МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

**Д-р Надежда Николова Юрукова – Цакова**

# ЗНАЧЕНИЕ НА НАЙ-ЧЕСТИТЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ АНОМАЛИИ ПРИ ОСТРАТА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕВКЕМИЯ В ДЕТСКА ВЪЗРАСТ

## АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт“
Научна област: „Медицина“
Научна специалност „Педиатрия“, шифър 03.01.50

**Научни ръководители:**

**Проф. д-р Георги Николаевич Балаценко, дм**

**Доц. д-р Мая Николова Йорданова, дм**

*София, 2021*

*София, 2021*

*Дисертационният труд съдържа 163 страници, 43 фигури и 24 таблици. Библиографската справка включва 250 източника.*

*Дисертационният труд е обсъден и насрочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедрата по педиатрия при МФ на Медицински университет – София, проведен на 20.05.2021 г.*

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 19.08.2021 г. в аудиторията на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев – ЕАД, бул. „Акад. Иван Гешов“ 11, гр. София*

*Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет на Медицински унивеситет – София.*

---

*Забележка: Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.*

# СПИСЪК СЪС СЪКРАЩЕНИЯ

## Съкращения на кирилица:

ДНК – Дезоксирибонуклеинова киселина

ИФ – Имунофонотипизация

КДКХО – Клиника по детска клинична хематология и онкология

КТ – Компютърна томография

ЛДХ – Лактатдехидрогеназа

МРБ – Минимална резидуална болест

НХЛ – Неходжкинов лимфом

ОЛЛ – Остра лимфобластна левкемия

ОМЛ – Остра миелоидна левкемия

РНК – Рибонуклеинова киселина

ХМЛ – Хронична миелоидна левкемия

ЦНС – Централна нервна система

ЯМР – Ядрено-магнитен резонанс

## Съкращения на латиница:

ALL – Acute lymphoblastic leukemia

AML – Acute myeloid leukemia

BCP – ALL – B–cell precursor acute lymphoblastic leukemia

BFM – Berlin-Frankfurt-Münster

CML – Chronic myeloid leukemia

CNAs – Copy Number Aberrations

CNS – Central nervous system

DNA – Deoxyribonucleic acid

EFS – Event free survival

FC-MRD – Flow-cytometry based minimal residual disease

GPR – Good prednisolone response

GWAS – Genome-Wide Association Study

HR – High Risk

LDH – Lactate dehydrogenase

MR – Medium Risk

NCI – National Cancer Institute

OS – Overall survival

PPR – Poor prednisolone response

RNA – Ribonucleic acid

RT-PCR – Reverse transcriptase – polymerase chain reaction

SR – Standard risk

WBC – White blood cells

# С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Въведение ..... 6

Цел и задачи ..... 8

Клинична група, материали и методи ..... 9

Резултати ..... 19

Обсъждане ..... 35

Заключение ..... 56

Изводи ..... 57

Приноси ..... 58

Публикации и участия във форуми, свързани с научния труд .... 61

Думи на благодарност..... 64

# В Ъ В Е Д Е Н И Е

Съвременният подход при лечението на най-честото онкологично заболяване при деца - Острата лимфобластна левкемия - налага прецизно изграждане на диагнозата, чийто задължителен компонент са генетичните изследвания. Последното десетилетие е период на изключителен напредък в разбирането на левкемогенезата. Разкрива се ролята на наследствените генетични варианти за отключването и развитието на заболяването, както и значението на индивидуалните генетични фактори за ефекта от лечението.

**Острата лимфобластна левкемия** (ОЛЛ) е малигнено хематологично заболяване, характеризиращо се с клонална пролиферация на лимфоидни клетки, блокирани на ранен етап от диференциацията си. Успехът, постигнат при лечението на деца, превръщайки заболяването от фатално протичащо до лечимо в над 80% от случаите, се дължи на комбинираните интензивни химиотерапевтични режими, съчетани с подобрени поддържащи грижи за пациентите.

Според съвременните схващания, ОЛЛ представлява спектър от заболявания на генетична основа, като прави насочените генетичните изследвания задължителен компонент при изграждане на диагнозата, избор на терапевтичен план и проследяване на отговора към терапия. Наследствената генетична предиспозиция е фактор, който в голяма степен предопределя отключването на левкемогенезата. Генетични са факторите и механизмите, определящи характеристиките на малигнената пролиферация, клиничните прояви на заболяването и повлияването от лечение, както и клоналната еволюция в случай на рецидив.

Генетичните маркери представляват основен класификационен критерий за обособяване на нозологични категории. Генетичните изследвания подкрепят диагнозата и са доказателство за клонален характер на пролиферацията, но не са основание за диагноза. Имат основно значение като прогностични индикатори, определящи стратификацията на пациентите и съответно избора на терапевтичен режим. Установените генетични реаранжирания могат да се използват като маркер за проследяване на МРБ и адаптиране на терапевтичната стратегия. Не на последно място, развитието на таргетната терапия, считано за особено перспективно направление, се основава на непосредствените резултати от насочени генетични изследвания.

# Ц е л и  и  з а д а ч и:

## Цел на научния труд:

Да се оцени честотата и значението на генетичните аномалии, изследвани чрез RT-PCR, по отношение на диагнозата, рисковата принадлежност, избора на терапия и ефекта от лечението, при деца с Остра лимфобластна левкемия, диагностицирани и лекувани за 13-годишен период в Клиниката по детска клинична хематология и онкология в София.

## Задачи:

1. Да се определи честотата и демографската характеристика на групите с най-честите молекулярно-генетични аномалии при ОЛЛ в детска възраст.
2. Да се оценят зависимостите между основните клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики, и наличието на най-честите молекулярно-генетични аномалии при деца с ОЛЛ.
3. Да се проследи влиянието на изследваните генетични маркери върху отговора към лечение и преживяемостта при деца с ОЛЛ при стандартен терапевтичен подход.
4. Да се оцени прогностичната стойност на нивото на минимална резидуална болест (МРБ), измерено чрез полуколичествена RT-PCR на установените при диагнозата фузионни гени.

# Клинична група, материали и методи

## 1. Клинична група

Изследвани са биологични материали (костен мозък) от пациенти с Остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ), диагностицирани и лекувани в Клиниката по детска клинична хематология и онкология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“, София за периода 1 януари 2005 г. до 31 декември 2017 г. Дата на последно проследяване – 31.12.2019 г.

### 1.1. **Характеристики на пациентите**

В настоящето проучване са включени общо **271 пациента**, при всеки от които са осъществени молекулярно-генетични изследвания по метода полимеразно- верижна реакция с обратна транскриптаза (RT-PCR).

Всички пациенти са диагностицирани и лекувани в Клиника по детска клинична хематлогия и онкология, УМБАЛ „Царица Йоанна – ИСУЛ“ (по-рано Специализирана болница за активно лечение на деца с онкохематологични заболявания – СБАЛДОХЗ) през периода януари 2005 г. – декември 2017 г. Периодът на наблюдение обхваща времето до края на м.декември 2019 г. Пациентите са на възраст от 0 до 18 години, медиана 5 години. Разпределението по пол е с превес на мъжкият – 166 момчета и 105 момичета. При всички пациенти е поставена диагноза Остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ) на базата на общовъзприети критерии (30). Във всички случаи са осъществявани морфологични и флоуцитометрични изследвания за характеризиране на заболяването. Съпътстващ цитогенетичен анализ е наличен за голяма част от пациентите в групата.

***При всички пациенти е осъществен RT-PCR, като броят на проведените изследвания надхвърля 1700:***

- ✓ *BCP-ALL (N=239) – при дебюта по 5 (пет) RT-PCR (вж по-долу), при положителните (N=85) за маркер – средно по още 6 (шест) в хода на проследяване;*
- ✓ *T-ALL (N=32) – при дебюта по 3 (три) RT-PCR, при положителни за маркер (N=6) – средно по още 5 (пет) в хода на проследяване;*

Прилагано е лечение в съответствие с международно-възприети терапевтични протоколи: ALL IC 2002, ALL IC 2009, Interfant-06, EsPhALL 09. Събраната информация е архивирана при спазване на приниципите за защита на личните данни.

**1.2. Възприети дефиниции на отчитани, проследявани и анализирани фактори.**

- ***Ремисия –*** под 5% бласти в костния мозък при цитомрфологично изследване в края на индукционното лечение, липса на бласти в ликвор, липса на локализирани левкемични инфилтрати или редукция с най-малко от 1/3 на първоначално наличен туморен обем.
- ***Категоризиране на състоянието на костния мозък*** *в зависимост от морфологично определения процент патологични бласти* - M1 костен мозък – бласти <5%; M2 костен мозък – бласти 5 – 25%; M3 костен мозък – бласти > 25% при морфологично изследване.
- ***Непостигната ремисия –*** неизпълнени критерии по горната дефиниция - над 5% бласти в костен мозък при цитоморфологично изследване, бласти в ликвор, персистиращ левкемичен (туморен) обем в края на индукционното лечение и консолидационната фаза.
- ***Рецидив (релапс):*** *изолиран костно-мозъчен* – над 25% бласти в костния мозък при цитоморфологично изследване без

екстрамедуларно засягане; *комбиниран* – над 5% бласти в костния мозък и ≥1 екстрамедуларна локализация; *изолиран ЦНС* - >5 бластни клетки/µl ликвор и/или интракраниални левкемични огнища; *тестикуларен* - едно- или двустранно неболезнено уплътнение (инфилтрация) на тестиси, доказано чрез биопсия; други биопсично доказани локализации;

**1.3. Клинични данни и лабораторни показатели:**

- ***Демографски*** – възраст, пол;
- ***Клинични данни*** – лимфопролиферативен синдром - медиастинално ангажиране, ЦНС-ангажиране, бъбречна инфилтрация; остеоартралгии при поставяне на диагнозата.
- ***Начални лабораторни данни*** – левкоцитен брой, хемоглобиново ниво, тромбоцитен брой, ЛДХ; биохимични показатели за бъбречна и чернодробна фунция, коагулационен статус.
- ***Имунофенотип на бластната популация***
- ***Цитогенетични аномалии*** – конвенционално кариотипизиране, по специфични показания – флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH).
- ***Молекулярно-генетични маркери.***
  - ✓ При В-клетъчен фенотип:
    - t(12;21)(p13;q22)[*ETV6-RUNX1*];
    - t(1;19)(q23;p13.3)[*TCF3-PBX1*];
    - t(9;22)(q34;q11.2)[M-*BCR-ABL1*];
    - t(9;22)(q34;q11.2)[m-*BCR-ABL1*];
    - t(v;11q23)[*MLL* rearranged];
  - ✓ При Т-клетъчен фенотип:
    - del1p32*(SIL-TAL1);*
    - t(9;22)(q34;q11.2)[M-*BCR-ABL1];*
    - t(9;22)(q34;q11.2*)[m-BCR-ABL1];*

При установяване на молекулярно-генетичен маркер, нивото на експресията му е проследявана периодично за оценка на терапевтичния отговор.Обобощена информация за пациентите, заедно с основни характеристики и разпределение по основни критерии е представена в Табл. 1.

**Таблица 1. Основните характеристики на пациентите с ОЛЛ. Критерии за разпределение по групи**

| **Фактор** | **№ пациенти 271** | **% от всички 100** |
|---|---|---|
| Пол мъжки | 166 | 61,3 |
| женски | 105 | 38,7 |
| Възраст (год.) < 1 | 7 | 2,6 |
| 1-9 | 185 | 68,3 |
| >10 | 79 | 29,2 |
| Левкоцити (x10³/mm³) | | |
| < 10 | 120 | 44,3 |
| 10-49 | 88 | 32,5 |
| 50-99 | 23 | 8,5 |
| > 100 | 40 | 14,8 |
| Клетъчна линия | | |
| В-клетъчна | 239 | 88,2 |
| Т-клетъчна | 32 | 11,8 |
| CNS статус 1 | 264 | 97,4 |
| статус 2 | 0 | 0 |
| статус 3 | 7 | 2,6 |
| t(12;21)/*ETV6-RUNX1* | | |
| положителни | 56 | 20,7 |
| отрицателни | 215 | 79,3 |
| t(1;19)/*TCF3-PBX1* | | |
| положителни | 14 | 5,2 |
| отрицателни | 257 | 94,8 |
| t(9;22)/*BCR-ABL1* | | |
| положителни | 8 | 3 |
| отрицателни | 263 | 9 |
| *MLL* – реаранж. | | |
| отрицателни | 7 | 2,6 |
| положителни | 264 | 97,4 |
| del1p32/*SIL-TAL1*) | | |
| положителни | 6 | 2,2 |
| отрицателни | 265 | 97,8 |
| Молекулярен маркер (всички) | | |
| положителни | 91 | 33,6 |
| отрицателни | 180 | 66,4 |
| NCI: Всички пациенти | 271 | 100 |
| SR | 152 | 56,1 |
| HR | 119 | 43,9 |
| NCI: В-клетъчни | | |
| SR | 148 | 54,6 |

| | | |
|---|---|---|
| HR | 91 | 33,6 |
| NCI: Т-клетъчни | | |
| SR | 4 | 1,5 |
| HR | 28 | 10,3 |
| BFM рискови гр. | | |
| SR | 44 | 16,2 |
| IR | 157 | 58 |
| HR | 70 | 25,8 |
| MRD Ден 8 GPR | 220 | 81,2 |
| PPR | 51 | 18,8 |
| MRD Ден 15 <0,1 | 12 | 12,2 |
| 0,1-10 | 65 | 66,3 |
| >10 | 21 | 21,4 |

