



Alla Rivkina

**ZAP-70, TIMIDĪNKINĀZES, CD38, BETA 2
MIKROGLOBULĪNA UN
LAKTĀTDEHIDROGENĀZES IZMAIŅAS
HRONISKAS LIMFOLEIKOZES SLIMNIEKIEM,
TO IETEKME UZ SLIMĪBAS GAITU UN
PROGNOZI**

Promocijas darbs
medicīnas zinātņu doktora grāda iegūšanai

Specialitāte — iekšķīgās slimības

Darba zinātniskā vadītāja:
Dr. med. profesore Sandra Lejniece



Promocijas darbs veikts ar Eiropas sociālā fonda projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu.

Rīga, 2012

ANOTĀCIJA

Onkoloģiskās slimības ir liela problēma visā pasaulē, jo to izraisītā mirstība ir otra lielākā pēc mirstības sirds asinsvadu slimību dēļ. Pēdējos 20 gados ir panākti būtiski sasniegumi ļaundabīgo audzēju ārstēšanā, jo tiek pielietota moderna ķīmijterapija, terapeitiskās monoklonālās antivielas. Hematoloģiskajiem slimniekiem plaši tiek veikta autologa un alogēna cilmes šūnu transplantācija. Taču, pieaugot jaunu ķīmijterapijas un imūnterapijas preparātu klāstam, arvien aktuālāk ir prognozēt slimības gaitu konkrētam pacientam, jo jānozīmē visefektīvākā, bet tajā pašā laikā ar minimālām blakusparādībām, un ekonomiski izdevīgākā terapija. Hroniska limfoleikoze (HLL) ir ļaundabīga asinsrades slimība, kuras morfoloģiskais substrāts ir limfocīti. Hroniska limfoleikoze ir biežākā no visām leikozēm Rietumeiropā, tajā skaitā arī Latvijā. 2012.gada 1.janvārī kopējais reģistrēto pacientu skaits bija 1370. Hematoloģisko slimību gadījumos svarīgi ir diagnostikas brīdī nosakāmie bioķīmiskie un šūnu raksturojošie rādītāji, pēc kuriem var prognozēt slimības gaitu, un līdz ar to nozīmēt pacientam atbilstošu terapiju. Senākie un zināmākie prognostiskie kritēriji hroniskas limfoleikozes gadījumā ir absolūtais limfocītu daudzums, limfocītu divkārtīgošanās laiks, atipisko šūnu skaits, perifērā asins aina un kaulu smadzeņu infiltrācija. Zinātnes attīstības gaitā pētījumos ir pievērsušies arī citiem parametriem: laktātdehidrogenāze (LDH), beta 2 mikroglobulīns (β_2 MG). Daudzi pētījumi ir saistīti ar dažādiem fenotipiskajiem marķieriem, tādiem kā CD38 un citiem šūnu parametriem, CD5; CD19; CD23, kā arī 70-kDa zeta asociēto olbaltumvielu (ZAP-70), timidīnkināzi (TK). Pēdējo gadu darbos parādīta paaugstināta timidīnkināzes līmeņa nelabvēlīgā prognostiskā loma dažādu onkoloģisko slimību gadījumos. Klīniskie pētījumi pierādīja augstu TK koncentrāciju audzēja procesos. Pirmreizēji TK līmenis kā prognostiskais marķieris tika noteikts Ne Hodžkina limfomas (NHL) gadījumā, pēc tam kā prognostisku marķieri to izmantoja HLL un mielomas slimības gadījumā.

Vairums klīnisko pētījumu, kas saistīti ar TK līmeņa noteikšanu, veltīti tādām diagnozēm kā krūts vēzis, plaušu vēzis, prostatas vēzis. Solitāro audzēju gadījumā TK līmenis atspoguļo onkoloģiskā procesa aktivitāti un ir indikators ārstēšanai.

Pētījumā tika iekļauti Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas (RAKUS), Valsts Hematoloģijas centra (šobrīd Ķīmijterapijas un hematoloģijas klīnika) 120 pirmreizēji slimnieki. Iespējamie prognostiskie kritēriji tika noteikti slimības

diagnosticēšanas brīdī, kā arī pēc 6 un 12 mēnešiem. Kopā veiktas 1304 analīzes. Zinātniskā darba gaitā ar plūsmas citometrijas palīdzību tika veikta perifēro asins šūnu imunofenotipēšana, ZAP-70 ekspresijas līmeņa noteikšana un CD38 ekspresijas līmeņa noteikšana. TK līmeņa asins serumā noteikšana tika veikta, izmantojot ELISA metodi. Pētījumā iekļautie hroniskas B šūnu limfoleikozes slimnieki tika dalīti vairākās apakšgrupās pēc slimības stadijas diagnosticēšanas brīža. Ievērojot mūsdienu atklājumus, ka ir divi slimības varianti – ar VH gēnu mutācijām un bez VH gēnu mutācijām –, un lai atrastu jaunus B šūnu limfoleikozes apakštipus ar gēnu mutācijas variantu imūnglobulīnu variablajos domēnos, mēs izvēlējāmies tādus diagnostiskos parametrus kā ZAP-70, CD38, TK, LDH, β_2 MG. Svarīgi, ka visas izvēlētās metodes ir neinvazīvās un tās var veikt ambulatori, kas ir piemērotāki un nekaitē pacientam. ZAP-70 un TK pirmo reizi izmantoti HLL diagnostikai arī Latvijā. Minētie diagnostiskie kritēriji līdz šim ir aplūkoti katrs atsevišķi, nevis kopumā. Līdz šim TK netika analizēta dinamiskā HLL gadījumā nevienā citā klīnikā pasaulē. TK hroniskas limfoleikozes gadījumos Latvijā analizēta pirmo reizi.

ABSTRACT

Oncologic diseases pose a major problem throughout the world, being the second major cause of mortality following cardiovascular diseases. The last twenty years have seen significant achievements in the treatment of malignancies, as modern chemotherapy, therapeutic monoclonal antibodies are used, transplantation of autologous and allogeneic stem cells for haematological patients is widespread. However, with the growing range of new chemotherapy and immunotherapy medications, prognosticating the course of disease for a concrete patient becomes more relevant, as the most effective, economically most advantageous therapy with the minimum of side-effects should be prescribed. Chronic lymphatic leukemia (CLL) is a malignant hematopoietic disease with lymphocytes as its morphological substrate. Chronic lymphatic leukemia is the most prevalent among all forms of leukemia in Western Europe, including Latvia. On 1 January 2012 the total number of registered patients was 1370. In cases of haematological diseases the biochemical and cell characterising indicators that can be determined at the moment of diagnosis are important, they allow prognosticating the course of the disease and selecting therapy appropriate for the patient. The oldest and best known prognostic criteria in cases of lymphatic leukaemia are the absolute lymphocytes count, lymphocytes doubling time, peripheral blood count and bone marrow infiltration. With the development of science research has focused also upon other parameters: lactate dehydrogenase (LDH), beta-2-microglobulin (β_2 MG). Numerous studies deal with various phenotypical markers, i.e., CD38 and other cell parameters, CD5; CD19; CD23, as well as 70-kDa zeta associated protein (ZAP-70), thymidine kinase (TK). Recent studies reveal the negative prognostic role of elevated thymidine kinase level in cases of various oncologic diseases. Clinical studies prove high TK concentration in tumour processes. Initially TK level as a prognostic marker was detected in cases of Non-Hodgkin's lymphoma (NHL), thereafter it was used as a prognostic marker in cases of CLL and myeloma disease. The majority of clinical studies linked with determining TK level are dedicated to such diagnoses as breast, lung and prostate cancer. In cases of solitary tumours TK level reflects the activity of the oncologic process and is an indicator for treatment.

The study includes 120 newly diagnosed patients of Riga East Clinical University Hospital (RECUH), the National Centre of Haematology (currently the Clinic of Chemotherapy and Haematology). The possible prognostic criteria were

determined at the time of diagnosis and after 6 and 12 months. In total 1304 tests were performed. In the framework of this research work the immunophenotyping of peripheral blood cells, using flow cytometry, was performed, ZAP-70 and CD 38 expression level was determined. TK blood serum level was determined using ELISA method. The chronic B cell lymphatic leukaemia patients included in the study were divided into several subgroups according to the stage of disease at diagnosis. In view of the fact that current research has discovered two types of the disease – with VH gene mutations and without VH gene mutations, the following diagnostic parameters were chosen: ZAP-70, CD38, TK, LDH, β_2 MG to find new B cell lymphatic leukaemia subtypes with variant gene mutation in the variable immunoglobulin domains. It is important that all selected methods are non-invasive, can be performed in outpatient settings, which is more appropriate and poses no harm to the patient. This was the first time when ZAP-70 and TK were used in Latvia in diagnosing CLL. The abovementioned diagnostic criteria previously have been discussed separately, but not together. In no other clinic in the world TK has been analysed in dynamics in case of CLL. This is the first analysis of TK in cases of chronic lymphatic leukaemia in Latvia.

