за оценка по Deauville.*
- *Оценка iPET2 е уместно да се проведе непосредствено преди следващ планиран терапевтичен курс.*
- *При оценка по Deauville-критерии се допуска сравнение на образи, проведени на различни апарати, с различна активност на радиофармацевтик и различно време на натрупване.*
- *Не се препоръчва използване на количествения параметър SUV за оценка на терапевтичен отговор при лимфом на Hodgkin, тъй като няма доказано сигурно прогностично и предиктивно значение.*
- *При лимфом на Hodgkin с ниска начална утилизация на FDG (изключително рядко, основно при вариант с лимфоцитно предоминиране) оценката по Deauville следва да се индивидуализира и да се корелира с данните от компютър-томография.*
- *При негативна ПЕТ/КТ-находка за метаболитна активност на лимфом на Hodgkin след лечение и наличие на остатъчни компютър-томографски маси крайният резултат трябва да се счита като пълен терапевтичен отговор.*
- *Наличие на ПЕТ/КТ-позитивни лезии с ниска вероятност за връзка с лимфопрлиферативен процес (например ПЕТ/КТ-позитивен тироиден нодул) следва да се отчитат като Deauville X, да се вписват в разчитането със съответни препоръки за уточнение или интерпретация, но да не се използват за дефиниране на ПЕТ/КТ-позитивност като самостоятелна находка.*
- *Приложение на интравенозен контраст към компютър-томографско сканиране в рамките на ПЕТ/КТ не е задължително, но може да се счита за препоръчително, особено при обхващане на медиастиnum.*

Таблица 1. Deauville-критерии за оценка на лимфом на *Hodgkin* при предикция на терапевтичен отговор.

Deauville score	Визуална оценка на PET
1	Без активност
2	Активност $\leq$ медиастинум
3	Активност $\geq$ медиастинум $\leq$ черен дроб
4	Активност, умерено повишена над чернодробна
5	Активност, силно повишена над чернодробна или нови лезии
X	Новопоявила се активност в зони, необичайни за ангажиране от лимфом на <i>Hodgkin</i>

## ЛИТЕРАТУРА

- Gallamini A. Positron emission tomography scanning: a new paradigm for the management of Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2010; 95 (7): 104601048
- Canellos GP. Residual mass in lymphoma may not be residual disease. *J Clin Oncol* 1988; 6 (6): 931-933
- Di Stasi A, De Angelis B, Rooney CM, et al. T-lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* 2009; 113 (25): 6392-6402
- Ma Y, Visser L, Roelofsen H, et al. Proteomics analysis of Hodgkin lymphoma: identification of new players involved in the cross-talk between HRS cells and infiltrating lymphocytes. *Blood* 2008; 111 (4): 2339-2346
- Kostakoglu L, Goldsmith SJ, Leonard JP, et al. FDG-PET after 1 cycle of therapy predicts outcome in diffuse large cell lymphoma and classic Hodgkin disease. *Cancer* 2006; 107 (11): 2678-2687
- Romer W, Hanauske AR, Ziegler S, et al. Positron emission tomography in non-Hodgkin's lymphoma: assessment of chemotherapy with fluorodeoxyglucose. *Blood* 1998; 91 (12): 4464-4471
- Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, et al. Early interim 2-[18F]fluoro-2-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3746-3752
- Hutchings M, Mikhael NG, Fields PA, et al. Prognostic value of interim FDG-PET after two or three cycles of chemotherapy in Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2005; 16: 1160-1168

9. Gallamini A, Rigacci L, Merli F, et al. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *Haematologica* 2006; 91: 475-481
10. Hutchings M, Loft A, Hansen M, et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107: 52-59
11. Terasawa T, Lau J, Bardet S, et al. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for interim response assessment of advanced-stage Hodgkin's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1906-1914
12. Adams HJ, Nievelstein RA, Kwee TC. Prognostic value of interim FDG PET in Hodgkin lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol* 2015; 170: 356-366
13. Adams HJ, Nievelstein RA, Kwee TC. Prognostic value of interim FDG PET in Hodgkin lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol* 2015; 170: 356-366
14. Simontacchi G, Filippi AR, Ciammella P, et al. Interim PET after two ABVD cycles in early-stage Hodgkin lymphoma: outcomes following the continuation of chemotherapy plus radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 92: 1077-1083
15. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1244-1253
16. Cheson B, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5
17. Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, et al. Use of positron emission Tomography for response assessment of lymphoma: Consensus recommendations of the Imaging Subcommittee of the International Harmonization Project in Lymphoma. *J Clin Oncol*. doi: 10.1200/ J CLIN ONCOL. 2006.08.2305
18. Meignan M, Gallamini A, Meignan M, et al. Report on the first international workshop on interim-PET scan in lymphoma. *Leuk lymphoma* 2009; 50: 1257-1260
19. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SE, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3059-3067
20. Radford J, Illidge T, Counsell N, et al. Results of a trial of PET-directed therapy for early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372: 1598-1607
21. Raemaekers JM, André MP, Federico M, et al. Omitting radiotherapy in early positron emission tomography-negative stage I/II Hodgkin lymphoma is associated with an increased risk of early relapse: clinical results of the planned interim analysis of the randomized EORTC/LYSA/FIL HD10 trial. *J Clin Oncol* 2014; 32: 1188-1194
22. Raemaekers JM. Early FDG-PET adapted treatment improved the outcome of early FDG-positive patients with stages I/II Hodgkin lymphoma (HL): final results of the randomized Intergroup EORTC/LYSA/FIL HD10 trial. 13th International Conference on Malignant Lymphoma; June 17–20, 2015; Lugano, Switzerland
23. Barrington SE, et al. PET-CT for staging and early response: results from the Response-Adapted Therapy in Advanced Hodgkin Lymphoma study. *Blood* 2016; 127 (12): 1531-1538
24. Casasnovas O, Brice P, Bouabdallah R, et al. Randomized phase III study comparing an early PET driven treatment de-escalation to a not PET-monitored strategy in patients with advanced stages Hodgkin lymphoma: interim analysis of the AHL2011 LYSA study. *Blood* 2015; 126: Abstr. 577
25. Advani RH, Hoppe RT, Baer D, et al. Efficacy of abbreviated Stanford V chemotherapy and involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin lymphoma: mature results of the G4 trial. *Ann Oncol* 2013; 24: 1044-1048
26. Engert A, Haverkamp H, Cobe C, et al. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2012; 379 (9828): 1791-1799



© Георги Балаценко, Ирена Костадинова, Маргарита Генова, Павел Бочев – автори, 2017

© Димитър КАЛЕВ – редактор, 2017

© Арт Трейсър ООД – издател, 2017

© www.more-conference.com – официален сайт, МОРЕ 2017

**ПРЕДИКТИВНИ БИОМАРКЕРИ В ОНКОЛОГИЯТА**  
**методи за изследване и клинично приложение**  
**Том II – ХЕМАТОЛОГИЧНИ НЕОПЛАЗИИ**

клинично ръководство, основано на доказателства

Графично оформление: *Петър Желев*

Издател: Арт Трейсър ООД, Варна, ул. Любен Каравелов 79

Варна, 2017

ISBN 978-619-7094-35-0



Lilly



Сканирай, за да прочетеш  
на мобилното си устройство