*Обяснения на важните абревиатури:NCI – National Cancer Institute; BFM – Berlin-Francfurt-Munster; SR-standard risk, IR – intermediate risk, HR – kigh risk; MRD – minimal residual disease; CNS статус 1 – липсва ЦНС засягане,CNS статус 2 – артефициално-предизвикано ликворно засягане, CNS статус 3 – ЦНС ангажиране; GPR – good prednisone response, PPR – poor prednisone response;*

## 2. Материали и методи

2.1. Класически диагностични методи – анамнеза и физикално изследване, рутинни лабораторни и образни изследвания

2.2. Класически диагностичен метод при хематологично заболяване: Микроскопско цитологично изследване - на периферна кръв – изследането се провеждаше при всички пациенти със съмнение за онкохематологична диагноза, както и при проследяване на ефекта от лечение. Натривките се изготвяха по стандратна процедура, с оцветяване по метода на Romanowsky-Giemsa, в клиничната лаборатория към клиниката. Морфологична оценка и процентно съотношение на ядрените клетки се правеше при преброени 100-200 клетки, според установените стандарти; на проба от костен мозък – изследваха се всички пациенти при поставяне на диагнозата (ден 0) и в хода на лечението за оценка на ефекта от лечението ден 15, ден 33 от началната (индукционна) фаза на терапията, преди началото на консолидационната и реиндукционната фаза, в края на лечението, както и при съмнение за рецидив. Костно-мозъчният материал се добиваше чрез аспирационна биопсия, в спринцовка без антикоагулант, от пункционни локализации на *crista iliaca*

*anterior superior, crista iliaca posterior superior, tibia, sternum.* Допълнителен материал се съхраняваше/транспортираше за 24-48 часа, при стайна температура, в епруветки с антикоагулант EDTA или среда за клетъчни култри (в зависимост от необходимите допълнителни изследвания). Приготвяха се натривки, оцветявани по стандартен протокол, по метода на Romanowsky-Giemsa, в условията на клиничната лаборатория към клиниката. Натривките се оценяваха на микроскоп (модел Olympus CH-2), първоначално с увеличение 40х за целуларитет, наличие на мегакариоцити, съотношение на трите хемопоетични редици, наличие и обем на патологична популация. Допълнителни морфологични особености се описваха при преценка с микроскопско увеличение 100х. Прилагаха се морфологичните критерии на общоприетата FAB класификационна система за класифициране на бластите като тип L1, L2 и L3; на ликвор – морфологична оценка на наличен клетъчния субстрат се правеше на препарати от гръбначно-мозъчна течност, изготвени на цитоспин, при поставяне на диагнозата и в хода на лечение, при наличие на плеоцитоза от апаратно измерване.

2.3. Специализирани диагностични методи:

2.3.1. Имунофенотипизация - изследването е провеждано при всички пациенти към момента на диагнозата и динамично, при всички регулярни костно-мозъчни контроли, за проследяване на терапевтичния отговор, както и при съмнения за рецидив. Материалите бяха от периферна кръв и/или костно-мозъчен аспират (съхранени в епруветка с антикоагулант EDTA, BD Vacutainer). Имунофенотипизацията е осъществена в лабораторията на Клиниката, по рутинна методика (в съответствие с насоки на EGIL *(European Group for the Immunological characterization of leukaemias)*. Използваните комбинации МАТ, означени по международна номенклатура за *cluster of differentiation (CD),* бяха съставени от: насочени към универсално експресирани маркери (пан-левкоцитни, прогениторни -

CD45, HLA-DR, CD34), към специфични за B- и T- клетъчните линии антигени и от допълнителни, аберантни (нетипични за основната клетъчна линия) антигени (CD33, CD13, CD15). Бяха използвани МАТ към следните интрацитоплазмено (cyt) и повърхностно експресирани антигени: CD22, CD79a, TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase), CD34, MPO (myeloperoxidase), CD33, CD13, HLA-DR, CD15, CD14, CD19, CD20, CD10, CD3, CD7, CD1a, CD2, CD5, CD4, CD8, CD56 от BD Biosciences и Beckman Coulter Life Sciences, USA.

2.3.2. Цитогенетично изследване - При поставянето на диагнозата и в хода на лечението е осъществявана конвенционална цитогенетика върху свеж, нефиксиран материал – костно-мозъчен аспират с витални клетки, взет при стериални условия (съхранен в епруветка с антикоагулант Heparin Na). Препаратите са приготвяни с или без клетъчно култивиране. След фиксация са оцветявани по Giemsa banding method (G-banding). Хромозомните аномалии са описвани, в съответствие с International System for Human cytogenetic Nomenclature (187). За клоналност е приемано установяването на аналогична аномалия в поне две клетки.

2.3.3. FISH (fluorescence *in situ* hybridization) - осъществявана е при вероятност за реаранжиране на *MLL*-ген или хромозомни реаранжирания, характерни за Burkitt-лимфома. Методологията за FISH включва етапи на: денатурация на пробата и таргетната ДНК чрез инкубация при висока температура, хибридизация на пробата към хромозомния таргет, измиване за отстраняване на несвързаната проба и анализ чрез флуоресцентна микроскопия.

Цитогенетичните и FISH изследвания бяха осъществени в Лаборатория по цитогенетика и молекулярна генетика към Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания – София.

2.3.4. Молекулярно-генетично изследване - RT-PCR - беше използвана полимеразно верижна реакция след обратна транскрибция на РНК [Reverse Transcription (RT) Polymerase Chain Reaction (PCR)] със следните технологични етапи: *Изолиране на ядроносни клетки* - изследвани бяха ядроносни клетки, изолирани от 1 мл костно-мозъчен аспират, съхранен в епруветка с антикоагулант EDTA, след селективно отстраняване на еритроцитите с лизиращ разтвор и 2-кратно промиване с центрофугиране. *Екстракция на РНК* - От така получените ядроносни клетки беше екстрахирана тотална РНК чрез Trizol Reagent, спазвайки препоръките на производителя. Чистотата и концентрацията на утаената РНК беше определена спектрофотометрично. *Обратна транскрибция* - за синтез на комплементарна ДНК (кДНК) беше използване протокол, препоръчан от Европейската програма BIOMED 1. *Оценка на наличието на годна за анализ РНК и ефективността на обратната транскрибция – амплификация на $\beta$-Actin* - Наличието на годна за анализ РНК и ефективността на обратната транскрибция беше оценено чрез амплификация на $\beta$-Actin гена. *Изследване на фузионни гени, спецефично асоциирани с остра лимфобластна левкемия, съгласно протокола, препоръчан от европейската програма BIOMED-1* - при изследването на фузионните транскрипти беше използван унифициран подход при стандартизирани условия, основаващ се на двуетапна PCR (Nested Primers PCR), при която при първата амплификация се използват праймери A и B, специфични за съответните гени, а при втората реакция така получения продукт се реамплифицира със съответните праймери C и D.

RT-PCR беше осъществена в Лаборатория по цитогентика и молекулярна генетика към Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания - София.

## 3. Статистически методи

Основни понятия : *survival time (*време на преживяемост – *overall survival или OS* и време до събитие – *event free survival или EFS)* - интервалът от поставяне на диагнозата (или началото на лечение) до поява на събитието от интерес ( съответно смърт или рецидив, прогресия); *censoring (цензориране)* – цензорира се в случай на: липса на събитие от интерес за периода на наблюдение, отпадане на пациент от проследяването, невъзможно наблюдение, поради настъпване на други събития;

3.1. Анализи на преживяемостта (survival analysis), използвайки следните методи: *Kaplan-Meier* диаграма за визуализиране на кривите на преживяемост; *Log-rank test* за сраняване на кривите на преживяемост между две или повече групи; В нашето проучване тези методи се приложиха за сравняване на преживяемостта между отделните групи пациенти, разделени по различни променливи от категориен тип.

3.2. ***Cox proportional - hazards model*** е регресионен модел, чрез който се изследва асоциацията между времето на преживяемост и една или повече прогностични вариабилни. Използва освен категорийни и количествени вариабилни, оценява едновременното въздействие на няколко фактора върху преживяемостта, заедно със степента им на въздействие. *Cox*-моделът се изразява чрез линеарна мултиплена регресия, където коефициентът β отразява тежестта на въздействие на ковариатите, а чрез HR (*hazard ratio*) се съди за посоката на въздействие: HR>1 - ковариатата се асоциира с негативно въздействие върху продължителността на преживяемост, и обратно, т.е. в онкологията HR > 1 е лош прогностичен белег, HR < 1 е добър прогностичен белег.

3.3. Дисперсионен анализ (**Analysis of variance** - ANOVA) – установява се дали между изследваните явления (признаци) съществува

зависимост, без да се измерва теснотата или силата на зависимостта, както и нейната посока.

3.4. **Kruskal-Wallis test –** непараметричен анализ за разпределението между категорийни променливи. Сравняват се две или повече независими извадки, с еднакъв или различен размер.

3.5. Проверка на хипотези за равенство на две вероятности – ***Хи-квадрат анализ ($x^2$)*** или *chi-squared test* – използва се за проверка на хипотези, касаещи очакваното спрямо наблюдаваното разпределение на честоти на една или повече категории. Резултатът има статистическа значимост ($p$<0,01).

3.6. ***Тестът на Стюдънт – Фишер*** – метод за проверка на статистически значима разлика между средните аритметични/медианните стойности на две групи.

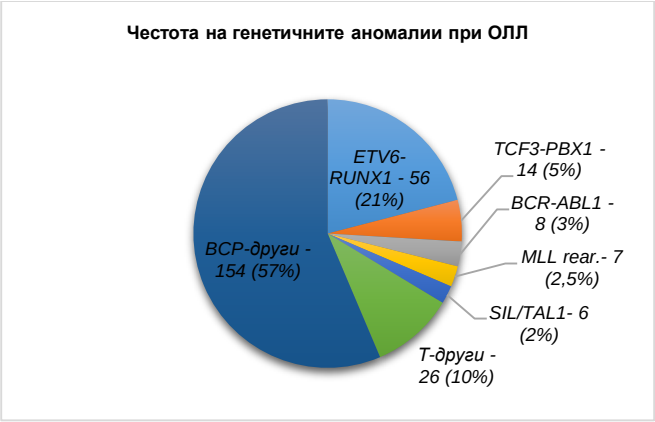
За извършване на анализите са използвани статистически софтуерни пакети: SPSS, версия 19.1, SPSS Inc, Chicago USA;STATISTICA 13.0, StatSoft Inc, USA. Статистическата обработка на данните е извършена със съдействието на: Доц. Милена Стойчева-Янчева, Катедра по Социална медицина и Здравен мениджмънт на МУ – София, Сектор Биостатистика и Медицинска информатика; Проф. Красимира Проданова, ръководител катедра „Математически анализ и диференциални уравнения“ на ТУ – София.

# Р Е З У Л Т А Т И

Получените резултати от проведените изследвания, в отговор на поставените цели и задачи, се обособиха в четири раздела:

**1. Резултати, отнасящи се до честотата и демографската характеристика на установените чрез RT-PCR генетични подгрупи ОЛЛ**

Периодът на наблюдение на групата е средно 82 месеца (0 - 179,8 месеца). От изследваните 271 деца с ОЛЛ, общият брой, положителни за изследваните с RT-PCR генетични аномалии, е 91 (34%) или 1/3 от всички случаи. Честотата на отделните генетични маркери, спрямо общия брой диагностицирани пациенти, е представена на фиг. 2. За краткост, групата пациенти с В-клетъчна прекурсорна левкеемия без молекулярен маркер, е означена като **BCP-други**, а тези, с Т-клетъчен фенотип без маркер, съотв. с **Т-други** (фиг.1).




**Фигура 1. Генетични подтипове при ОЛЛ – разпределение по честота**

Медианната възраст на изследваните 271 пациенти е 5 години (0 – 18). Диагностицирани са 166 момчета и 105 момичета, съотв. съотношението между половете е 1,6:1. Разпределението по възрастови групи е както следва: 7 деца (3%) на възраст под 1 година, 141 деца (52%) на възраст от 1 до < 6 години, 44 деца (16%) на възраст от 6 до < 10 години, 43 деца (16%) от 10 до < 15 години и 36 деца (13%) на възраст от 15 години и по - големи (табл. 2).