SATURS

1. Ievads.....	13
2. Darba aktualitāte.....	15
2.1. Darba teorētiskais un praktiskais nozīmīgums.....	16
2.2. Darba hipotēzes.....	16
2.3. Darba novitāte.....	17
3. Darba mērķis un uzdevumi.....	18
3.1. Darba mērķis.....	18
3.2. Darba uzdevumi.....	18
4. Literatūras apskats.....	19
4.1. Definīcija.....	19
4.2. Hroniskas limfoleikozes (HLL) izplatība.....	19
4.3. Ieskats hroniskas B šūnu limfoleikozes etiopatogēnēzē.....	19
4.4. Hroniskas B šūnu limfoleikozes klīniskās gaitas īpatnības.....	21
4.4.1. Hroniskas limfoleikozes klīniskā aina un klasifikācija.....	21
4.4.2. Hroniskas limfoleikozes galvenās komplikācijas.....	23
4.4.3. Indikācijas terapijas sākšanai.....	25
4.5. Hroniskas limfoleikozes diagnostika.....	27
4.6. Prognostiskie kritēriji.....	28
4.6.1. Perifērā asins aina.....	28
4.6.2. Imunoloģiskie prognostiskie faktori.....	29
4.6.3. Kaulu smadzeņu infiltrācija.....	31
4.6.4. Limfocītu skaita dubultošanās laiks.....	31
4.6.5. Laktātdehidrogenāze (LDH).....	32
4.6.6. Ģenētiskas pārmaiņas hroniskas limfoleikozes gadījumā	32
4.6.7. Mutāciju statuss hroniskas limfoleikozes gadījumos.....	33
4.6.8. CD38 ekspresija.....	35
4.6.9. 70-kDa zeta asociētās olbaltumvielas (ZAP-70) ekspresija.....	37
4.6.10. Timidīnkināzes (TK) līmeņa noteikšanas prognostiskā nozīme HLL gadījumā	37
4.7. Hroniskas B šūnu limfoleikozes ārstēšana.....	39
4.7.1. Hroniskas B šūnu limfoleikozes ārstēšanas metožu attīstība.....	39
4.7.2. Atbildes kritēriji ārstēšanas efektivitātes novērtēšanā.....	42

4.7.3. Kritēriji terapijas uzsākšanai.....	43
4.7.4. Mūsdienu rekomendācijas HLL ārstēšanai.....	45
4.8. Noslēgums.....	46
5. Materiāli un metodes.....	47
5.1. Pacienti, klīniskais raksturojums.....	47
5.2. Pacientu dalījums atkarībā no slimības stadijas.....	48
5.3. Pacientu dalījums grupās atkarībā no varianta.....	48
5.4. Hroniskas limfoleikozes diagnostika.....	49
5.5. Kopējais diagnostiskais apjoms.....	49
5.5.1. Pacientu klīniskā stāvokļa novērtējums.....	52
5.5.2. Asins analīze.....	52
5.5.3. β_2 mikroglobulīna noteikšana.....	53
5.5.4. Laktātdehidrogenāzes noteikšana.....	53
5.5.5. Imūnfēnotipēšana.....	53
5.5.6. ZAP-70 ekspresijas noteikšana	54
5.5.7. TK līmeņa noteikšana asins serumā.....	54
5.5.8. Histoloģiskie izmeklējumi.....	55
5.5.9. Rezultātu statistiskās analīzes metodes.....	56
6. Rezultāti.....	58
6.1. Asins analīžu rezultāti.....	58
6.1.1. Asins aina.....	58
6.1.2. Leikocītu (WBC) skaits.....	58
6.1.3. Hemoglobīna līmenis.....	60
6.1.4. Eritrocītu (RBC) skaits.....	61
6.1.5. Trombocītu (PLT) skaits.....	63
6.1.6. Limfocītu skaits.....	65
6.1.7. CD38 daudzums.....	66
6.1.8. TK daudzums.....	67
6.1.9. β_2 mikroglobulīna daudzums.....	69
6.1.10. Laktātdehidrogenāzes (LDH) daudzums.....	72
6.1.11. ZAP-70 daudzums.....	73
6.1.11.1. ZAP-70 ekspresijas un citu prognozes faktoru analīze HLL gadījumā.....	74

6.1.11.2. ZAP-70 līmeņa ekspresija ar CD19+/CD5+ šūnām HLL slimniekiem ar dažādiem slimības norises variantiem.....	75
6.1.12. HLL standarta prognozes faktoru analīze ar atšķirīgu ZAP-70 ekspresiju.....	76
6.1.13. Imūnfēnotipisko marķieru ekspresijas vērtējums HLL slimniekiem ar dažādu ZAP-70 ekspresiju.....	77
6.1.14. CD25 un CD38 aktivācijas marķieru ekspresija dažādās HLL slimnieku grupās ar dažādu ZAP-70 ekspresiju.....	78
6.1.15. Korelācija starp ZAP-70 un LDH.....	79
6.1.16. Korelācija starp ZAP-70 un $\beta 2$ MG.....	80
6.1.17. Korelācija starp ZAP-70 un CD38.....	81
6.1.18. Korelācija starp ZAP-70 un slimības stadiju.....	81
6.1.19. Korelācija starp ZAP un TK.....	82
6.2. Histoloģijas izmeklējumi.....	83
7. Prognostisko marķieru dinamika terapijas laikā.....	84
7.1. Terapijas varianti.....	84
7.2. Leikocītu (WBC) skaita izmaiņas terapijas laikā.....	87
7.3. Hemoglobīna līmeņa izmaiņas terapijas laikā.....	88
7.4. Eritrocītu (RBC) skaita izmaiņas terapijas laikā.....	89
7.5. Trombocītu skaita izmaiņas terapijas laikā.....	90
7.6. Limfocītu skaita izmaiņas terapijas laikā.....	91
7.7. $\beta 2$ mikroglobulīna līmeņa izmaiņa terapijas laikā.....	92
7.8. LDH līmeņa izmaiņa terapijas laikā.....	93
7.9. ZAP-70 līmeņa izmaiņas terapijas laikā.....	93
7.10. CD38 līmeņa izmaiņas terapijas laikā.....	94
7.11. TK līmeņa izmaiņas terapijas laikā.....	95
8. Iegūto rezultātu apspriešana.....	97
9. Secinājumi.....	105
10. Praktiskās rekomendācijas.....	107
11. Ar tēmu saistītās publikācijas.....	108
11.1. Publikācijas zinātnisko rakstu krājumā.....	108
11.2. Patents.....	109
11.3. Ziņojumi par darba rezultātiem.....	109
11.4. Uzstāšanās starptautiskās zinātniskās konferencēs ar mutisku referātu	109

11.5. Uzstāšanās starptautiskās zinātniskās konferencēs ar stenda referātu.....	110
11.6. Uzstāšanās Latvijas mēroga zinātniskās konferencēs ar mutisku referātu.....	110
11.7. Uzstāšanās Latvijas mēroga zinātniskās konferencēs ar stenda referātu.....	111
12. Pateicības.....	112
13. Literatūras saraksts.....	113
14. Pielikumi.....	131

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

ALAT	-	alaninaminotransferāze
ANOVA	-	vienvirziena dispersijas analīze
ASV	-	Amerikas Savienotās Valstis
ATRA	-	transretīnskābe
β_2 MG	-	β_2 mikroglobulīns
BCR	-	B limfocītu antigēna receptors
BCL-2	-	gēns apoptozes regulators
BSA	-	liellopu seruma albumīns
CD	-	Šūnu virsmas receptors (angļu val. <i>cluster of differentiation</i>)
CD3	-	T limfocītu marķieris
CD4	-	T helperu marķieris
CD4/CD8	-	imūnregulatorais indekss
CD5	-	T un B limfocītu marķieris
CD7	-	T un NK šūnu marķieris
CD8	-	T citotoksisko ly marķieris
CD 16	-	naturālo killeru jeb NK šūnu marķieris
CD 10	-	nenobriedušo T šūnu marķieris
CD 19	-	B limfocītu marķieris
CD20	-	B limfocītu marķieris
CD22	-	B limfocītu marķieris
CD23	-	aktivēto B limfocītu marķieris
CD25	-	aktivēto T un B limfocītu un makrofāgu marķieris
CD38	-	aktivēto limfocītu marķieris
CD40L	-	aktivēto T limfocītu membrānais glikoproteīns
CD79b	-	B limfocītu atipiskais antigēns
CD154	-	aktivēto T limfocītu membrānais glikoproteīns
CD95	-	aktivēto limfocītu marķieris apoptozes starpnieks (apoptozes indukcija)
DGKC	-	Vācu klīniskās ķīmijas biedrība
DH	-	Ig smago ķēžu diversitātes gēns
DNS	-	dezoksiribonukleīnskābe
EDTA	-	etilēndiamīntetraetiķskābe