**Таблица 2. Демографска характеристика на пациентити по подгрупи**

| **Променливa** | **Общо пациенти** | **BCP-други** | ***ETV6-RUNX1* (+) пациенти** | ***TCF3-PBX1* (+) пациенти** | ***BCR-ABL1* (+) пациенти** | ***MLL-rear.*(+) пациенти** | ***SIL-TAL(+)* пациенти** | ***SIL-TAL1(-)* пациенти** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Брой пациенти | 271 | 154 | 56 | 14 | 8 | 7 | 6 | 26 |
| Пол, N<br>Момчета<br>Момичета | 166<br>105 | 89<br>65 | 31<br>25 | 11<br>3 | 7<br>1 | 3<br>4 | 6<br>0 | 19<br>7 |
| Възраст при диагнозата (години)<br>медиана<br>диапазон | 5<br>0 – 18 | 5<br>0 – 18 | 4<br>1 – 18 | 7,5<br>1 – 17,5 | 13<br>4 - 17 | 0,7<br>0 – 15 | 11,5<br>2 – 18 | 10,5<br>2 – 18 |
| Пол, N<br>Момчета<br>Момичета | 166<br>105 | 89<br>65 | 31<br>25 | 11<br>3 | 7<br>1 | 3<br>4 | 6<br>0 | 19<br>7 |

При проверка на равномерността на разпределението по възраст, според стойността на медианата за възрастта, между отделните генетични подрупи, (мултипараметричен анализ Kruskal – Wallis) се установи статистически значима разлика между:

- ✓ *ETV6-RUNX1*(+) подгрупа и *BCR-ABL1*(+) подгрупа – пациентите с Ph+ ОЛЛ са с по-голяма възраст в сравнение с пациентите с *ETV6-RUNX1*(+) ОЛЛ;

- ✓ *ETV6-RUNX1*(+) подгрупа и *SIL-TAL1(-)* пациенти – пациентите с *ETV6-RUNX1*(+) са на по-малка възраст в сравнение с пациентите с Т-клетъчна ОЛЛ без генетичния малкер *SIL-TAL1;*
- ✓ *ETV6-RUNX1*(+) подрупа и групата с *MLL- rear.*;
- ✓ пациентите с *MLL- rear.* и *BCR-ABL1(+)* подгрупа;
- ✓ пациентите с *MLL- rear*. и *SIL-TAL1(+)* група*;*
- ✓ пациентите с *MLL- rear*. и *SIL-TAL1(-)* пациенти;

  *MLL-реаранжиране* се установява най-често при пациенти в кърмаческа възраст, което определя установената статистически значима разлика в сранение с групите на *ETV6-RUNX1*(+), *BCR-ABL1(+)* и всички Т-клетъчни ОЛЛ.
- ✓ BCP-други и *SIL-TAL(-)* пациенти – пациентите BCP-ОЛЛ без маркер са на по-малка възраст в сравнение с Т-клетъчните без маркер; Данните са представени в табл. 3.

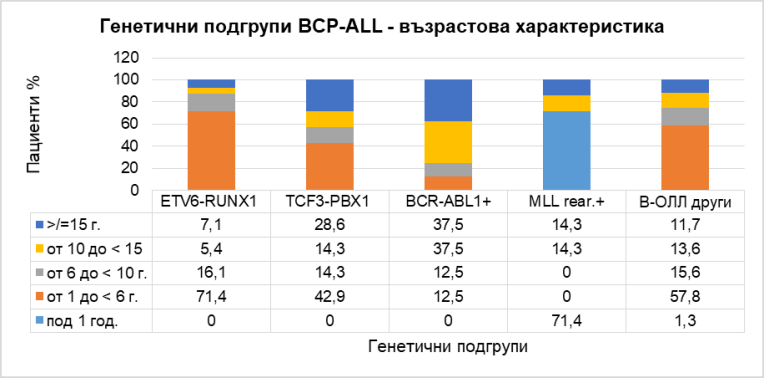
**Таблица 3. Мултипараметрично сравнение (по Kruskal – Wallis) за възраст**

| Multiple Comparisons p values (2-tailed); **AGE** (Spreadsheet1)<br>Independent (grouping) variable: marker Kruskal-Wallis test: H ( 6, N= 271) =33,85135 p =,0000 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **0 - R:130,86** | **1 - R:114,14** | **2 - R:147,50** | **3 - R:204,19** | **4 - R:66,643** | **5 - R:207,92** | **6 - R:188,42** |
| **0** | | 1,000000 | 1,000000 | 0,207430 | 0,713818 | 0,381006 | 0,011178 |
| **1** | 1,000000 | | 1,000000 | 0,049734 | 1,000000 | 0,112293 | 0,001366 |
| **2** | 1,000000 | 1,000000 | | 1,000000 | 0,542571 | 1,000000 | 1,000000 |
| **3** | 0,207430 | 0,049734 | 1,000000 | | 0,014630 | 1,000000 | 1,000000 |
| **4** | 0,713818 | 1,000000 | 0,542571 | 0,014630 | | 0,025107 | 0,005528 |
| **5** | 0,381006 | 0,112293 | 1,000000 | 1,000000 | 0,025107 | | 1,000000 |
| **6** | 0,011178 | 0,001366 | 1,000000 | 1,000000 | 0,005528 | 1,000000 | |

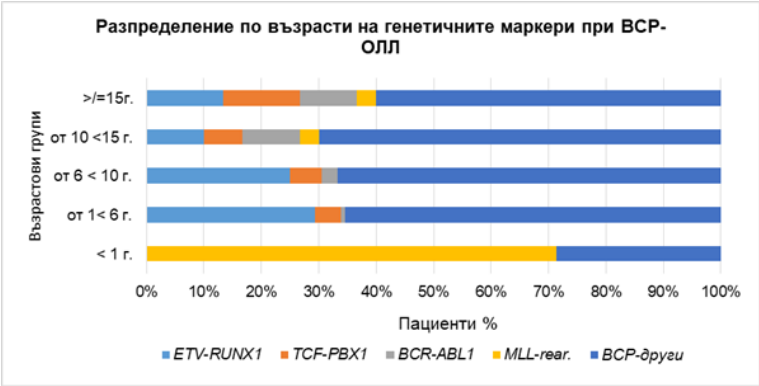
**0-BCP-други; 1- *ETV6-RUNX1*(+); 2- *TCF3-PBX1* (+); 3- *BCR-ABL1* (+); 4- *MLL- rear.*(+); 5- *SIL-TAL1(+);***
***6 - SIL-TAL1(-)***

Пациентите с BCP-ОЛЛ са преобладаващата част 239 (88%) от всички 271 случаи, с медианна възраст 5 години (1 мес. - 18 год.) и разпределение по пол - 141 момчета/98 момичета, в съотношение 1,4:1. Очертават се

тенденции по отношение на възрастово и полово разпределение на отделните генетични маркери. Възрастовото разпределение на изследваните фузионни гени е както следва: 71% от децата с *MLL-реаранжиране* са в кърмаческа възраст, като това е единствената аномалия, която се установява във възрастта под 1 година. В най-многобройната възрастова група – между 1 и < 6 год. (136 деца, 57%) - при 1/3 от пациентите се установява генетична аномалия – в 29% това е *ETV6-RUNX1,* в 6 случая (4%) *TCF3-PBX1* и само при един случай (1%) *BCR-ABL(+).* При следващата възрастова група (6 - 10 г.) разпределението на честотата на изследваните молукулярни маркери наподобява това при цялата група – 9 случая (25%) на *ETV6-RUNX1 (+)ОЛЛ*, 2 (5%) на *TCF3-PBX1 (+)ОЛЛ* и 1 (3%) на *BCR-ABL1(+) ОЛЛ,* не се установява само *MLL-реаранжиране.* При по-големите деца (възраст над 10 години) тенденциите са за значително намаляване честотата на *ETV6-RUNX1(+)ОЛЛ* и относително увеличаване на тази на останалите маркери (фиг. 2 и фиг.3).

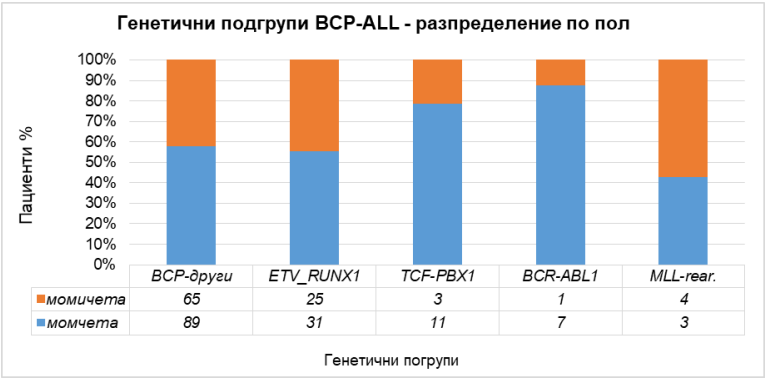



**Фигура 2. Генетични подгрупи BCP-ALL – възрастова характеристика**




**Фигура 3. Разпределение по възрасти на генетичните маркери при BCP-ALL**

При сравняване на честотата на изследваните фузионни гени при BCP–ОЛЛ между групите по пол, при момичета се установява сравнително по-висока честота на *ETV6-RUNX1(+) ОЛЛ* и отчетливо по-висока честота на *MLL*-реаранжирани ОЛЛ. Обратно, при мъжкия пол честотата на *TCF3-PBX1 (+) ОЛЛ* и особено на *BCR-ABL1(+) ОЛЛ* е значително по-висока (фиг.4).




**Фигура 4. Генетични подгрупи BCP-ОЛЛ – разпределение по пол**

При диагностицираните 32 пациента с Т–ОЛЛ, възрастовият диапазон е 2 год. 1 мес. – 17 год. 11 мес. с медиана 10,5 години. Съотношението между половете е 3,6:1 (25 момчета и 7 момичета). Установени са 6 *SIL-TAL1+* случая (19% честота в групата). При 60% от случаите възрастта е над 10 год. (медианна възраст 11,5) и всички диагностицирани *SIL-TAL1+* случаи са деца над 6 год. и от мъжки пол.

## 2. Резултати, отнасящи се до корелациите на основни клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики и наличие на най-честите молекулярно-генетични аномалии

2.1. Клинична картина - включва широк спектър от клинични признаци и симптоми, повечето от които не са специфични. Чрез констелацията с данните, получени от насочените рутинни и специализирани лабораторни и образни изследвания, могат да се очертаят профили на отделните генетични подтипове на заболяването в иначе хетерогенната група на ОЛЛ. В табл. 3 е представена честотата на отделни клинични прояви на основното заболяване при изследваните генетични подгрупи.

**Таблица 3. Клинични прояви в дебюта на заболяването**

| **Променлива** | **Общо пациенти** | ***ETV6-RUNX1* (+) пациенти** | ***TCF3-PBX1* (+) пациенти** | ***BCR/ABL1* (+) пациенти** | ***MLL*-реаранж (+) пациенти** | **BCP-други** | ***SIL-TAL1+* пациенти** | ***SIL-TAL1-* пациенти** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** |
| **Брой пациенти** | 271 (100) | 56 (100) | 14 (100) | 8 (100) | 7 (2,5) | 154 (100) | 6 (100) | 26 (100) |
| **ЦНС-ангажиране** | 7 (2,5) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (14) | 2 (1) | 0 (0) | 4 (15) |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Бъбречна инфилтрация** | 11 (4) | 0 (0) | 1 (7) | 0 (0) | 1 (14) | 6 (4) | 0 (0) | 3 (12) |
| **Остеоартралгии** | 80 (30) | 19 (34) | 7 (50) | 3 (38) | 0 (0) | 48 (31) | 1 (17) | 2 (8) |
| **Медиастинално ангажиране** | 23 (8) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 3 (50) | 20 (77) |

2.2. В пакета рутинни лабораторни изследвания, резултатите от пълната кръвна картина (ПКК) са първите и основни, насочващи към хематологично заболяване. Началният левкоцитен брой (WBC) остава един от класическите рискови фактори, определящи стратификацията на пациентите и съответно адаптирането на терапевтичния режим (табл.4)

**Таблица 4. Левкоцитен брой, хемоглобин и тромбоцити при поставяне на диагнозата**

| **Променлива** | **Общо пациенти** | ***ETV6-RUNX1* (+) пациенти** | ***TCF3-PBX1* (+) пациенти** | ***BCR/ABL1* (+) пациенти** | ***MLL*-реаранж (+) пациенти** | **BCP-други** | ***SIL-TAL1* + пациенти** | ***SIL-TAL1*- пациенти** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** | **N (%)** |
| **Брой пациенти** | 271 (100) | 56 (100) | 14 (100) | 8 (100) | 7 (2,5) | 154 (100) | 6 (100) | 26 (100) |
| **Левкоцити (x10³/mm³)**<br>**<20**<br>**20 до <50**<br>**50 до <100**<br>**>100** | <br>163(60<br>45(17)<br>23 (8)<br>40(15) | <br>39(70)<br>7 (13)<br>6 (11)<br>4 (7) | <br>6 (43)<br>4 (29)<br>3 (21)<br>1 (8) | <br>2 (25)<br>3 (38)<br>0 (0)<br>3 (38) | <br>1 (14)<br>1 (14)<br>0 (0)<br>5 (71) | <br>104(68<br>24(16<br>14(10<br>7(11) | <br>2 (33)<br>0 (0)<br>1 (17)<br>3 (50) | <br>9 (35)<br>6 (23)<br>4 (15)<br>7(27) |

2.3. Имунофенотипизация - при всички пациенти чрез флоуцитометрия е определена клетъчната принадлежност на бластната популация – 239 пациента (88%) са с В-клетъчен имунофенотип, а останалите 32 (12%) – с Т-клетъчна левкемия. От положителните за *ETV6-RUNX1* ОЛЛ 56

пациента, за коекспресия на миелоидни маркери (CD13 и CD33) са изследвани 44 (79%) пациента. При 14 (22%) от пациентите се установява коекспресия и на двата миелоидни маркера, при 13 (30%) от пациентите се установява коекспресия на един от маркерите, или общо при 27 (61%) пациента е налична коекспресия на миелоидни маркери. За сравнение, в групата BCP – други коекспресия се намира при 33% от случаите. Отличителният за групата *TCF3-PBX1(+)* по-зрял имунофенотип със CD34- бласти, се установи при 12 (92%) от положителните за маркара 13 (за един от пациентите липсавт данни). Характерен за групата на *MLL-реар.* ОЛЛ по-незрял (про-В) имунофенотип със CD10- бласти се установи при всички 7 (100%) от пациентите.

2.4. Цитогенетика - успешно цитогенетично изследване е проведено при 101 от случаите (37%). В групата с положителен генетичен маркер, цитогенетични резултати са отчетени при 34 (37%) пациенти. Допълнително, един от случаите с *MLL- реаранжиране* е доказан само с FISH – проба, без да може да се идентифицира партньорския ген.

## 3. Резултати, отнасящи се до влиянието на изследваните генетични маркери върху отговора към лечение и преживяемостта при деца с ОЛЛ, в условията на унифициран лечебен протокол.

Направихме сравнителен анализ за отговора към лечение между всяка от групите с генетичен маркер, съпоставена с групата без установен маркер, съответно за В-клетъчните и Т-клетъчните ОЛЛ (табл.5)

**Таблица 5. Сравнителен анализ за отговор към лечение**

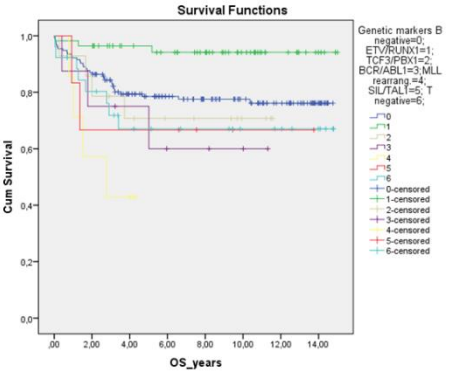
| Промен Лива | Общо пациенти | *ETV6-RUNX1* (+) пациенти | *TCF3-PBX1* (+) пациенти | *BCR-ABL1* (+) пациенти | *MLL-реаранж* (+) пациенти | BCP-други | *SIL-TAL1(+)* пациенти | *SIL-TAL1(-)* пациенти |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

| | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) | N (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Брой пациенти** | 271 (100) | 56 (100) | 14 (100) | 8 (100) | 7 (2,5) | 154 (100) | 6 (100) | 26 (100) |
| **Отговор ден 8** | | | | | | | | |
| **GPR** | 220(81) | 52(93) | 8 (57) | 5 (63) | 4 (57) | 141(92) | 3(50) | 19(73) |
| **PPR** | 51(19) | 4 (7) | 6 (43) | 3 (37) | 3 (43) | 13(8) | 3(50) | 7(27) |
| ***p*¹** | | *>0,05* | *<0,05* | *<0,05* | *<0,05* | | *<0,05* | |
| **BFM рискови групи** | | | | | | | | |
| **SR** | 44(16) | 13(23) | 2(14) | 0 | 0 | 29(19) | 0 | 0 |
| **MR** | 157(58) | 36(64) | 6(43) | 0 | 0 | 93(60) | 3(50) | 19(73) |
| **HR** | 70(26) | 7(13) | 6(43) | 8(100) | 7(100) | 32(21) | 3(50) | 7(27) |
| ***p*¹** | | *>0,05* | *<0,05* | *<0,05* | *<0,05* | | *<0,05* | |
| **Ден 33 (ремисия)** | | | | | | | | |
| **Да** | 264(96) | 55(98) | 13(93) | 8(100) | 6(86) | 148(96) | 5(83) | 24 (92) |
| **Не** | 12(4)[2] | 1 (2)[3] | 1(7) | 0 | 1(14) | 6(4)[4] | 1(17) | 2 (8)[5] |
| ***p*¹** | | *>0,05* | *>0,05* | *>0,05* | *>0,05* | | *>0,05* | |

[1]- всяка генетична подгрупа е сранена с групата без молекулярен маркер от същия имунофенотип; [2]- в т.ч. 7 случая на ранна смърт в хода на индукция; [3] - в т.ч.1 случай на ранна смърт; [4] - в т.ч. 4 случая на ранна смърт; [5]- в т.ч. 2 случая на ранна смърт

Посредством еднофакторен анализ в зависимост от факторите: наличие на генетичен фактор, пол, имунофенотип, възрастови групи по критериите на NCI, начални левкоцити в диапазони по критериите на NCI, рискови групи по критериите на NCI, възрастови групи по критериите на BFM, начални левкоцити в диапазони по критериите на BFM, рискови групи по критериите на BFM, отговор към лечение на ден 8, ден 15 и ден 33, идентифицирахме фактори, които имат отношение към прогнозата.

Установено бе, че съществува статистически значима разлика ($p < ,004$) в преживяемостта на отделните генетични подгрупи в зависимост от наличието на молекулярни аномалии (*ETV6/RUNX1, TCF3/PBX1, BCR/ABL1, MLL-реар., SIL/TAL1*)(фиг.5).




| OS (5-год.) |
|---|
| 0 – 78,5 ±0,034 |
| 1 – 96,4 ± 0,025 |
| 2 – 70,7 ± 0,124 |
| 3 – 60,0 ± 0,182 |
| 4 – 42,9 ± 0,187 |
| 5 – 66,7 ± 0,192 |
| 6 – 67,0 ± 0,096 |
| ***p < 0,004*** |

**Фигура 5. OS (5-год.) на отделните генетични подгрупи**

Статистически значима разлика (*p < 0,001)* се установи също между OS и възрастта, начален левкоцитен брой по NCI (*p < 0,001*), рисковата група по NCI (*p <0,001)*, рисковата група по BFM критерии (*p <0 ,001*), отговора на терапия на ден 8 (*p <0,001*), отговора на терапия на ден 15 (*p <0,002*), постигането на ремисия на ден 33 (*p < 0,001*).

За изследване на стойността на молекулярния маркер като фактор със самостоятелна (независима) прогностична стойност за преживяемостта (OS) се извърши мултивариационен анализ (Proportional hazard (Cox) regression). Наличието на *ETV6-RUNX1* се проявява като добър прогностичен фактор (коефициент *Beta* с отрицателен знак) със независима стойност (*p=0,008*), за разлика от възрастта, също с независима стойност, но с негативно прогностично значение (коефициент *Beta* – с положителен знак). Данните са представени в табл. 6.

**Таблица 6. Мултивариационен анализ за *ETV6-RUNX1*(+) ОЛЛ**

| | ***Beta*** | ***t-value*** | ***Wald - Statist.*** | ***p*** | ***Risk ratio*** | ***Risk ratio 95% lower*** | ***Risk ratio 95% upper*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **ETV6-RUNX1+** | -1,6020 | -2,64889 | 7,016641 | 0,008080 | 0,201502 | 0,061589 | 0,65926 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Възраст (години)** | 0,0778 | -1,82250 | 3,321516 | 0,048388 | 0,925113 | 0,850825 | 1,00589 |
| **Левк. (x10³/mm³)** | 0,0077 | 1,33890 | 1,792657 | 0,180612 | 0,992350 | 0,981257 | 1,00357 |
| **MRD ден 8** | 0,6523 | 0,94243 | 0,888168 | 0,345981 | 0,520821 | 0,134117 | 2,02251 |
| **BFM Risk group** | 0,5724 | 1,66226 | 2,763111 | 0,096470 | 1,772554 | 0,902562 | 3,48114 |

Chi-square = 20,4172 df = 11 p = ,03998

При Т- ОЛЛ, вероятността за 5-годишна OS при *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ е 66,7 ± 0,19 и е идентична с тази при *SIL-TAL1(-)* ОЛЛ - 67,0 ± 0,1 (*p < 0,916*) . Същото се отнася и за EFS (66,7 ± 0,19 с/у 60,4 ± 0,04, *p=0,72*).

## 4. Резултати при проследяване чрез полуколичествена двуетапна RT-PCR на минимална остатъчна бластоза (т. нар. МРБ) по диагностицирани фузионни гени.

В нашето проучване за мониториране на МРБ бяха използвани нивата на експресия на установените при диагнозата фузионни гени на различни етапи в хода на терапията. Проследявани са общо 80 пациента от всички 91 (88%) с диагностицирани генетични аномалии, с разпределение по генетични подгрупи. Количествената оценка на мониторираните нива на експресия на фузионните гени е адаптирана чрез скала, както следва: - на I-ви етап амплификация - положителна (+) реакция, съответстваща на повече от $1.10^{-2}$ или >1% положителни клетки;

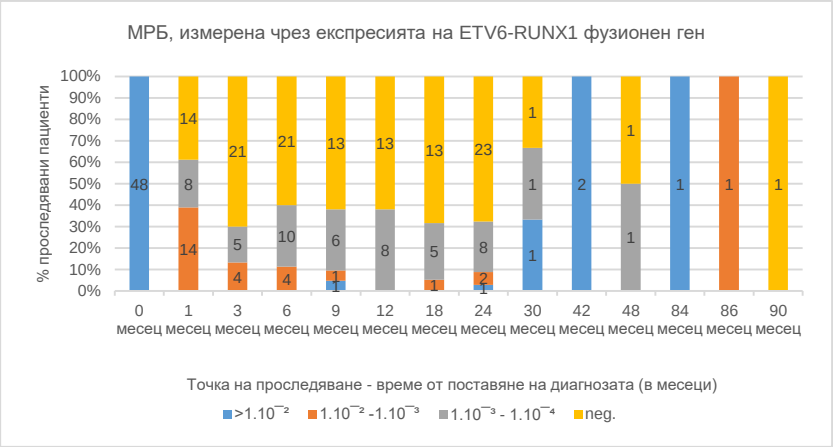
- на I-ви етап амплификация слабо положителна и II-ри етап реамплификация положителна реакция, съответстващи на приблизително $1.10^{-2}$ до $1.10^{-3}$ или <1 - 0,1% положителни клетки;

- на II-ри етап реамплификация - слабо положителна реакция, съответстваща приблизително на $1.10^{-3}$ до $1.10^{-4}$ или <0,1 - 0,01% положителни клетки;

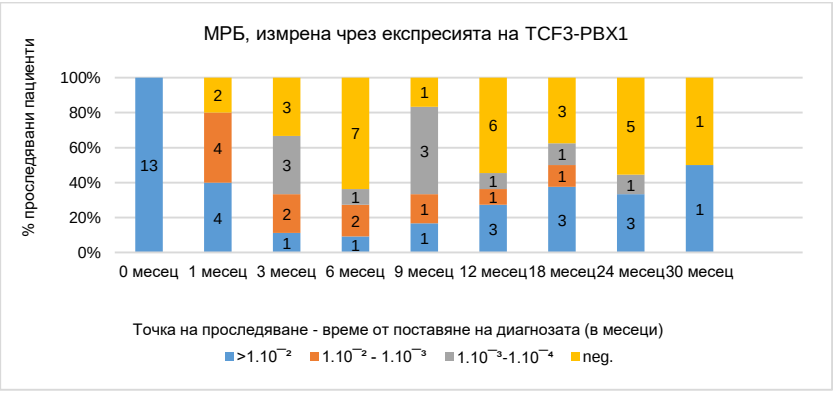
- на II-ри етап реамплификация - отрицателна реакция, съответстваща на $<1.10^{-4}$ или не се откриват положителни клетки;

Според нивата на МРБ, измерени чрез полуколичествен анализ на установената експресия на фузионните гени, пациентите се стратифицираха в четири групи: пациенти с нива на МРБ над $1.10^{-2}$; пациенти с нива на МРБ под $1.10^{-2}$ и над $1.10^{-3}$; пациенти с нива на МРБ под $1.10^{-3}$ и над $1.10^{-4}$; пациенти с негативирана МРБ (молекулярна ремисия).

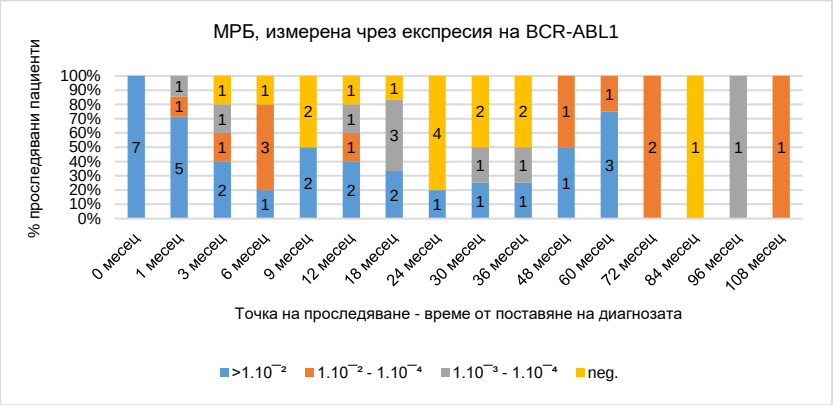
За целия период на наблюдение, нивото на МРБ е измерено чрез експресията на фузионния ген с RT-PCR, при 48 пациента (86%) от диагностицираните 56 с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ. За периода на наблюдение, при диагностицираните 14 пациента с *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ, нивото на МРБ е проследявано при 13 (93%). Допълнително, в един случай аномалията е установена в момента на рецидива и проследяването е отчитано след 12-ия месец. При 7 пациента (88%) от диагностицираните 8 пациента с *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ, нивото на МРБ е проследявано от момента на диагнозата през целия период на лечение, а при осмия пациент аномалията е установена в момента на рецидива – 60-ти месец от началото на заболяването. При диагностицираните 7 пациента с *MLL* - реаранжиране, нивото на МРБ, е проследявано при 6 пациента (86% ). За периода на наблюдение, при диагностицираните 6 пациента със *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ, нивото на МРБ, е проследявано при 5 (83%) от всички.