EGL	-	E.Gulbja laboratorija
ELISA	-	Imūnfermentatīvā reakcija (angļu val. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
FITC	-	fluoresceīna izotiocināts
FMC7	-	B limfocītu receptors, RNS inhibitors
araGTP	-	<i>9-β-D-Arabinosylguanine</i>
HLA -	-	audu saderības antigēni (cilvēka leikocītu antigēns)
HLA-DR	-	HLA 2.klases antigēns, cilmes šūnu, aktivēto T šūnu, mieloīdo priekšteču, monocītu, makrofāgu B šūnu marķieris
HLL	-	hroniska limfoleikoze
HRK	-	anti apoptotiskie inhibitori
HTLV-I	-	T šūnu leukēmijas vīrusi (human T leukemia virus)
IgM	-	imūnglobulīns M
IgA	-	imūnglobulīns A
IgG	-	imūnglobulīns G
IgD	-	imūnglobulīns D
Ig VH	-	Ig smago ķēžu variablo gēnu fragments (angļu val. <i>variable portion of heavy chain of Ig molecules</i>)
<i>In vivo</i>	-	dzīvā organismā
<i>In vitro</i>	-	mēģenē
IWCLL	-	Starptautiskā hroniskas limfoleikozes darba grupa
JH	-	Ig smago ķēžu saistošo (<i>joining</i>) gēnu fragments
Ki 67	-	šūnu proliferatīvais antigēns
LDH	-	laktātdehidrogenāze
NCI	-	Nacionālais vēža institūts (angļu val. <i>National Cancer Institute</i>)
NHL	-	Ne Hodžkina limfoma
NK	-	naturālās galējās šūnas
p	-	varbūtība, būtiskuma līmenis, p vērtība
p27	-	<i>protein involved in growth inhibitory processes</i>
p53	-	<i>tumor suppressor gene</i>
PBS	-	fosfāta fizioloģiskais buferšķidrums
PE	-	fikoeritrīns
PTEN	-	audzējsupresora gēns

RAKUS	-	Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca
RCC1	-	hromosomu kondensācijas regulatori
REAG	-	liofilizāts
RNS	-	ribonukleīnskābe
mRNS	-	matriksa ribonukleīnskābe
RPMI	-	vide šūnu kultūrai
RSU	-	Rīgas Stradiņa universitāte
SORB	-	mikroplanšete - immunosorbents mikroplašu analīžu veikšanai
T HLL	-	T šūnu hroniska limfocitāze
TK	-	timidīnkināze
VH	-	Ig smago ķēžu variablā daļa
WHO	-	Pasaules Veselības organizācija
ZAP-70	-	zeta asociētā olbaltumviela

1. IEVADS

Hroniska limfoleikoze (HLL) ir ļaundabīga asins sistēmas slimība, kuras substrāts ir limfocītu šūnas [62]. HLL ir visizplatītākais leikozes veids starp visām hemoblastozēm [87, 89, 91, 92]. Slimību pirmo reizi pirms pusotra gadsimta aprakstīja R. Virhovs, kopš tā laika hroniskas limfoleikozes diagnostika un ārstēšana ir būtiski mainījusies un uzlabojusies [38], tomēr tā joprojām ir aktuāla problēma gan pasaulē, gan Latvijā.

Pēc Nacionālā vēža institūta datiem, HLL ir viens no izplatītākajiem leikožu variantiem Eiropā un Ziemeļamerikā, apmēram 30% reģistrēto leikožu. Saslimstība ar HLL ASV ir 3,5 gadījumi uz 100 000 iedzīvotājiem (5,0 vīriešiem un 2,5 sievietēm) [30, 65]. Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcā (RAKUS) 2007. gadā ar diagnozi hroniska limfoleikoze pieņemti uzskaitē 115 pacienti, 2008. gadā – 114 pacienti, 2009. gadā – 108 pacienti. 2012.gada 1.janvārī kopējais reģistrēto pacientu skaits bija 1370. Statistiskas dati liecina, ka saslimstība nemazinās.

Pēc norises gaitas, slimība ir ļoti heterogēna, tai raksturīgi dažādi progresēšanas tempi, kā arī dažāda slimnieku dzīvildze. Virknei pacientu slimība nepārtraukti progresē, un, neskatoties uz ārstēšanu, dzīves ilgums ir tikai 2–3 gadi. Tai pašā laikā apmēram 15–20% slimnieku slimības klīniskās un hematoloģiskās pazīmes paliek stabilas un vairākus gadus ir izteiktas minimāli [23, 29, 117].

Hroniskas limfoleikozes ārstēšanā tiek lietotas dažādas metodes: staru terapija, splenektomija, ķīmijterapija. Ķīmijterapijas metodēs izmanto gan *Chlorambucil* (*Leukeran*), ko lieto jau kopš 1955. gada, gan monoklonālās terapeitiskās antivielas (*Alemtuzumab*, *Mabthera*), ko lieto kopš 2008. gada. Minētās ārstēšanas metodes būtiski atšķiras blakus parādību ziņā, ietekmē uz slimnieka imūno sistēmu, dažas no tām būtiski palielina citomegalovīrusa infekciju risku, kā arī ļoti atšķirīgas ir kopējās ārstēšanas izmaksas [47, 56, 61, 188].

Ārsti nepārtraukti strādā pie savlaicīgas un maksimāli efektīvas ārstēšanas problēmas atrisināšanas. Tiek veikti vairāki pētījumi terapeitisko metožu efektivitātes noteikšanā, tiek pētīti jauni slimības marķieri [43, 54, 58, 148]. Visu šo pētījumu mērķis ir atklāt prognostiskos marķierus, ar kuru palīdzību var paredzēt iespējamo slimības norisi un pareizi izvēlēties individuālo terapiju. Šādai terapijai jābūt maksimāli efektīvai un minimāli agresīvi jāietekmē vispārējais veselības stāvoklis [111].

Slimības norises prognozes noteikšanai pašlaik tiek piedāvāti vairāki kritēriji, bet neviens no tiem nav absolūts. Tādi tradicionāli prognozes faktori kā slimības stadija diagnozes noteikšanas laikā, limfocītu daudzuma dubultošanās laiks, kaulu smadzeņu bojājumu raksturs, β_2 mikroglobulīna līmenis, audzēja šūnu imūnfenotipiskās īpatnības neatspoguļo audzēja bioloģiskās īpatnības [43]. Pašlaik ir iespēja veikt efektīvu terapiju optimālajos termiņos, tādēļ ir aktuāla prognostisko faktoru algoritmu izstrādāšana HLL norises prognozēšanai. Pētot HLL klīnisko norisi, zinātnieki atzīmē, ka tradicionālās taktikas vietā nāk terapija, kas adaptēta pēc riska, pie tam slimības sākumā nosakāmi HLL prognozes faktori [9, 18, 131, 136]. Praksē klasiskie vai dinamiskie prognozes marķieri – tādi kā kaulu smadzeņu infitrācijas tips, leikocītu līmenis, šķīstošā CD23 līmenis, CD38 un citi – korelē ar audzēja masu un ar laiku mainās. Turpretī neatkarīgie prognozes faktori kā ZAP-70 [33, 90], ar laiku nemainās un jau saslimšanas sākumā ļauj paredzēt HLL nelabvēlīgu norisi [125, 126, 161]. Īpaši svarīgi ir tas, ka neatkarīgie prognozes faktori ļauj izšķirt zema riska slimnieku grupas ar atšķirīgu prognozi agrīnu stadiju robežās [33, 77].