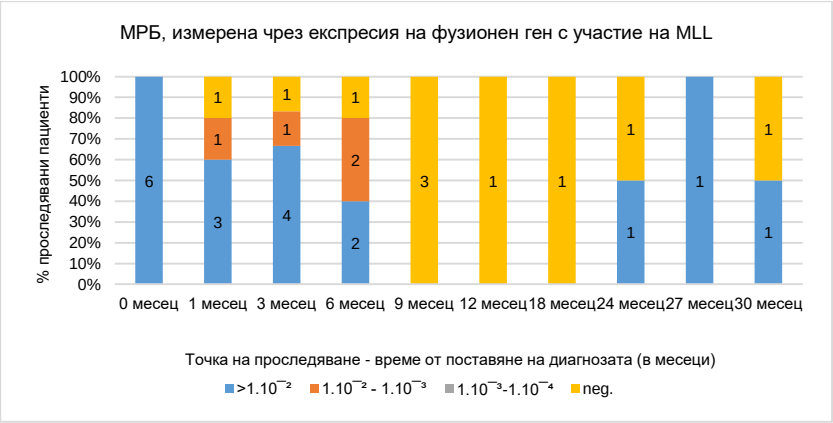

**Фигура 6. МРБ при групата с *ETV-RUNX1* фузионен ген**



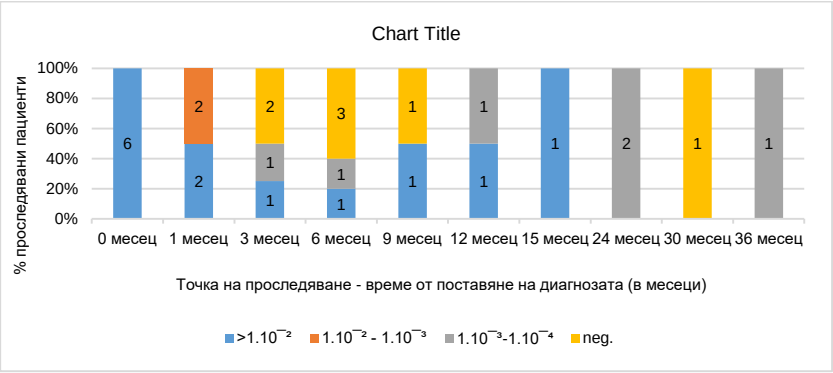

**Фигура 7. МРБ при групата с *TCF3-PBX1* фузионен ген**




**Фигура 8. МРБ при групата с *BCR-ABL1* фузионен ген**




**Фигура 9. МРБ при групата с *MLL-peap.***



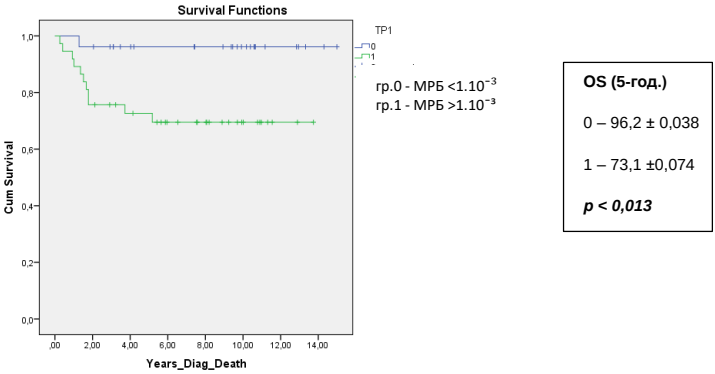

**Фигура 10. МРБ при групата със *SIL-TAL1* фузионен ген**

За нашата група пациенти, значението на мониторирането на МРБ, измерена чрез нивото на експресия на фузионни гени, се определи чрез еднофакторен анализ със сравняване на кривите на преживяемост общо за всички пациенти, положителни за някой от фузионни гени (*ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1, MLL-rear., SIL-TAL1*). За целта, пациентите бяха разпределени в две групи в зависимост от нивото на МРБ в две точки на проследяване, както следва:

- след края на индукционната терапия (или 33-ти ден), с измерена МРБ при общо 63 пациента, като 1) група 0 са пациенти със слабо положителна реакция на II-ри етап реамплификация, съответстваща приблизително на положителни клетки $1.10^{-3}$ до $1.10^{-4}$ или с отрицателна реакция, съответстваща на $<1.10^{-4}$ – общо 26 пациенти (41%); 2) група 1 са всички останали пациенти с по-високи нива на МРБ – общо 37 пациенти (59%).
- след края на консолидационната фаза (или 3-ти месец), с измерена МРБ при 71 пациента, като: 1) група 0 са пациенти с отрицателна реакция, съответстваща на $<1.10^{-4}$ положителни клетки – общо 39 (55%); 2) група 1 са всички останали пациенти с по-високи нива

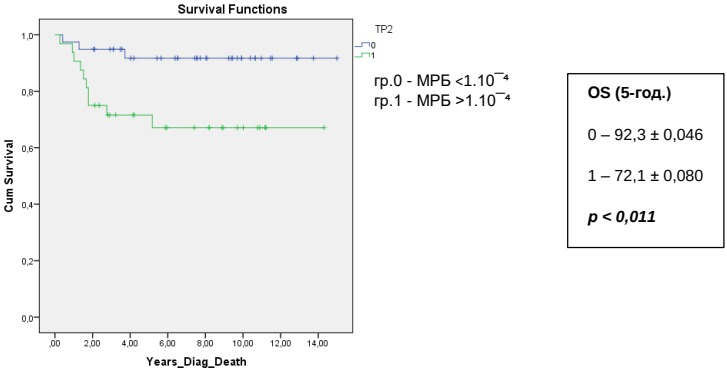
на МРБ – общо 32 (45%) пациенти.

При сравняване на кривите на преживяемост (OS и EFS) между двете групи пациенти, в зависимост от нивото на МРБ след края на индукционната фаза, се отчете статистически значима разлика.




**Фигура 11. Сравнителен анализа на OS между групите с различни нива МРБ след края на индукция**

Статистически значима разлика се установи и при сравняване на кривите на преживяемост (OS и EFS) между двете групи пациенти, в зависимост от нивото на МРБ в края на консолидационната фаза.




**Фигура 12. Сравнителен анализа на OS между групите с различни нива МРБ след края на консолидация**

# О Б С Ъ Ж Д А Н Е

## 1. Резултати, отнасящи се до честотата и демографската характеристика на установените чрез RT-PCR генетични подгрупи ОЛЛ пациенти, лекувани в КДКХО – София.

### 1.1. Честота на генетичните подгрупи

1.1.1. *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ - След идентифициране и секвениране на фузионните гени и въвеждането на други диагностични техники (FISH, RT-PCR, Southern blot), тази генетична аномалия се оказва най-честата транслокация, срещаща се при 20-25% от педиатричните BCP-ОЛЛ (табл.11)

**Таблица 11. Честота на *ETV6-RUNX1(* +) ОЛЛ в различни страни**

| Автор | Година | Страна | *ETV6-RUNX1* (+ ) ОЛЛ (%) |
|---|---|---|---|
| **Ozbek et al. (196)** | 2003 | Турция | 28 |
| **Rubnitz et al. (197)** | 1997 | САЩ | 26 |
| **Avigad et al. (198)** | 1999 | Израел | 24 |
| **Artigas A CG et al. (199)** | 2006 | Чили | 23 |
| **A Borkhardt (200)** | 1997 | Германия, Италия | 22 |
| **Trka J et al. (201)** | 1999 | Чехия, Словакия | 26 |
| **Юрукова и съавт.(250)** | **2019** | **България** | **23** |
| **Magalhaes et al. (202)** | 2000 | Бразилия | 20 |
| **Liang DC et al. (203)** | 2002 | Тайван | 18 |
| **Tsang et al. (204)** | 2001 | Китай | 18 |
| **Martinez-Ramirez A. (205)** | 2001 | Испания | 17 |
| **Jamil et al. (206)** | 2000 | САЩ | 17 |
| **Spathas et al. (207)** | 1999 | Великобритания | 13 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Eguchi-Eshimae et al. (208)** | 1998 | Япония | 10 |
| **Chopra et al. (209)** | 2015 | Индия | 7 |
| **Carranza C et al. (52)** | 2013 | Гватемала | 5 |
| **Garcia-Sanz et al. (210)** | 1999 | Испания | 3 |

Публикуваните данни демонстрират различия в регионалното разпределение на отделните генетични субтипове ОЛЛ, в частност *ETV6-RUNX1+* ОЛЛ, като отражение на генетични, расови и географски вариации сред различните популации. Съпоставянето на данните от различните проучвания е трудно, поради подчертаната разнородност на описваните групи пациенти – хетерогенни по численост, и особено по възрастова характеристика. Честотата на аномалията значително намалява с нарастване на възрастта. Намерената в България честота на ETV6-RUNX1(+) ОЛЛ е съпоставима с тази, описвана при другите европейски страни, поставяйки я на първо място по честота сред острите левкемии в детската възраст.

1.1.2. *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ - съобщаваните данни за честота на *TCF3-PBX1 (+)* ОЛЛ не се различават съществено между отделните групи и най-често варира в диапазона 2–6% от В-клетъчните ОЛЛ при деца. Генотипът се установява със сигнификантно по-голяма честота при афро-американци. Намерената честота в нашата група пациенти не се различава и е съпоставима с литературните данни.

1.1.3. *BCR-ABL1*(+) ОЛЛ или Филаделфия позитивна (Ph+) ОЛЛ - Характерно за *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ е значителното нарастване по честота с повишаване на възрастта на пациентите. Така от честота 2-5% при деца, процентът на Ph+ ОЛЛ нараства до 13% във възрастта 15-24 години, до 31% във възрастта 25-34 години, достигайки до 44% при 35-44 годишните. Ето защо, съобщаваните честоти са в много силна зависимост от възрастовата характеристика на контингента пациенти. Сравнително по-

висока честота за детската възраст (8-11%) се съобщава в Източна Азия. Честотата на Ph+ ОЛЛ в нашата група пациенти е сходна на съобщаваната за европейските страни, САЩ и частично азиатските страни.

1.1.4. *MLL-реар.*- подобно на *BCR-ABL+* ОЛЛ, честотата на *MLL*-реаранжираните ОЛЛ нараства с възрастта, достигайки 11.8% при 15–24 годишните и 19.8% между 25 и 44 години. По-специфична особеност е, че аномалията е много разпространена до 6 месечна възраст (50-70% от кърмаческите ОЛЛ), след което честотата й значително намалява и достига 2%-3% за детската възраст. Въпреки че описваната при нас група с *MLL-реар.* е малка, честотата на аномалията, съпоставена с цялата група изследвани пациенти, е в очаквани стойности – 3%, като представлява около 70% от случаите в групата пациенти, диагностицирани под 1 година (5/7).

1.1.5. del1p32*(SIL-TAL1)* - *г*рупата на Т-ОЛЛ е изключително хетерогенна, на базата на досега описаните генетични анализи. В нашата група пациенти, случаите на имунофенотипно доказани Т-ОЛЛ са изследвани за *SIL-TAL1* молекулярен маркер и установената честота от 19% е съпоставима със съобщаваната (9 - 26%) в други студии.

Въпреки, че ОЛЛ е най-честотото онкологично заболяване в детската възраст, няма особена яснота за етиологията на заболяването. Ето защо, регионалните различия в честотата и вариантите на левкемията представляват особен интерес, поради предположението, че се дължат на взаимодействието между факторите, отговорни за процеса на левкемогенезата. От една страна това е генетичната предиспозиция, в т.ч. вродените генетични синдроми, а от друга - фактори на околната среда. В основата на популационните и фенотипни различия е генен полиморфизъм, който е резултат от случайно възникващи мутации и

селектирането им, главно под въздействие на външни фактори от обкръжението като радиационен фон, химически вещества, инфекции, имащи географско-регионални вариации. Разкриването на интимните механизми в процеса на взаимодействие би допринесло не само за изясняване на етиологията на онкологичните заболявания, но вероятно ще отговори на въпроси, свързани с индивидуалния отговор на лечение, възникването на резистентност и рецидиви, а също идентифициране на инструменти за превенция.

Анализирайки демографската характеристика на генетичните подгрупи от нашето проучване бихме могли да очертаем следните тенденции:

- ✓ в кърмаческата възраст вероятността да се установи друг генетичен маркер, освен *MLL- реаранжиране* е практически нищожна;
- ✓ във възрастовия диапазон от 1 до 9 години честотата на установяваните генетични маркери наподобява до голяма степен общото разпределение;
- ✓ над 10 годишна възраст нараства вероятността за високорискова левкемия, каквито са случаите на Т-ОЛЛ и Ph(+) ОЛЛ;
- ✓ пациентите с В-кл. ОЛЛ са на по-малка възраст в сравнение с пациентите с Т-кл. ОЛЛ;
- ✓ при разпределението по пол се отбелязва значително преобладаване на мъжкия в групите с *TCF3-PBX1, BCR-ABL1* и *SIL-TAL1,* за разлика от пациентите без маркер и тези с *ETV6-RUNX1,* при които е характерно общото за детската ОЛЛ разпределение. Групата с *MLL-реаранжиране* е твърде малка, за да може да се потвърди действително доминиране на женския пол и да се очертаят зависимости.

**2. Резултати, отнасящи се до корелациите на основните клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики с**

**наличието на най-честите молекулярно-генетични аномалии при деца с ОЛЛ.**

2.1. *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ - Нашите пациенти с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ оформят група, която по характеристики отговаря на страндартно-рискова по NCI/Rome критериите. Характеризират се в 88% от случаите с възраст в диапазона над 1 и под 10 год. (респ. медиана 4 години) и в 83% от случаите - с начален левкоцитен брой под 50 000/мм³. Статистически значима е разликата във възрастта, в сравнение с високо рисковите *MLL*-rear. и *BCR-ABL1*(+) ОЛЛ. За групата не е характерна начална екстрамедуларна левкемична инфилтрация, в т.ч. и начално ЦНС ангажиране. При 100% от случаите имунофенотипизацията доказва В-клетъчна принадлежност, а в над 60% от случаите в нашата група се открива аберантна експресия на един или повече миелоидни маркери (CD33, CD13). При нито един от случаите с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ не се открива и друга от аномалиите с най-голяма значимост – t(9;22), t(1;19), 11q23. При нашата група, тази констелация от характерна възраст, начален левкоцитен брой, имунофенотип е в унисон с данните от литературата. Съществено е да се отбележи, че сравнителният анализ по клинични и лабораторни критерии не открива статистически значима разлика между *ETV6-RUNX1(+)* пациентите и тези без генетичен маркер, така че без молекулярно-генетично изследване те не биха могли да бъдат различени в дебюта. Изключение могат да направят някои имунофенотипни особености, без да бъдат патогномоничен критерий.

От друга страна, значимата положителна разлика в преживяемостта на *ETV6-RUNX1(+)* групата, спрямо останалите, прави идентификацията й по генетичен маркер особено важна още в началото на терапевтичния план, с оглед планиране на интензивността на

лечението. Още повече, че т.нар. група BCP-други остава разнородна, а според данните от изследвания с най-новите техники, сред тези случаи е съществен дялът на остри левкемии, протичащи като високо-рискови, каквато е *Ph-like* ОЛЛ – неразпознаваема с възможностите на конвенционалните диагностични средства, но изискващи интензивно лечение и стриктно мониториране на терапевтичния отговор.

2.2. *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ - в нашето проучване, по подобие на други проучвания (70), групата *на TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ се асоциира с високо-рискови фактори: възраст над 10 години (43% от пациентите) и левкоцитоза >50 000/мм³ (30%). Въпреки че не се отчита статистически значима разлика в сравнение с групата BCP-други, такава тенденция би могла да се очертае. В групата е значим превесът на мъжкия пол. Остеоартралгичният синдром е със сигнификантно по-висока честота и би могъл да се определи като типичен за тази група, като не разполагаме с подоби данни от литературата. За нашата група пациенти, не отчитаме по-често ЦНС-ангажиране в дебюта на заболяването, за разлика от съобщения на някои автори. По отношение на лабораторната констелация, се отбелязва тежката тромбоцитопения, предполагаща по-интензивна трансфузионна програма за такива пациенти още при поставяне на диагнозата. Характерният за групата пре-B-имунофенотип със CD34- бласти се доказва и за нашата група пациенти, без да се установява аберантна експресия на миелоидни маркери.

2.3. *BCR-ABL1*(+)ОЛЛ – Филаделфия позитивна (Ph+) ОЛЛ - отличават се с по-висока медиана на възрастта - 75% от пациентите попадат във високо-рисковата група по критерия за възраст над 10 години. Честотата на аномалията в тази възрастова група достига 10%. Характерни са подчертаната левкоцитоза, успоредно с високостепенна тромбоцитопения и анемичен синдром, като еволютивни белези на левкемичния процес.

2.4. *MLL- реаранжирана* ОЛЛ - най-ясно очертани, със специфичен облик, са пациентите с MLL-реаранжирана ОЛЛ. Нашата група напълно съответства на описваните в други проучвания характеристики: кърмаческа възраст, прояви на екстрамедуларна инфилтрация с ЦНС и бъбречно ангажиране. Често е хиперлевкоцитарното начало, без изразена анемия и тромбоцитопения, поради бързата експанзия на левкемичния клон в периферната кръв, което изпреварва развитието на хемопоетична недостатъчност. Остеоартралгичен синдром не е надежден симптом в тази възрастова група. Имунофенотипната характеристика отразява специфичния по-ранен матурационен стадий на бластната популация (про-В) със CD10- бластна популация, допълнително аберантна експресия на миелоидни маркери, както и на NG2 (neuron-glial antigen). Такава аберантна експресия е характерна и за нашата група пациенти – налична при 5 (71%) деца, като това са всички деца от кърмаческата възраст, докато CD10- е бластната популация при всички (100%) случаи.

2.5. *SIL-TAL1*(+) ОЛЛ -Пациентите с Т-клетъчна ОЛЛ и положителен *SIL-TAL1* маркер са подчертано по-големи деца, в нашата група само момчета, с изразена левкоцитоза и хиперлевкоцитоза. За разлика от *SIL-TAL1*(-) случаи, с характерното ангажиране на ЦНС и медиастинум, в групата няма случай на начално ЦНС-засягане, а медиастинално ангажиране е статистически значимо по-рядко (50% срещу 77% или p=0,002). С така очертания профил, всички пациенти са високо-рискови по критериите на BFM - терапевтичния протокол.

**3. Резултати, отнасящи се за значението на установените с RT-PCR генетични аномалии за отговора към лечение и прогнозата**

Получените резултати при сравняване на отговора към лечение на ден 8, 15 и 33-ти потвърждават доброто терапевтично повлияване, наблюдавано и описано и от други автори за групата, положителна за ETV6-RUNX1(+), в сравнение с останалите генетични подгрупи. Въпреки, че отговорът към лечение не оказва пряко влияние върху стратификацията при BCR-ABL1(+) и MLL-реар. ОЛЛ, тъй като те по дефиниция са високорискови, налице е подчертано по-лош отговор при тези цитогенетични групи, както и при TCF3-PBX1(+) ОЛЛ. За последната цитогенетична подгрупа, към която принадлежат случаи, квалифицирани като невисокорискови, които в последствие рецидивират, и то, рано, използваните стратификационни схеми вероятно не са съвсем удачни, което налага допълването им с по-надеждни предиктори.

Характерната висока честота на постигане на хематологична ремисия за педиатричната ОЛЛ се потвърждава и за цялата наша група пациенти, както и за отделните подгрупи, разделени според наличие на гентичен маркер.

Чрез анализ на преживяемостта по метода на Kaplan-Meier, за групата наблюдавани пациенти, се потвърди влиянието на класическите прогностични фактори – възраст и начален левкоцитен брой. Групите бяха анализирани както по общоприетите критерии за прогностични групи на (NCI/Rome criteria), така и по критериите на BFM, тъй като дефинициите за категоризиране са различни, а стойностите имат пряко отношение към избор на терапевтичен режим. И при двете класификации влиянието е еднопосочно – с нарастване на левкоцитния брой и възрастта прогнозата се влошава (>50 000/мм³, съотв. >20 000/мм³; >10 год. и съотв. >6 год.). Прогноза при кърмаческата възраст (под 1 година) е изключително неблагоприятната. За нашата група пациенти, подобно на други проучвания, полът и имунофенотипната принадлежност не са оказват със сигнификантна прогностична значимост.

В настоящето проучване наличието на молекулярно-генетична аномалия се доказва като фактор с прогностично значение – налице е статистически значима разлика (p<,004) в преживяемостта между отделните генетични групи. С най-добра прогноза е групата с *ETV6-RUNX1*(+) пациенти (OS - 96,4 ±0,025), следвана от групата без маркер (OS - 78,5±0,034). На трето място е групата с *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ (OS - 70,7±0,124), следвана от пациентите с негативен *SIL-TAL1* (67,0±0,096), а непосредствено след тях тези с *SIL-TAL*(+) (OS - 66,7 ± 0,192). Групата с Филаделфия позитивна ОЛЛ *(BCR-ABL1* маркер) е с неблагоприятна OS 60,0 ±0,182, а с най-ниска преживяемост са MLL-реаранж. ОЛЛ (OS - 42,9±0,19).

Освен началните стратификационни критерии, за прогнозата на заболяването от терапията – отговор на преднизолон или т.нар. отговор на ден 8, резидуалната болест на ден 15, постигане на ремисия след индукционно лечение на ден 33, отчитане на нивото на МРБ (разгледано отделно). Резултатите от сравняване на преживяемостта при съответното групиране на пациентите са демонстративни и доказват, че ранната редукция и “изчистване“ на бластите определят сигнификантно по-добрата прогноза, а непостигането на ремисия е свързано единствено с краен неблагоприятен изход.

За разлика от критериите на NCI/Rome, групирането на пациентите по BFM отчита и отговора към лечението. Въпреки че високорисковите случаи се лекуват с по-интензивни химиотерапевтични режими, прогнозата при отделните групи остава сигнификантно различна – пациентите със стандартен и среден риск имат много по-благоприятна прогноза, в сравнение високо-рисковите.

Чрез дисперсионен анализ доказахме, че при групираща вариабилна „генетичен маркер“ съществува сигнификантна разлика в разпределението по генетични групи на изследваните по-горе фактори.

Най-вероятно генетичният фактор е един от компонентите, определящи биологичните характеристики на заболяването.

Анализ на отделните подгрупи:

✓ *ETV6-RUNX1*(+) ОЛЛ - за нашата група пациенти, на базата на получените резултати, доказахме, че наличието на t(12;21)[ETV6-RUNX1] е благоприятен прогностичен фактор както по отношение на OS (96,4±0,03), така и за EFS (90,1± 0,04). Освен това, при условия на прилагане на стандартизиран диагностичен, стратификационен и терапевтичен алгоритъм, съгласно изискванията на възприетите протоколи ALL IC 2002 и ALL IC 2009, наличието на генетичния маркер има самостоятелно значение, независимо от останалите асоциирани фактори. Нашите резултати са в унисон с данни от множество други проучвания, като се подчертава фактът, че *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ има благоприятна прогноза при съвременния терапевтичен подход. Лечението се отличава със сравнително по-интензивна начална фаза за постигане на ранно максимално редуциране на бластната популация и продължителна, по-слабо натоварена поддържаща фаза. Този терапевтичен модел на интензивност, заедно със заложените стратификационните критерии, се оказват удачни за *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ и резултатите при тази група са най-добри. Въпреки че наличието на маркера не е сред директните критерии за категоризация в рискови групи, установяването му предсказва добра прогноза. Доказването му, на практика, изключва вероятността за друга аномалия, асоциирана с висок риск.

В нашата група общият брой отчетени рецидиви е 68, сред които 5 (7%) на пациенти с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ. Такава ниска честота не оспорва благоприятното прогностично значение на фактора. В данни от други проучвания се цитира и значително по-висока честота на рецидиви. Приема се, че за пациентите с аномалията са характерни т.нар. „късни рецидиви“. Най-често за късни рецидиви се приемат настъпилите след 36

месец от диагнозата. В наблюдаваната от нас група, средният период за настъпване на *ETV6-RUNX1(+)* рецидиви е 41 месеца, а при общата група (BCP-ОЛЛ) - 25 месеца. Характерна за рецидивите също е относително по-често екстрамедуларно засягане като рецидивите са комбинирани. Освен това, противорецидивното лечение с постигане на нова ремисия често е успешно. Тези особености се отчитат и при нашата група с три (60%) комбинирани рецидива, постигнати са 4-ри ремисии, от които дълготрайни 3.

Благоприятната прогноза, асоциирана с маркера, създава предпоставки за редуциране на терапията с оглед на риска от ранни и късни усложнения, свързани с лечението. Подобен подход предполага допълнителна, по-прецизна диференциация на случаите вътре в групата, отчитайки главно обективни показатели, свързани с отговора на лечение и развитие на резистентност. Възможностите за това вероятно ще са свързани с натрупване и анализиране на информация, получена от най-новите геномни изследвания.

- ✓ *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ - общата преживяемост на групата е по-ниска, но не се различава статистически от преживяемостта при общата кохорта с маркер-негативни левкемии - BCP-други (OS - 70,7±,124 с/у 78,5±0,034). Резултатите ни са в унисон с данни от проучвания на пациенти, лекувани със съвременни интензифицирани режими. В същото време обаче, преживяемостта съществено се различава от високите резултати при проучвания, съобщаващи преживяемост, сходна с тази на генетичните подтипове, асоциирани с най-добра прогноза – *ETV6-RUNX1(+)* (OS~90%) (75,76). Въпреки че не се установява сигнификантна разлика при съпоставяне на EFS между BCP-други и *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ (съответно 71,6 ± ,037 и 57,1 ± ,134, p = ,227), процентът на случаите с аномалията и рецидив е висок – 43%. Характеристиките на рецидивите при нашите пациенти с *TCF3-PBX1* съответстват на описаните като типични за групата – ранни, още в хода на терапията (средно до 12 месеца

от началото на заболяването), комбинирани с екстрамедуларно засягане (ЦНС) и с крайно неблагоприятна прогноза. 50% от рецидивиралите пациенти не са категоризирани като високо-рискови при постаняне на диагнозата, поради липса на съответни критерии. Всички рецидиви са квалифицирани като високорискови, прилаган е стандартен химиотерапевтичен подход. Излекуван е само 1 рецидивирал пациент с изолирано ЦНС-ангажиране. Катастрофалната прогноза при пациенти с *TCF3-PBX1(+)* ОЛЛ и рецидив налага преосмисляне на стратификационните критерии и идентифициране на нови фактори, както и на терапевтичния подход и план, с ранно включване на иновативни средства (имунотепапия) за превъзмогване на евентуална химиорезистентност.

Във връзка с по-честото засягане на ЦНС, особено при рецидив, трябва да се отбележи, че при нашата група пациенти, ЦНС-ориентираната терапия не е модифицирана за тази група пациенти, както се препоръчва в някои от терапевтичните схеми, и е изпълнявана, съобразно указанията на общовалидния протокол за лечение.