2. DARBA AKTUALITĀTE

HLL kā vienam no izplatītākajiem leikozes variantiem mūsdienu hematoloģijā ir veltīta liela uzmanība. Tiek veikti vairāki pētījumi jaunu prognostisko marķieru –ZAP-70 un CD154 – atklāšanā [183, 187]. Visu šo pētījumu mērķis ir atklāt prognostiskus marķierus, ar kuru palīdzību iespējams paredzēt slimības gaitu un pareizi izvēlēties individuālo terapiju. Šādai terapijai jābūt maksimāli efektīvai un minimāli agresīvi jāietekmē vispārējais veselības stāvoklis. Mūsdienās izmanto standarta diagnostiskos kritērijus, kas pieņemti ASV Nacionālā vēža institūta un HLL internacionālajā darba grupā [23, 30]. Izmantojamie diagnostiskie kritēriji ir limfocītu daudzums, atipisku šūnu skaits un kaulu smadzeņu infiltrācija. HLL pacientu diagnostikai un kontrolei ārstēšanas procesā izmanto dažādus laboratorijas rādītājus. Visizmantotamākie no tiem ir laktātdehidrogenāze (LDH), beta 2 mikroglobulīns (β_2 MG), CD19, CD5, CD23 fenotipiskie marķieri [43]. Šobrīd plaši izmanto arī ģenētiskās kontroles metodes. Mūsdienu klīniskās iestādes diagnostikā plaši izmanto 70-kDa zeta asociēto olbaltumvielu (ZAP-70), daži pētnieki iesaka izmantot timidīnkināzi (TK), bet šis parametrs līdz šim laikam hematoloģijā netika plaši izmantots [43, 101, 199].

Ievērojot mūsdienu atklājumu iespējas un laika nosacījumus, HLL problēmas izpētei Latvijā tika izvēlēti tādi diagnostiskie parametri kā ZAP-70, diferenciācijas klasteri 38 (CD38), TK, LDH, β_2 MG. Svarīgi, ka visas izvēlētās metodes ir neinvazīvas un tās var veikt ambulatori, kas ir piemērotāk un nekaitē pacientam. Pirmo reizi pasaulē ZAP-70 un TK HLL diagnostikai izmantoja Latvijā.

Šobrīd ir noteikta ZAP-70 olbaltumviela, kas korelē ar IgVH gēnu mutācijām, un var būt veiksmīgs mutatīvā statusa noteikšanas parametrs laboratorijās [110]. Pēdējo gadu darbos parādīts, ka HLL daudzveidīgās izpausmes ir saistītas, kā arī tās atspoguļo TK līmeni [54, 107]. Ir noteikts, ka jebkāda audzēja augšanas gadījumā TK līmenis paaugstinājās, jo šis marķieris atspoguļo audzēja šūnu mitotiskās dalīšanās aktivitātes posmu [53, 84]. Pētnieku kopums atzīmē, ka TK līmeņa paaugstināšanās HLL pacientu asins serumā raksturīga pacientiem ar ātri progresējošo slimības variantu. Augsts TK līmenis bieži vien tiek noteikts primāriem pacientiem slimības vēlīnākajās stadijās. Šai pašai pacientu grupai TK līmenis pazeminās lēnāk vai saglabājas paaugstināts, neskatoties uz veikto ārstēšanu [107, 109]. Svarīgi noteikt saistību starp TK līmeņa paaugstināšanos un CD38, kas ir imunoloģiskais prognostiskais faktors. Tā kā šos divus

parametrus vairums autoru izanalizēja neatkarīgi vienu no otra, nav publikāciju, kas norāda TK un CD38 atkarību. Daudzi autori uzskata, ka CD38 ir pamatrādītājs, kas raksturo HLL progresējošo variantu [36, 136].Pieejami dati, ka audzēja klona aktivitātes pieaugšana saistīta ar CD38 marķiera līmeņa paaugstināšanos šūnu virsmā un šo slimības variantu metastazēšanās procesu paātrināšanos [55, 93, 120].

No iepriekš minētā izriet, ka nepieciešama ZAP-70, TK un CD38 ekspresijas vispusīgā analīze, minēto prognostisko parametru saiknes noteikšana ar tādiem klasiskiem prognostiskiem parametriem kā leukocītu līmenis un absolūta limfocitoze, LDH un β_2 MG. Svarīga ir terapijas ietekmes noteikšana uz prognostisko parametru līmeni pacientiem atkarībā no audzēja procesa dinamikas.

2.1. Darba teorētiskais un praktiskais nozīmīgums

Ir piedāvāti jauni prognostiskie kritēriji HLL klīniskās norises slimības rakstura noteikšanai. Katram slimības norises variantam tika noteikts individuālais statistiskais prognostiskais faktors – ZAP-70. Noteikta CD38, TK līmeņa, β_2 MG, LDH un citu slimības parametru atkarība no leikozes procesa dinamikas. Iegūtie rezultāti kalpos par pamatu HLL diferencētās terapijas noteikšanai. Tas ir nozīmīgi terapeitiskās taktikas noteikšanā HLL slimniekiem agrīnās slimības stadijās.

2.2. Darba hipotēzes

1. HLL progresēšanas ātrums ir atkarīgs no ZAP-70 ekspresijas. Slimnieki ar šī marķiera pozitīvu ekspresiju atšķiras ar slimības progresējošu norisi, pacientu grupā ar ZAP-70 negatīvu ekspresiju slimības norise ir labvēlīga.

2. Slimniekiem ar II, III un IV stadiju un progresējošu norises variantu TK līmenis ir augstāks, nekā pacientiem ar 0 un I stadiju un labdabīgu norises variantu.

3. Starp ZAP-70 pozitīvu ekspresiju un paaugstinātu CD38, TK un citiem prognostiskiem marķieriem ir korelācija.

4. HLL slimniekiem ar pozitīvu ZAP-70 ekspresiju un slimības progresējošu variantu iespējams ievērojami paaugstināts CD38 un TK līmenis, kas izpaužas ar ātri progresējošu slimības variantu.

5. HLL slimniekiem ar pozitīvu ZAP-70 ekspresiju un slimības progresējošu variantu iespējams ievērojami paaugstināts CD38 un TK līmenis, kas izpaužas ar remisijas trūkumu pēc 6 un 12 mēnešu ķīmijterapijas kursiem.

6. ZAP-70 ekspresija, augsts CD38 un TK saturs HLL slimniekiem diagnostikas brīdī var tikt apskatīts kā nelabvēlīgās prognozes papildkritērijs: ZAP-70 pozitīvas ekspresijas, augsta TK un CD38 līmeņa slimības norises prognoze ir nelabvēlīga.

2.3. Darba novitāte

Balstoties uz pētījumos iegūto rezultātu vispusējas analīzes pamata, ir atlasīts slimības norises individuālais prognostiskais faktors – ZAP-70 mutatīvā statusa surogātmarķieris, kas ļauj prognozēt slimības norises variantu. Pirmreizēji šiem pacientiem veikta TK līmeņa analīze. TK tika analizēta slimniekiem atkarībā no stadijas un slimības norises varianta kopā ar citiem prognozes faktoriem, ievērojot slimības norises variantu. Noteikts ZAP-70 un TK prognostisko faktoru kā prognostisko marķieru svarīgums un nozīmīgums HLL klīniskās norises gadījumā. Šajā pētījumā Latvijā, pasaulē pirmo reizi ir apskatīti ZAP-70 un TK kopā.

3. DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

3.1. Darba mērķis

Izpētīt olbaltumvielas ZAP-70, CD38, TK, LDH, β_2 MG un citus rādītājus hroniskas limfoleikozes gadījumos un to ietekmi uz slimības gaitu un terapijas efektivitāti.

3.2. Darba uzdevumi

1. Noteikt ZAP-70 marķieri hroniskas limfoleikozes slimniekiem slimības diagnosticēšanas brīdī, kā arī tā saistību ar TK, CD38, LDH, β_2 MG rādītājiem.
2. Noteikt ZAP-70 marķiera izmaiņas dinamikā hroniskas limfoleikozes terapijas laikā pēc 6 un 12 mēnešiem.
3. Noteikt TK hroniskas limfoleikozes slimniekiem diagnosticēšanas brīdī, kā arī saistībā ar citiem rādītājiem.
4. Noteikt TK marķiera izmaiņas dinamikā hroniskas limfoleikozes terapijas laikā pēc 6 un 12 mēnešiem un tā saistību ar citiem rādītājiem.
5. Noteikt CD38 hroniskas limfoleikozes slimniekiem diagnosticēšanas brīdī, kā arī saistībā ar citiem rādītājiem.
6. Noteikt CD38 marķiera izmaiņas dinamikā hroniskas limfoleikozes terapijas laikā pēc 6 un 12 mēnešiem un tā saistību ar citiem rādītājiem.
7. Noteikt LDH hroniskas limfoleikozes slimniekiem diagnosticēšanas brīdī, kā arī saistībā ar citiem rādītājiem.
8. Noteikt LDH izmaiņas dinamikā hroniskas limfoleikozes terapijas laikā pēc 6 un 12 mēnešiem un tā saistību ar citiem rādītājiem.
9. Noteikt β_2 MG hroniskas limfoleikozes slimniekiem diagnosticēšanas brīdī, kā arī saistībā ar citiem rādītājiem.
10. Noteikt β_2 MG marķiera izmaiņas dinamikā hroniskas limfoleikozes terapijas laikā pēc 6 un 12 mēnešiem un tā saistību ar citiem rādītājiem.