По-лошите от очакваните резултати при нашата група налагат адаптация на терапевтичното поведение, съобразно адекватно проследяване и интерпретация на резултатите от проследяването на МРД, прецизиране на показанията за интензифициране както на терапията въобще, така и на ЦНС-насочената терапия.

- ✓ *BCR-ABL1*(+) ОЛЛ – Филаделфия позитивна (Ph'+) ОЛЛ - очаквано групата е малобройна и изводите следва да се интерпретират като тенденции, а не като закономерности. Допълнително трябва се подчертае фактът, че Ph(+) пациентите, диагностицирани след 2009 год. (общо 6) се лекуват с химиотерапия, комбинирана с прием на тирозиназни инхибитори (TKI), съобразно съвременен протокол (EsPhALL2009). Инхибитор е е добавен допълнително към лечението и на пациент, диагностициран година по-рано (2008 г.). При сравнителният анализ на

преживяемостта при нашите пациенти не се установи статистически значима разлика между групата с Ph(+) ОЛЛ и групата без маркер. Освен размера на групата с маркер, тези резултати вероятно се дължат на подобрената преживяемост при Ph(+) ОЛЛ след добавянето на TKI към терапията от една страна. От своя страна, разнородността на т.нар. група без маркер, в която се очаква, че е съществен дялът на други високорискови ОЛЛ (147), определя сходните резултати. Така, постигнатите резултати (OS, EFS) при нашите пациенти с Ph(+) ОЛЛ са сравними с тези от други проучвания.

Наличието на t(9;22)[BCR-ABL1] е един от общопризнатите маркери, асоцииращи се с лоша прогноза и присъства в задължителните критерии за стратификация на пациентите по рискови групи. Това налага не само допълването на терапията с TKI, но и предопределя приложението на високо-интензивни химиотерапия, като ролята на КМТ е дискутабилна. Проследяването на нивата на експресия на *BCR-ABL1* – фузионните продукти (вж по-долу) беше основен критерий за адаптиране на терапията – преустановяване на терапията с TKI, превключване към втора генерация TKI, реализиране на Алогенна КМТ от родствен донор.

✓ *MLL – реар.* ОЛЛ - малката група от пациенти в нашето проучване напълно отразява отчитаните групата с най-ниска преживяемост (~40%) и съответно най-лоша прогноза. Заболяването проявява резистентност към терапия, въпреки че прилаганите режими са високо-интензивни. Рецидивите са ранни и протичат катастрофално, въпреки че при двама пациенти са осъществени и алогенни КМТ. Интересно е да се отбележи, че всички случаи с рецидив и неблагоприятно протичане са носители на най-честата за групата t(4;11)[MLL-AF4] и са с типична клинична изява. При двама от останалите пациенти реанжиранията на MLL-гена са с други партньорски гени. При пациенти на възраст над 10 г., въпреки че остава високо-рисково,

еволюцията на заболяването е по-различна, с относително по-добра прогноза от тази при кърмаческа левкемия.

✓ *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ - в нашата група пациенти наличието на *SIL-TAL1* не оказва влияние върху преживяемостта, сравнямайки с *SIL-TAL1*(-) случаи. Както при *SIL-TAL1*(+), така и при *SIL-TAL1*(-) случаи, вероятността за обща преживяемост е аналогична на вероятността за липса на заболяване, което потвърждава наблюдаваната и в други студии изключително лоша прогноза на заболяването при пациенти с настъпил рецидив.

**4. Резултати при проследяване на МРБ чрез нивото на експресия на фузионни гени.**

В съвременния подход за лечение на ОЛЛ, като най-успешна стратегия се счита адаптирането на интензивността на лечението, в зависимост от динамично отчитания терапевтичен отговор. Нивото на МРБ остава независим прогностичен фактор и чувствителен индикатор за настъпване на рецидив. Нива на МРБ под $1.10^{-4}$ се асоциират с благоприятен изход, като по-ниски нива и по-ранно негативиране се свързват с по-добра прогноза.

Съществуващите техники за измерване на МРБ се базират на различни таргети за идентификация на остатъчната бластна популация. Всеки от методите се отличава със специфична чувствителност. Така, , с молекулярно-генетичните методи чувствителността се счита за най-висока и достига нива $1.10^{-6}$. Допълнително, в контекста на отделните терапевтични протоколи, избраните за измерване времеви пунктове, в хода на лечението имат различна прогностична стойност. Най-важни времеви точки за проверка са средата на индукционната фаза, края на

индукцията, края на консолидацията. Значение имат типът и дозовият режим на предшестващата химиотерапия. В резултат, получените данни на различни терапевтични групи предоставят информация, която често е трудно съпоставима и на практика липсва напълно унифициран подход, касаещ инкорпорирането на МРБ в клиничните алгоритми.

В нашето проучване, анализът от проследяване на МРБ чрез RT-PCR, очерта различни зависимости при отделните генетични подгрупи.

4.1. При групата на *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ с подчертано благоприятна прогноза, се отчитат ниски нива на МРБ и постигане на много добър ранен молекулярно-генетичен отговор. Още на 1-и месец, пълно негативиране на МРБ се установява при 14 пациенти (39%), нива на МРБ под $1.10^{-4}$ при 8 (22%). След края на консолидационната фаза молекулярна ремисия е достигнато при 21 пациенти (70%), а много ниско ниво (под $10^{-4}$) при 5 случая (16%). Бързата редукция на обема на бластната популация отразява високата чувствителност към провежданото лечение и е свързана с добра прогноза. Отчитаме, че при пациенти с относително по-високо ниво на МРБ на 1-ви месец и последващо ново високо ниво на 6-ти месец, рискът от рецидив нараства. При късно настъпилите рецидиви (>12 месеца от края на терапията) и вече преустановено проследяване на МРБ, съответно не са регистрирани индикатори чрез молекулярно-генетично изследване за настъпващ рецидив.

Важно е да се отбележи, че при 1/3 от пациентите с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ, персистира установимо ниво на МРБ от проведени изследвания в момента на спиране на лечението. Въпреки това, при нито един от тях не е регистриран рецидив до края на периода на проследяване. Според информацията, с която разполагаме, подобни данни не са съобщавани в публикуваната литература. Вероятно това се дължи на факта, че стандартният подход за измерване на МРБ не включва

продължително молекулярно проследяване след края на консолидационната фаза. От етиопатогенетична гледна точка, възможно обяснение е, че аномалията възниква пренатално (доказателство е наличието ѝ в новородени и здрави възраст), не е достатъчна, сама по себе си, да отключи малигнена трансформация като остава да персистира и след изчезване на левкемичния клон. Сходните и до голяма степен повтарящи се резултати при проследяването нивата на транскрипция на фузионния ген *ETV6-RUNX1* на 12-ти, 18-ти и 24-ти месец, налагат преосмисляне на възприетия ни план за мониториране. С голяма вероятност, придържане към следния план би могло да подобри информативната стойност на проследяване с RT-PCR: да се въведе изследване на 15-ти ден от индукцията, след което да се продължи с изследването в края на 1-вия месец (края на индукцията), и последващо проследяване на 3-ти месец (края на консолидационната фаза). В случай на задържане на високи нива на МРБ би следвало да се продължи проследяването на 3 – 6 месеца, с оглед адаптиране на терапевтичния план.

Отличните резултати при лечението на пациентите с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ в нашата група биха могли да станат основа за планова редукция в интензивността и продължителността на терапията. Трябва да се подчертае, обаче, че резултатите са постигнати именно в контекста на прилаганите терапевтични схеми и съответните актуални критерии за стратифициране, поради което всяка модификация, особено редукция на лечението, следва да се инициира обосновано. Обективни аргументи, отразяващи разнородността на групата с *ETV6-RUNX1(+)* ОЛЛ вероятно ще бъдат изведени от бъдещи проучвания с най-новите диагностични съвременни техники като NGS.

4.2. Проследяването на МРБ при пациентите с *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ очерта специфичен, по-продължителен процес на редукция на бластната

популация, в сравнение с *ETV6-RUNX1(+)* пациенти. Установено бе задържане на относително високи нива на МРБ при 80% от изследваните на 1-вия месец от терапията, а максимален ефект (негативиране на МРБ) при голямата част (64%) е постигнат едва на 6-тия месец от лечението.

В нашето проучване този пункт на изследване (след консолидационна и преди реиндукционна фаза) показва висока информативна стойност при *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ. Всички пациенти, освен един, при които нивото на МРБ остава установимо на 6-тия месец са рецидивирали през следващите 3 до 6 месеца. Данните подкрепят обсъждане на по-ефективна реиндукционната терапия при тази група, в т.ч. възможността за инкорпориране на алтернативен терапевтичен подход при пациенти със задържащо се установимо ниво на МРБ, напр. имунотерапия по подобие на протоколите за високо-рискови рецидиви, където наличието на *TCF3-PBX1* се счита за високо-рисков критерий.

4.3. От проследяването на МРБ при пациентите с *BCR-ABL1(+)* ОЛЛ се установява задържането на много високи нива на МРБ в края на индукционната фаза, което е обичайно за тази генетична подгрупа. Задържането на високи нива (при 5 от 7 пациенти), в хода на лечението, стана основание да се изследват допълнително настъпили мутации във фузионния ген и произтичаща от това резистентност. От клинична гледна точка, това е повод за адаптиране на таргетната терапия със смяна на TKI (преминаване към 2-ра генерация TKI), както и ескалация на лечението с осъществяване на алогенна КМТ (при един от пациентите). Интересен е случай със задържане на високи нива на МРБ, въпреки сменената терапия с втора генерация TKI при един от пациентите, като в хода на проследяване от 60 месеца това не се последва от хематологичен рецидив.

Персистирането на установима МРБ е използван като индикатор за продължаване на лечението с TKI дори след края на химиотерапията като поддържащо лечение. Обратно, негативиране и задържане на неустановима МРБ е прието като показание за спиране на лечението с TKI на 36 месец от началото на заболяването при 1 пациент, което се последва от дълготрайна ремисия.

Актуален остава въпросът за комбинираната токсичност при лечение с TKI, успоредно на интензивна полихимиотерапия. Съобщава се по-висока честота и степен на тежест хемато- и хепатотоксичност. В нашата група е регистриран един случай с тежки странични ефекти и летален изход в резултат от високостепенна токсичност при пациент с молекулярна ремисия, в хода на индуцирана костно-мозъчна хипоплазия при реализиране на интензивна терапия с т.нар. високо-рискови химиотерапевтични блокове.

4.4. Изключително сериозната прогноза при *MLL-реар.* ОЛЛ се потвърждава и при нашата група пациенти. В унисон с наблюдаваната клинична еволюция (прогресия) са нивата на проследяваната МРБ. Отчетените високи нива на резидуална болест над $10^{-2}$ в хода на лечението отразяват висока честота на терапевтична резистентност при кърмаческата левкемия и висок риск от рецидив. Единственият пациент с негативирана на 1-вия месец МРБ не е в кърмаческа възраст и МРБ е останала в неустановими нива при последващите контроли (36 месеца). При всички останали пациенти (5 или 83%) МРБ се е задържало във високи нива и заболяването е завършило фатално в 3 случаи още в първите 6-12 месеца от диагнозата.

4.5. За пациентите със *SIL-TAL1(+)* ОЛЛ се отчетоха следните особености: нито един пациент няма негативиране на МРБ след края на индукционната

терапия; сравнително високите нива на МРБ се задържат; негативиране на МРБ на 3-ти и 6-ти месец е свързано с дългорайна ремисия. Данните в литературата са подобни, потвърждаващи сравнително по-късното настъпване на негативиране на МРБ при Т-клетъчни ОЛЛ. Прогностичната стойност на изследването, проведено след края на консолидацията, е по-висока при тази група пациенти. Двама от нашите пациентите са с отчетено ниво на МРБ над $1.10^{-4}$ на 24-ти месец (преди спиране на терапията), но без хематологичен рецидив в последствие, без интензифициране на терапията и без преминаване към програма за КМТ. Не са ни известни подобни данни от литературата.

При анализ на получените данни за OS и EFS, след разпределение на пациентите по групи единствено въз основа на критерия ниво на МРБ, в точки на проследяване 33-ти ден и 3-ти месец, се установи сигнификантна разлика в преживяемостта. Според нашите данни, на 33-ти ден при „cut-off“ ниво на МРБ $1.10^{-3}$, OS е съотв. 96,2 ± 0,038 с/у 73,1 ± 0,074 и $p < 0,013$, а EFS - 96,2 ± 0,038 с/у 61,3 ± 0,082 и $p < 0,003$. За 3-ти месец при „cut-off“ ниво на МРБ $1.10^{-4}$ OS е съответно 92,3 ± 0,046 с/у 72,1 ± 0,080 и $p < 0,011$, а EFS е 92,3 ± 0,043 с/у 53,6 ± 0,095 и $p < 0,001$. Данните са съпоставими с тези от други проучвания, при които се подчертава значението на нивата на МРБ за прогнозата.

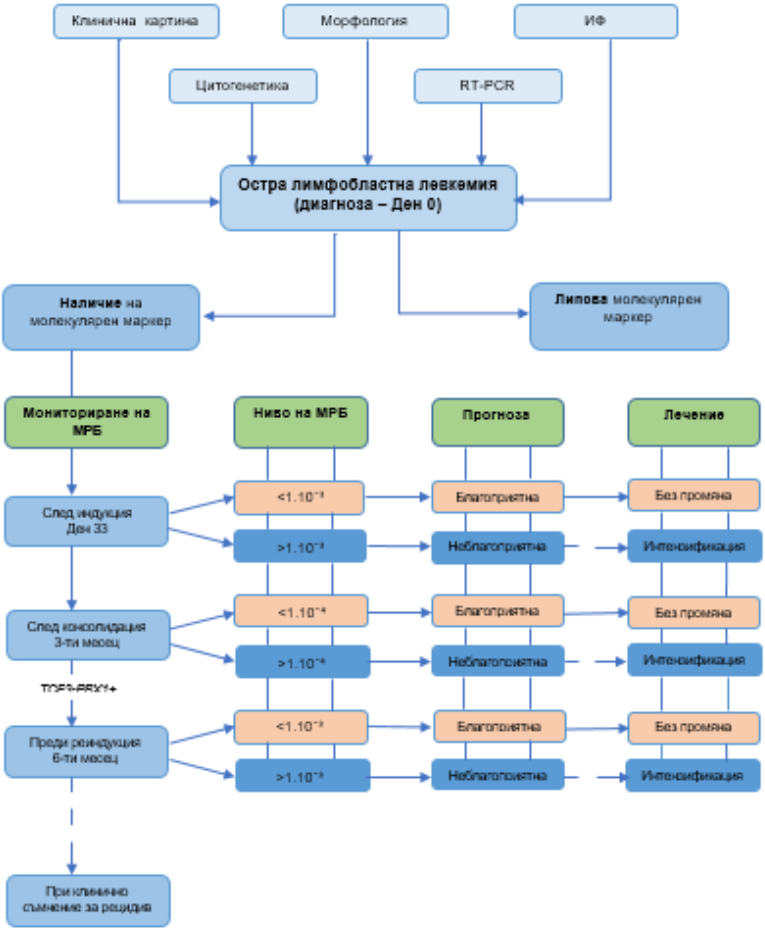
Резултатите са доказателствени за прогностичната значимост на фактора МРБ, както и за информативната стойност на проследяване по този метод. Освен прогностично значение, тези данни биха могли да се считат като индикативни за терапевтични интервенции, предоставяйки възможности за групов или индивидуализиран подход.

Измерването на експресията на специфичните за ОЛЛ фузионни гени чрез RT-PCR е един практически лесно приложим метод за проследяване на МРБ в случаите с установена при диагнозата генетична

аномалия. Методът е с доказана висока специфичност, освен това е сравнително бързо и лесно изпълним.

За оптимизиране на диагностичния процес и правилното интерпретиране на резултатите би следвало да се прилага унифициран подход при избора на етап от лечението, в който да се проследява нивото на МРБ, както и дефиниране на гранично ниво за диференциране на отделните групи пациенти. Според досегашните стандарти, като показателни се приемат изследванията за МРБ на етап: средата и края на индукционната фаза (15-ти и 33-ти ден), и края на консолидацията (3-ти месец). Няма убедителни данни за стойността в клиничната практика на проследяване в следващите етапи от лечение. Счита се, че изследването в късните етапи на лечение няма практическо приложение, освен за доказване на подозиран клинично или от рутинни лабораторни изследвания рецидив. Въпреки това, проследяване на нивото при нашата група *TCF3-PBX1*(+) пациенти показа, че установимо ниво на МРБ на 6-ти месец е свързано с последващ рецидив. На базата на получените резултати предлагаме алгоритъм за проследяване на МРБ при пациентите с установени генетични маркери, с възможности за евентуално оптимизиране на терапевтичния план (фиг.13).

На този етап, възпритите и прилагани в нашия център терапевтични протоколи за групата пациенти, включени в нашето проучване, не предвиждат рестратифициране по рискови групи или адаптиране на терапията, в съответствие с нивата на МРБ, проследявани с молекулярно-генетично изследване.




**Фигура 13. Алгоритъм за мониториране на МРБ чрез нивото на открити към диагноза фузионни гени**

# Заключение

Острата лимфобластна левкемия представлява хетерогенна група от заболявания с широк спектър от клинични прояви, лабораторни характеристики, терапевтичен отговор и прогноза. В основата на това разнообразие са взаимодействащи си генетични фактори. Тяхното идентифициране и изясняването на механизмите на левкемогенеза са обект на интензивни изследвания и проучвания.

В съвременните условия, коректното диагностициране на заболяването, стратифицирането на пациентите и изборът на терапия са обвързани с резултатите от генетичните изследвания. Диагностичният алгоритъм при деца с ОЛЛ се надгражда и понастоящем задължителен елемент са молекулярно-генетичните изследвания.

Резултатите от настоящото проучване, обхващащо голяма група пациенти, проследявани за дълъг период, отразяват успешното добавяне на молекулярно-генетичното изследване към диагностичния панел при деца с ОЛЛ в нашия център и потвърждават значението на получените данни за цялостния диагностично-лечебен процес.

## Изводи:

1. Установяването на фузионни гени чрез RT-PCR при 1/3 от децата с ОЛЛ прави възможно класифицирането на случаите, съобразно критериите на последната СЗО класификация на миелоидните неоплазми и остра левкемия (The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia).

2. От епидемиологична гледна точка, определянетото на честотата на молекулярно-генетичните маркери при ОЛЛ в детска възраст за България допълва профила на заболяването, в контекста на възможни етиопатогенетични взаимодействия.

3. Обособяването на клинико-лабораторни констелации, в асоциация с генетичния подвариант, подобрява възможностите на диагностичния и лечебен процес, изграждайки модели за комплексен и индивидуализиран подход.

4. Анализирането на данните от клиничните групи, с добавените данни от генетичните изследвания, позволява ново интерпретиране на резултатите и очертава превес на значението на едни спрямо други рискови фактори за отговора към лечение и прогнозата.

5. На базата на унифициран терапевтичен подход се доказват особеностите и значението на индивидуалния отговор към лечение. Обективната оценка чрез измерване на МРБ аргументира адаптиране и индивидуализиране на терапевтичния план.

6. Чрез молекулярно-генетичните изследвания се идентифицират реални терапевтични таргети, с възможности за повлияване и подобряване на прогнозата при съответната група пациенти.

# Приноси

## Приноси с научно-приложен и оригинален характер

1. Настоящото проучване, направено върху 271 педиатрични пациента с ОЛЛ, диагностицирани и лекувани за 13-годишен период в най-големия център за лечение на злокачествени заболявания при деца в страната, представлява най-мащабното проучване на такива пациенти в България.

2. За първи път в България се установява и описва честотата на разпределение на най-често срещаните клинично значими генетични подгрупи при ОЛЛ в детска възраст, като мащабът на проучването позволява данните да бъдат отнесени към цялата страна.

3. На базата на съвременните тенденции за групиране на пациентите по наличие на генетичен маркер, за първи път в страната се описват асоциирани клинико-лабораторни констелации, които са съпоставими с публикуваните данни от други проучвания.

4. Направен е анализ на данните, отнасящи се до значението на молекулярно-генетичните маркери за отговора към лечение и прогнозата за отделните генетични подгрупи, като се доказва тяхната прогностична стойност. За най-голямата генетична подгрупа, *ETV6-RUNX1* (+) ОЛЛ, генетичният маркер има самостоятелна благоприятна прогностична стойност.

5. Направените за първи път в нашата страна анализи върху проследяването на МРБ чрез детекция на експресията на фузионни гени при ОЛЛ доказват, че методът е достоверен и удобен за практиката, при

оценка на терапевтичния отговор и адаптиране на терапевтичната стратегия. Задържането на високи нива на МРБ в края на индукцията и в края на консолидацията се свързва еднопосочно със статистически значимо влошаване на преживяемостта.

6. Изведен е препоръчителен режим за проследяване на МРБ. При установен фузионен ген при поставяне на диагнозата, нивото на експресията следва да се проследява на ден 33 и на 3-ти месец от лечението, като само за *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ се препоръчва допълнително изследване, тъй като задържане на високо ниво на 6-ти месец се свързва пряко с повишена вероятност от настъпване на рецидив.

7. Установимо нискостепенно ниво на МРБ при спиране на лечението в случаите с *ETV6-RUNX1* (+) ОЛЛ не се асоциира с повишен риск от настъпване на рецидив.

8. Настоящото проучване наложи включването на молекулярно-генетичното изследване като задължителен компонент от диагностичния алгоритъм при пациентите с ОЛЛ в нашия център.

## Приноси с потвърдителен характер

1. Установените честоти на молекулярно-генетичните подтипове сред детската ОЛЛ при нашите пациенти са характерни за кавказката раса и са сходни с описаните и в други европейски страни.

2. Описаната от други автори асоциация от демографски, клинико-лабораторни и имунофенотипни характеристики, се установява и при нашите групи пациенти, съответно групата с *ETV6-RUNX1* (+) ОЛЛ имат

показатели с благоприятна стойност, за разлика от Ph(+) ОЛЛ, *MLL – реар.* ОЛЛ и отчасти *TCF3-PBX1*(+) ОЛЛ.

3. Потвърждават се данните, че най-добри терапевтични резултати се постигат при пациентите с *ETV6-RUNX1* (+) ОЛЛ, при които OS и EFS са съответно 96,4 ± 0,025 и 90,1 ± 0,043.

4. Потвърждават се данните за най-неблагоприятна прогнозата при пациенти с *MLL-реар.,* при които OS и EFS са идентични и достигат едва 42,9 ± 0,187.

5. Резултатите от нашето проучване потвърждават клиничната значимост на метода за мониториране на динамиката на МРБ чрез измерване нивото на експресия на установените при диагнозата фузионни гени.

## *Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:*

1. Prodanova Krasimira, Nadejda Yurukova, Survival analysis for data of pediatric acute leukemia in Bulgaria, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2013, 27 (2), 3689 - 3694

2. Юрукова, Н. Генетична диагноза на Острата лимфобластна левкемия в детска възраст, Педиатрия, 2015, ТОМ LV, 10-14

3. Юрукова, Н., Г. Балаценко, К. Бъчваров, А. Мучинова, М. Йорданова, Б. Аврамова, Д. Константинов, Честота и демографска характеристика на генетичните подтипове Остра лимфобластна левкемия в детска възраст при пациенти на КДКХО – София, Педиатрия, 2019, ТОМ LIX, 1(33-36

4. РЕДКИ генетични болести / [Драга Тончева ... и др.]; под ред. на Драга Тончева.-София:Симелпрес,2014.2т.Други авт.:Стоян Лалчев,..., Надежда Юрукова, Ч.1.543с.Ч. 2. - [19] с., с. 544-1007 с. - Библиогр.: с. 976-1007

## *Участия в конгреси и научни прояви, свързани с темата на дисертационния труд*

1. Юрукова Н., Г. Балаценко, и колектив, TEL-AML1 положителна Остра лимфобластна левкемия в детска възраст: клинични характеристики, динамика на минималната резидуална болест, VIII Национална Конференция по Хематология и IV Балкански хематологични дни, 18-20 септември 2009

2. Юрукова Н., Г. Балаценко, и колектив, Молекулярно-генетична характеристика на Острата лимфобластна левкемия, XI Национален Конгрес по Педиатрия с международно участие, 16-18 октомври 2009

3. Balatzenko G., N.Yurukova, M. Romanova, H. Burnusuzov, M. Guenova, D. Konstantinov, 23 th European Hematology Association Congress, June 14 - 17, 2018, T(4;9), recurrent for the Classical Hodgkin lymphoma, in a patient with ETV6-RUNX1-positive Acute lymphoblastic leukemia, Abstract PB 1614

4. Yurukova N., G. Balatzenko, D. Konstantinov, M. Jordanova, B. Avramova, 24th European Hematology Association Congress, June 13-16,2019, Incidence and demographic characteristics of the major subgroups of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children – a Bulgarian single center study, Abstract: PB1683

5. Юрукова Н., Йорданова М., Аврамова Б., Балаценко Г., Ангелова Св., Константинов Д., Филаделфия положителна левкемия в детска възраст, Национална Конференция по Хематология „Малигнени хемопатии – контраверсии, 05-08 октомври 2017, Резюмета, 27

6. Prodanova Kr., N.Yurukova, Euro-Global Conference on Pediatrics and Neonatology, Modeling survival in childhood Acute lymphoblastic leukemia, Poster p.30, EPN 2018

7. Юрукова Н., Г. Балаценко, Б. Аврамова, М. Йорданова, К. Бъчваров, А. Мучинова, Д. Константинов, Молекулярно-генетични аномалии при деца с Остра лимфобластна левкемия, XIV Национален Конгрес по Педиатрия с международно участие, 27-30 септември 2018, Резюме D_07_03

8. Yurukova N., Acute lymphoblastic leukemia in a child, XI National Congress of Hematology and joint EHA-13th Balkan Hematology day, 10-13 October 2019

9. Юрукова Н., Балаценко Г., Аврамова Б., Йорданова М., Бъчваров К., Константинов Д., Прогностично значение на най-честите молекулярно-генетични аномалии при острата лимфобластна левкемия в детска възраст, XI Национален Конгрес по Хематология и Тринадесети Балкански Хематологичен ден съвместно с Европейската хематологична асоциация, 10-13 октомври 2019

## ***Думи на благодарност***

***Изказвам своята дълбока признателност и искрена благодарност към:***

***Проф. Георги Балаценко и Доц. Мая Йорданова за професионализма и вдъхновението;***

***Проф. Добрин Константинов и целия екип на Клиниката по детска клинична хематология и онкология за всеотдайната работа в името на нашите пациенти;***

***Екипа на Лабораторията по медицинка генетика към НСБАЛХЗ за съвместната дейност;***

***Семейството ми за подкрепата и търпението.***