4. LITERATŪRAS APSKATS

4.1. Definīcija

Hroniska limfoleikoze ir ļaundabīga asinrades slimība, kuras morfoloģiskais substrāts ir limfocīti, kas primāri proliferē kaulu smadzenēs, bet pēc tam izplatās arī perifēriskās asinīs, infiltrē limfmezglus, liesu, aknas un citus orgānus [62].

4.2. Hroniskas limfoleikozes izplatība

No visiem ar leikozi saslimušajiem eiropēidās rases pārstāvjiem Rietumu puslodē 25–30% saslimst ar hronisku B šūnu limfoleikozi. Diagnozes noteikšanas brīdī pacientu vidējais vecums ir 65 gadi, taču 10–15% slimnieku slimība sākas līdz 50 gadiem [117].

Vīrieši slimo biežāk nekā sievietes – attiecīgi 3,9 un 2,0 uz 100 000 cilvēkiem [142, 188]. Saslimstība ar hronisku limfoleikozi Eiropā variē no 1,8 līdz 3 cilvēkiem uz 100 000 iedzīvotājiem. Gadā ir 10 000 jaunu saslimšanas gadījumu [87]. ASV ikgadējā saslimstība – 3,5 gadījumi uz 100 000 cilvēkiem, jaunu gadījumu skaits ir aptuveni 7000 gadā [63, 86]. Cilvēkiem, kas vecāki par 65 gadiem, iespēja saslimt palielinās līdz 20 gadījumiem uz 100 000 cilvēkiem, bet vecākiem par 70 gadiem – līdz 50 gadījumiem uz 100 000 cilvēkiem [98, 135].

Tāpat kā ASV, arī Eiropā 95% gadījumu no visām hroniskajām limfoleikozēm slimībai ir B šūnu fenotips, savukārt Āzijas valstīs pārsvarā ir T šūnu fenotips [22, 72, 154].

Hroniskas B šūnu limfoleikozes prognoze ir ļoti dažāda: saslimušo dzīvildze svārstās no dažiem mēnešiem līdz gadu desmitiem [135].

4.3. Hroniskas B šūnu limfoleikozes etiopatogēnēze

XXI gadsimta sākumā ir izdevies izprast hroniskas limfoleikozes bioloģiskos pamatus, dabisko gaitu un ārstēšanu, tomēr joprojām nav zināms slimības cēlonis [21].

Ir teorijas par ģenētisko izmaiņu lomu hroniskas limfoleikozes attīstībā, tomēr vēl joprojām nav atrasts gēns, kas veicinātu saslimstību [62]. Ir novērots, ka hroniska limfoleikoze prevalē pirmās pakāpes radiniekiem, ar katru nākamo paaudzi slimība sākas gados arvien jaunākiem cilvēkiem un tās gaita kļūst smagāka (anticipācijas, iepriekšparedzamības, pareģošanas fenomens), kā arī ir saistīta ar biežāku autoimūno traucējumu sastopamību pacientu radiniekiem [21, 33, 35, 89]. Liela nozīme ir atsevišķām punktveida mutācijām, kuras var būtiski ietekmēt gan prognozi, gan ārstēšanas efektivitāti [5, 50, 60, 118].

Hroniskas limfoleikozes attīstībā tieša etioloģiska loma nav ne ārējās vides faktoriem – tādiem kā jonizējošais starojums, ķīmiskie aģenti (benzols un gumijas ražošanā izmantotie šķīdinātāji) –, ne arī medikamentiem [6, 10, 122].

Mūsdienās visprecīzāk hroniskas limfoleikozes dabu izskaidro bioloģiskās koncepcijas, ar kuru palīdzību sekmīgi tiek mēģināts skaidrot bioloģisko procesu traucējumus B šūnās, balstoties uz zināšanām par apoptozes mehānismiem, B limfocītu šūnu ciklu, audzēja B šūnu ģenētiskajām atšķirībām, hromosomu anomālijām, signālmolekulu hiperekspresiju, kā arī, balstoties uz datiem par traucējumiem dažādos procesos B šūnu funkcionālajā aktivitātē un tajā mikrovidē, kas tos apņem limfmezglos un kaulu smadzenēs [67, 136, 165].

Saskaņā ar šīm koncepcijām hroniska limfoleikoze ir modelis traucējumiem ar apoptozi programmētai šūnu nāvei un to pavada līdzsvara izmaiņas apoptozes regulējošās olbaltumvielās [2, 4, 94].

Ilgu laiku tika uzskatīts, ka slimības substrāts ir jaunie B limfocīti, taču pēdējā laikā noskaidrots, ka vismaz pusei saslimšanas gadījumu ļaundabīgi pārveidotās šūnās ir tādi B limfocīti, kas jau sastapušies ar antigēnu un reaģējuši germinatīvos centros, kļūstot par tā saucamajām B atmiņas šūnām [4]. Kā zināms, pirms saskarsmes ar antigēnu B limfocītu priekštečiem kaulu smadzenēs notiek imūnglobulīnu vieglo un smago ķēžu veidojošo gēnu pārkārtošanās un uz jauno B limfocītu virsmas membrānām ekspresējas M un D imūnglobulīni. Tad šie limfocīti nonāk perifērajā asinsritē un pēc tam nokļūst arī limfmezglos. Pēc saskarsmes ar antigēnu limfmezglu garozas primārajos folikulos tiek iniciētas mutācijas, kas skar imūnglobulīnu (IgVH) variablos domēnus, ar mērķi paaugstināt piesaistīšanas afinitāti B šūnu antigēna receptoros (BCR). Tādā veidā vairošanās centros nebijušie un bijušie B limfocīti atšķiras pēc tā, ir vai nav mutācijas IgVH gēnos un attiecīgi – pēc membrānas un citoplazmas olbaltumvielu spektra audzēja šūnās [40, 58, 79].

Daudzie pētījumi par mutāciju statusu izraisījuši diskusiju par to, vai hroniskai B šūnu limfoleikozei ir viens vai divi slimības varianti [45]. Ir zināms, ka hroniskās B šūnu limfoleikozes apakštips ar VH gēnu mutācijām ir vienlīdz izplatīts kā sievietēm, tā vīriešiem, tajā pašā laikā hroniskās B šūnu limfoleikozes apakštips bez VH gēnu mutācijām trīs reizes biežāk sastopams vīriešiem. Pastāv uzskats, ka abi B šūnu apakštipi pacientiem ar hronisku B šūnu limfoleikozi ir būtiski atšķirīgi, un tie savstarpēji nepārvēršas viens par otru [90, 148]. Pēdējā laikā notiek pētījumi, lai atrastu jaunus B šūnu limfoleikozes apakštipus ar gēnu mutācijas variantu imūnglobulīnu variablajos domēnos [69, 173].

Hroniskās limfoleikozes gadījumā limfocītiem ir absolūti raksturīgs imūnfenotips. Tie uz savas virsmas ekspresē antigēnus CD19, CD5, CD23, kā arī tiek atzīmēta vāja ekspresija uz imūnglobulīnu (ekspresējas IgM, nereti vienlaicīgi ar IgD) un antigēnu CD20 un CD22 virsmas [135, 154, 155].

Hroniska B šūnu limfoleikoze ir heterogēna pēc savām klīniskajām izpausmēm. Līdz 1990. gadam šai slimībai pieskaitīja daudzus citus limfātisko audzēju gadījumus, tai skaitā liesas limfocitomu, mantijas zonas un folikulu centra limfomu, kā arī T šūnu leikozes. Fundamentālās imunoloģijas sasniegumi un imūnfenotipēšanas ieviešana praksē atļāva diferencēt šīs nozoloģiskās formas kā tādas, kas neattiecas uz hronisko B šūnu limfoleikozi [75, 154].

4.4. Hroniskas B šūnu limfoleikozes klīniskās gaitas īpatnības

4.4.1. Hroniskas limfoleikozes klīniskā aina un klasifikācija

Pārejot pie slimības klīnisko simptomu apraksta, ir jāatzīmē, ka bieži, notiekot rutīnas izmeklējumam, vienīgā pazīme, kas mudina apsvērt hroniskas limfoleikozes diagnozi, ir palielināts leukocītu skaits ar absolūtu limfocitozi, un pēc tā var rasties limfadenopātijas [142, 154]. Citi iespējamie simptomi ir vājums, nogurums, nakts svīšana, drudzis, infekcijas vai autoimūna slimība [44, 164]. Objektīvā izmeklēšanā parasti atrade ir palielināti, blīvi, nesāpīgi un kustīgi limfmezgli, splenomegālija vai hepatomegālija. Vēl iespējami metabolie traucējumi vai mehāniskie traucējumi (elpceļu obstrukcija), kas saistīti ar audzēja radīto spiedienu. Iespējama leikozes šūnu infiltrācija jebkurā ķermeņa daļā, tajā skaitā ādā, smadzeņu apvalkos, muskuļos [46, 146]. Viena no hroniskas limfoleikozes klīniskajām īpatnībām ir pacienta samazināta pretestība pret

bakteriālām infekcijām. Starp visbiežākajām infekciozajām komplikācijām ir pneimonijas, urīnceļu infekcijas, angīnas, abscesi, septiski stāvokļi. Hroniskas limfoleikozes pacientu mirstības struktūrā infekcijas sastopamas 60–80% [146].

Hroniskās limfoleikozes klīniskās izpausmes mainās līdz ar slimības gaitu. Hroniskas limfoleikozes stadijas noteikšanai izplatītākās ir Raja (*K. Rai*) (1975) un Binē (*J. Binet*) (1981) klasifikācijas sistēmas (4.1., 4.2. tabula) [9, 113, 144, 199].

4.1. tabula

Hroniskās limfoleikozes stadijas pēc Binē

Stadija	Raksturojums
A	Hemoglobīns >100 g/l Trombocītu līmenis >100 x 10 ⁹ /l Skarti <3 limfātiskie apgabali *
B	Hemoglobīns >100 g/l Trombocītu līmenis >100 x10 ⁹ /l Skarti >3 limfātiskie apgabali
C	Hemoglobīns <100 g/l vai Trombocītu līmenis <100 x10 ⁹ /l

*Ar limfātiskajiem apgabaliem jāsaprot: kakla, padušu, cirkšņu limfmezgli, aknas un liesa.

Binē klasifikācijā pamatkritērijs ir hemoglobīna līmenis, trombocītu līmenis un skartie limfātiskie apgabali. Vidējā dzīvildze katrai stadijai klasifikācijas izveidošanas brīdī: A stadija – vairāk nekā 120 mēneši, B stadija – 61 mēnesis, C stadija – 22 mēneši.

4.2. tabula

Hroniskās limfoleikozes stadijas pēc Raja

Stadija	Raksturojums
0	Tikai limfocitoze
I	Palielināti limfmezgli; liesa un aknas nav palielinātas, anēmijas un trombocitopēnijas nav
II	Palielinātas aknas un/vai liesa, anēmijas un trombocitopēnijas nav
III	Kaulu smadzeņu infiltrācijas izraisīta Hb pazemināšanās zemāk par 110 g/l – jebkādas klīniskās ainas gadījumā
IV	Trombocītu skaita samazināšanās zemāk par 100 x 10 ⁹ /l – jebkādas klīniskās ainas gadījumā

Raja klasifikācijas pamatkritēriji ir hemoglobīna līmenis un trombocītu skaits. Pacienta vidējā dzīvildze klasifikācijas izveidošanas brīdī: 0 stadija – vairāk nekā 120

mēneši, I stadija – 95 mēneši, II stadija – 72 mēneši, III stadija – 30 mēneši un IV stadija – 30 mēneši.

Klīniskā stadija saglabā savu lomu kā vissvarīgākais prognostiskais faktors, bet tā neatspoguļo hroniskās limfoleikozes ar B leikozes šūnu mutāciju statusu saistītās norises raksturu [98, 199].

1985. gadā A. I. Vorobjovs (*A. I. Vorobyev*) un M. D. Brilliantis (*M. D. Brilliant*) piedāvāja hroniskās limfoleikozes klasifikāciju, kurā, pamatojoties uz morfoloģiskajām un klīniskajām pazīmēm, ietverot arī terapijas efektivitāti, tika mēģināts izdalīt šādas hroniskās limfoleikozes formas:

- labdabīgo;
- klasisko (progresējošo);
- audzēja;
- splenomegālisko;
- kaulu smadzeņu;
- prolimfocitāro;
- hroniskas limfoleikozes formu ar citolīzi kā komplikāciju;
- hroniskas limfoleikozes formu, kas norit ar paraproteinēmiju;
- mataino šūnu leukēmija;
- T šūnu hroniska limfoleikoze [178, 179].

Šī klasifikācija zināmā mērā ir zaudējusi savu nozīmi, jo agrāk pie tā saucamajām hroniskās limfoleikozes formām pieskaitīja arī citas slimības.

Zinātniskajā darbā tika izmantota Raja klasifikācija, jo šī klasifikācija detalizētāk raksturo HLL aktivitāti un izpausmes.

4.4.2. Hroniskas limfoleikozes galvenās komplikācijas

Papildus oportūnistisko infekciju attīstībai hroniskai limfoleikozei raksturīgas autoimūnās komplikācijas – autoimūnā hemolītiskā anēmija un autoimūnā trombocitopēnija. Slimības gaitā autoimūnā hemolītiskā anēmija attīstās 10–25% gadījumos. Eritrocītu hemolīzei var būt akūtas un negaidīti noritošas hemolītiskās krīzes raksturs, ko pavada temperatūras paaugstināšanās, ādas dzelte un tumši iekrāsots urīns, paaugstināts netiešā bilirubīna līmenis asins serumā. Anēmijas ātrā attīstība un

progresēšana kļūst par slimnieka stāvokļa krasas pasliktināšanās iemeslu un var kļūt bīstama dzīvībai, īpaši, ja slimniekam ir sirds vai plaušu blakusslimības. Biežāk autoimūnā hemolīze attīstās pakāpeniski. Autoimūnā trombocitopēnija sastopama retāk nekā anēmija, pavisam tikai 2–3% gadījumu, taču tā var būt bīstama, jo bieži kļūst par slimnieku nāves cēloni- dzīvību apdraudošu asiņošanu vai asinsizplūdumu smadzenēs dēļ [167, 185].

Galvenās hroniskas limfoleikozes komplikācijas parādītas 4.3. tabulā [154].

4.3. tabula

Galvenās hroniskas limfoleikozes komplikācijas (C. Rozman, E. Montserrat, 1995)

Galvenās komplikācijas		Slimnieku skaits, %
Autoimūnās komplikācijas	Pozitīvs tiešais antiglobulīna tests, tiešā Kumbsa reakcija	8–35
	Hemolītiskā anēmija	10–25
	Trombocitopēnija	2
	Neitropēnija	0,5
	Īstā sarkano šūnu aplāzija	0,5
Hipogammaglobulinēmija		20–60
Infekcijas	Visbiežākie izraisītāji – <i>S. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , kā arī <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> dzimtu sēnes, <i>Varicella-zoster virus</i>	8-12
	Citi – <i>Legionella</i> , <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Listeria</i> , <i>Toxoplasma</i> , <i>Cytomegalovirus</i>	1-2
Slimības transformācija	Prolimfocitāra leikozē	10
	Lielo šūnu limfoma (Rihtera sindroms)	3–5
	Akūta leikozē	<1
	Multiplā mieloma	<1
Sekundāri audzēji	Visbiežāk iespējamās lokalizācijas – āda, plaušas, kuņģa un zarnu trakts	5–15
Iespējamās asociētās slimības	Hematoloģiskie audzēji: Hodžkina slimība, īstā policitēmija, esenciālā trombocitēmija, hroniskā mieloleikozē, idiopātiskā mielofibroze, mielodisplastiskais sindroms	3–4
	Autoimūnās slimības: Šegrēna sindroms, reimatoīdais artrīts, sistēmiskā sarkanā vilkēde, autoimūnais tireoidīts, perniciozā anēmija, nespecifiskais čūlainais kolīts	2–3
	Citi: Kapoši sarkoma, neitrofilais sindroms, bullozais pemfigoīds, vaskulīts, hepatorenālais sindroms	0,5–1

Plašā amplitūdā svārstās kā slimības attīstības tempi, tā arī ātrums, ar kādu palielinās leukocītu skaits, limfmezglu un liesas lielums. Daudziem slimniekiem slimība nenovēršami progresē, un, neraugoties uz ārstēšanu, pat pie mūsdienu terapijas, dzīvildze nepārsniedz 4–5 gadus.

Hroniskas limfoleikozes gadījumā nāve bieži iestājas no komplikācijām slimības gaitā. Lielo šūnu limfoma attīstās 5% slimnieku un ne vienmēr tā ir rezultāts audzēja progresēšanai. Variablā dominējošā gēnu analīze parāda, ka pusē no gadījumiem lielo šūnu limfoma ir jau otrais audzējs. Lielo šūnu limfomas rašanos uz hroniskās B šūnu limfoleikozes fona sauc par Rihtera sindromu. Transformācija bieži notiek vēdera dobuma limfmezglos un paliek nediagnosticēta. Rihtera sindromam raksturīga slikta prognoze un rezistence pret ķīmijterapiju [65, 138, 152].

4.4.3. Indikācijas terapijas sākšanai

Dažiem pacientiem pēc HLL diagnozes noteikšanas nav nepieciešama neatliekamās ārstēšanās uzsākšana. Ilgu laiku ārsti praktizēja gaidīšanas un vērošanas metodi. Šīs metodes laikā tika veikta leukocītu līmeņa asins analīzēs un kopējas klīnikas novērošana.

Limfocītu skaita divkāršošanās laiks ir viens no svarīgākajiem faktoriem slimības aktivitātes noteikšanā. Limfocītu skaita divkāršošanās laiks, kas ir lielāks nekā 12 mēneši, raksturo pacientu grupu ar salīdzinoši labu prognozi. Pacientiem ar leukocītu divkāršošanās laiku, kas mazāks par 6 mēnešiem, vidējais izdzīvošanas ilgums ir ievērojami mazāks nekā kopēji pacientiem ar hronisko B šūnu limfoleikozi, un tā ir indikācija terapijas uzsākšanai. Tomēr, saskaņā ar E. Nikitina datiem šī rādītāja prognozējošā loma saglabājas tikai II stadijas ietvaros [135]. Pamatojoties uz šiem parametriem, tika izveidoti HLL aktivācijas kritēriji un rekomendācijas terapijas uzsākšanai.

Aktīvas hroniskās limfoleikozes kritēriji pēc Binē u.c. (Binet et al.) (1981) [9, 142]:

- Pieaugoša anēmija un/vai trombocitopēnija, ko izraisa kaulu smadzeņu infiltrācija.
- Autoimūna anēmija un/vai trombocitopēnija, kas ir rezistenta pret prednizolonu.

- Liesa sasniedz lielus izmērus (>6 cm zem ribu loka), skaidri redzama liesas augšana. Ultrasonogrāfiskā norma ir līdz 10 cm garumā.
- Masīva un pieaugoša limfadenopātija (viens no konglomerātiem pārsniedz 10 cm).
- Limfocitozes pieaugums lielāks nekā 50% divu mēnešu laikā; gaidāmais limfocītu divkāršošanās laiks mazāks nekā 6 mēneši.
- Izteikta hipogammaglobulinēmija un monoklonālas sekrēcijas klātbūtne.

Aktīvas hroniskās limfoleikozes kritēriji pēc Raja u.c. (*Rai et al.*) (1995) atšķiras pēc trim kritērijiem [142]:

- Limfocītu divkāršošanās laiks <12 mēneši.
- Leikocitozes augšējais līmenis – $150 \times 10^9/l$.
- Tendence bakteriālām infekcijām.

Tajā pašā laikā aptuveni 15–20% pacientu slimības klīniskie un hematoloģiskie rādītāji daudzus gadus paliek stabili un minimāli izteikti. 10–15 gadu laikā, bet atsevišķos gadījumos 20–30 gados leikocītu skaits palielinās līdz $10\text{--}20 \times 10^9/l$, limfocītu skaits asinīs palielinās līdz 60–70%, kaulu smadzenēs līdz 45–55%; hemoglobīna saturs, eritrocītu un trombocītu skaits ir normāls. Šādas „sastingušas” vai „gruzdošas” hroniskās limfoleikozes formas gadījumā dzīvildze var vispār nebūt atkarīga no šīs slimības esamības, tomēr daļai slimnieku pēc vairākiem gadiem arī šī varianta gadījumā var parādīties slimības progresēšanas pazīmes [185, 191].

Lēni noritošas („gruzdošas”) hroniskās limfoleikozes kritēriji pēc E. Montserata u.c. (*E. Montserrat et al.*) (1988) [121, 133]:

- Stadija pēc Binē un Raja A, 0(1).
- Infiltrācija kaulu smadzenēs pēc ne difūzā tipa.
- Limfocītu divkāršošanās laiks >12 mēneši.
- Absolūtais limfocītu skaits $\leq 30000 \times 10^9/l$.
- Normāls hemoglobīna līmenis.

Šobrīd nevar paļauties tikai uz slimnieku klīniskiem un asins analīžu parametriem, jo jaunas metodes ļauj atklāt prognostiski svarīgus rādītājus situācijās, kad pēc standarta rekomendācijām ārstēšana vēl nav nepieciešama.

Mūsdienās, kad izmanto daudzus jaunus prognostiskus parametrus, agrāk izstrādātās rekomendācijas terapijas uzsākšanai zaudē savu aktualitāti. Izmantojot jaunas diagnostiskas metodes un iegūstot rezultātus ar paaugstinātiem prognostiskiem

marķieriem agrīnās slimības stadijās, var aizdomāties par slimības nelabvēlīgo gaitu un ātri progresējošo variantu. Šādos gadījumos ārstēšana jāuzsāk nekavējoties [169].

4.5. Hroniskas limfoleikozes diagnostika

Mūsdienās hroniskas limfoleikozes diagnostikai izmanto šādus parametrus:

- Asins analīze.
- Plūsmas citometrijas metode.
- Kaulu smadzeņu histoloģisks izmeklējums.

Atbilstoši starptautiskajiem kritērijiem un saskaņā ar Nacionālā vēža institūta 1996. gada rekomendācijām hroniskas limfoleikozes diagnostikai priekšnoteikums ir trīs pazīmju esamība: absolūta leukocitoze ar limfocītu skaitu vairāk par $5 \times 10^9/l$, Gumprehta ēnu esamība citoloģiskā izmeklēšanā, apstiprināta leukēmisko limfocītu B šūnu klona esamība kaulu smadzeņu biopātā izmeklējumā [30].

Lai apstiprinātu diagnozi, kaulu smadzeņu aspirātā ir nepieciešama vairāk nekā 30% neoplastisko limfocītu esamība. Šobrīd, izmantojot tādas mūsdienu izmeklēšanas metodes kā plūsmas citometriju, HLL diagnostikai kaulu smadzeņu analīze ir nepieciešama retāk. Hroniskās limfoleikozes diagnoze tiek uzskatīta par apstiprinātu tikai pēc imunoloģiskā izmeklējuma [75]. Kaulu smadzeņu šūnu un perifēro asiņu imūnfenotipēšana, izmantojot klasisko antigēna–antiviēlas reakciju, specifiskie imunoloģiskie marķieri, kas raksturīgi dažādu leikozu formu audzēja šūnām. Praktiskiem nolūkiem maksimāli adaptēta un visvieglāk atspoguļojama ir plūsmas citometrija.

Lai precīzi noteiktu B šūnu HLL diagnozi ar plūsmas citometriju, ir jāanalizē monoklonāla šūnu populācija. Fenotipiski par B šūnu HLL liecina CD19, CD23, CD5, CD20 marķieru ekspresija uz limfocītiem [189].

Tomēr jāatzīmē, ka 7–20% pacientu nav CD5 ekspresijas (kuru esamību saista ar autoimūnām reakcijām). Pēc S. Efstatio (*S. Efsthathiou*) (2002) datiem, CD5 negatīviem pacientiem ir vieglāka slimības gaita ar labvēlīgu prognozi nekā CD5 pozitīviem pacientiem [52, 182].

Hroniska T šūnu limfoleikoze ir retāka nekā B šūnu limfoleikoze – tikai 2% leikozes gadījumu variantu. Šī slimība pirmreizēji reģistrēta 1970. gadu beigās Karību baseina valstīs un Dienvidjapānā [22, 72]. Smagā formā leikoze noritēja ļoti ātri:

slimnieki gāja bojā pēc 3–4 mēnešiem [100]. Cilvēka akūtas T šūnu leikozes izraisītājs bija vīruss, ko nosauca par cilvēka T šūnu leukēmijas vīrusu (HTLV-I) [106, 198]. T HLL ir spilgti izteiktas klīniski hematoloģiskās īpatnības: augsta leukocitoze, no tiem 20% un vairāk prolimfocīti un 30%–40% nobriedušo limfocītu, splenomegālija, nereti hepatomegālija, retāk limfadenopātija, ātra audzēja progresija, biežas un izteiktas autoimūnās komplikācijas un rezistence pret terapijas. CD3, CD4 un retāk CD8 – tas ir T HLL raksturīgs fenotips [103, 174].

4.6. Prognostiskie kritēriji

Šobrīd aktīvi tiek precizēti iespējamie riska faktori, un liela uzmanība tiek pievērsta prognostisko kritēriju izpētei hroniskas B šūnu limfoleikozes slimniekiem. Katrā atsevišķā gadījumā ir jābūt pareizai individuālai pieejai, kad jāņem vērā:

- Slimnieku kontroles taktika (uzsākt ārstēšanu vai gaidīt un vērot).
- Iespējamās blakusparādības un komplikācijas terapijas laikā (piemēram, citomegalovīrusa infekcija).
- Ārstēšanās izmaksu atšķirības.
- Iespējamie riska faktori (izmantojot invazīvās metodes).
- Diagnostikas izmaksu atšķirības.

Tiek prognozēts, ka, pamatojoties uz šīm zināšanām, var uzlaboties pacientu atlase terapijas uzsākšanai un ārstēšanas stratēģijas izvēle [70].

4.6.1. Perifērā asins aina

Perifērā asins aina B HLL gadījumā ir atkarīga no slimības stadijas, parastā asins ainā ir normāls vai nedaudz paaugstināts limfocītu daudzums. Parasti anēmiju vai trombocitopēniju nekonstatē. Leikocitārā formulā morfoloģiski nobriedušo leukocītu procents ir no 45% līdz 90%, sastopami arī atsevišķi prolimfocīti, ir arī relatīva vai absolūta neitropēnija. Perifērajā asins ainā limfocītiem B HLL gadījumā raksturīgs neliels izmērs (7–10 μm), apaļš kodols, hromatīna blokveida izvietojšanās, nukleolu

trūkums, šaura, retāk plata, bazofilās krāsas citoplazma. Sastopamas citolīzes šūnas. Tādēļ imūnfenotipiskai analīzei ir svarīga diagnostiska nozīme.

4.6.2. Imunoloģiskie prognostiskie faktori

B HLL ir limfoīdo audu audzējs, kam raksturīgs kaulu smadzeņu un limfmezglu bojājums. Audzēja transformācija notiek naivo jeb jaunavīgo (pregerminālo) B limfocītu līmenī, ar to bloķēšanu turpmākā diferenciācijā un audzēja šūnu klona proliferācijā [34, 64]. Svarīgākie B HLL kritēriji ir ne tikai perifēro asiņu absolūtā limfocitoze, limfocitoze kaulu smadzenēs, bet arī asins šūnu imunoloģiskais fenotips. Vizuāli vērtējot limfocītus, grūti noteikt to specifiskumu. Dažos B HLL gadījumos var sastapt šūnas ar atipisko limfocītu morfoloģiju, bet šai slimībai raksturīgu imunoloģisko fenotipu. Tādēļ svarīga diagnostiskā nozīme ir imūnfenotipiskai analīzei [198]. B HLL raksturīgās audzēja šūnas ekspresē B šūnu CD19, CD20 (vāja), CD79b, CD23, CD5, antigēnus, tiek atzīmēta vāja virspusēju imūnglobulīnu IgM vai IgM+IgD klases vieglo ķēžu restrikcija (kappa vai lambda), variabli parādās aktivācijas antigēni CD38, CD25 [81, 86, 120, 153].

CD38 ekspresija uz vairāk nekā 20% CD19+/CD5+ šūnu asociējas ar sliktu prognozi. Lai apstiprinātu B HLL diagnozi ar plūsmas citometrijas palīdzību, ir pietiekami noteikt limfocītu fenotipu ar sekojošu CD19+ /CD23+ /CD5+ antigēnu komplektu. Slimības prognozes vērtēšanai nepieciešama papildu marķieru noteikšana [43, 71].

CD19 ir 95 kDa molekula, virspusējais membrānais antigēns, ekspresējas uz B limfocītiem un folikulāro dendrītšūnu virsmas. Ekspresējas kā uz nobriedušām, tā arī uz nenobriedušām B neoplastiskām šūnām, retos gadījumos uz neoplastiskām plazmatiskām šūnām [73, 198].

CD20 ir olbaltumviela, kas ir uzrādīta uz nenobriedušu vai nobriedušu B šūnu virsmām. CD20 funkcija līdz galam nav skaidra, tomēr šis marķieris raksturo B limfocītu aktivāciju, regulē to augšanu, kalcija transmembrāno apmaiņu [112, 186].

CD23 spēj ekspresēties ar labdabīgām B šūnām, biežāk ekspresējās ar šūnām HLL gadījumā. Gan antigēna CD23 ekspresija, gan antigēna CD5 ekspresija kopā – tā ir klasiska imūnfenotipiskā pazīme, kas liecina par hronisku B šūnu limfocitozi. Absolūtu ekspresijas neesamību šajā gadījumā atzīmē ļoti reti [43, 126, 145].

CD23 ekspresijas pētīšana parādīja, ka tās līmeņa paaugstināšanās asins serumā ticami saistīta ar dzīves ilguma pazemināšanos un var kalpot par īpaši jutīgu prognostisku marķieri HLL slimniekiem [125].

Retos gadījumos ir iespējams CD23+ pie limfomām no mantijas zonas, un šajā gadījumā asociējas ar p53 ekspresiju [49].

CD5 ir 67 kDa, pan T šūnu antigēns, ekspresējas uz nobriedušiem vai nenobriedušiem T limfocītiem. Raksturo T šūnu novirzi uz neoplastisku procesu. Antigēns var tikt uzrādīts uz limfoido audu B šūnu virsmas. Šī antigēna ekspresija ir tipiska limfocītiem B HLL un limfomas no mantijas šūnām gadījumā [145].

Saskaņā ar G. Kartrona (*G. Cartron*) (1998) datiem [19] pacientiem, kuriem nav CD5 ekspresijas, biežāk rodas izolēta splenomegālija, bet vidējā izdzīvošana būtiski neatšķiras, salīdzinot ar CD5+ pacientiem [181]. Turpretī S. Efstatio u.c. (*S. Efsthathiou et al.*) (2003) apgalvo, ka slimības gaita ir labvēlīgāka CD5 ekspresijas klātbūtnē: agrāka slimības stadija diagnozes noteikšanas brīdī, mazāk izteikta splenomegālija. Konstatēts, ka hroniskas limfoleikozes agrajās stadijās splenomegālija, limfadenopātija un hemolītiskā anēmija tiek diagnosticēta biežāk CD5+ pacientiem nekā CD5– pacientiem [52, 182].

Zināmi B šūnu limfoleikozes attīstības gadījumi ar atipisku antigēnu CD5, CD23, CD22, CD79b ekspresiju [108]. 7–20% pacientu ar hronisku B šūnu limfoleikozi vispār nav antigēna CD5 (šī antigēna klātesamību saista ar autoimūnām reakcijām) ekspresija [38].

Palielināta antigēna CD22 ekspresija, nereti kopā ar CD79b ekspresiju, ir viena no visbiežāk atklātajām imūnfenotipu anomālijām hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientiem. Tā saistīta ar šūnu atipisku morfoloģiju, palielinātu imūnglobulīnu blīvumu uz virsmas membrānām, ar 12. hromosomas trisomiju, ar izteiktāku limfocitozi un vēlāku slimības stadiju diagnozes noteikšanas brīdī [4, 5, 134].

Imunoloģisko prognostisko faktoru vidū jāatzīmē antigēna CD38 ekspresija. Daži autori uzskata, ka tas ir pamatrādītājs, lai noteiktu pacientus ar vislielāko slimības progresēšanas iespēju [93, 120, 172]. Ekspresijas līmenis vairāk nekā 30% no leikozes šūnām ilgu laiku tika uzskatīts par negatīvu prognostisku pazīmi hroniskai B šūnu limfoleikozei. Pēc C. C. Čanga u.c. (*C. C. Chang et al.*) (2003) datiem, vidējais slimnieku izdzīvošanas laiks CD38 ekspresijas klātbūtnes/neesamības (respektīvi, CD38– un CD38+) gadījumā bija attiecīgi 51 un 103 mēneši. Salīdzinot CD38 ekspresiju un mieloīdasociēto (CD11c, CD11b, CD13, CD15, CD33) marķieru

ekspresiju, izrādījās, ka pēdējo klātbūtnei nav ietekmes uz slimības prognozi un tā nenosaka nepieciešamību sākt specifisku terapiju [24, 31, 39, 82].

4.6.3. Kaulu smadzeņu infiltrācija

Kaulu smadzeņu infiltrācijas tips (difūzais versus nodulārajam un intersticiālajam) atkarīgs no leikozes stadijas. Parasti 0 stadijai raksturīgi, ka kaulu smadzenes ir skartas atbilstoši nodulāram un intersticiālam tipam, bet, slimībai progresējot, tiek konstatēta difūza kaulu smadzeņu infiltrācija [155]. Difūzām infiltrācijas variantam ir raksturīga totāla vai subtotāla kaulu smadzeņu infiltrācija ar maza izmēra limfocītiem. Nodulārai raksturīgi perēkļaini dažādas formas maza izmēra limfocitārie agregāti (infiltrāti) kaulu smadzenēs. Intersticiālam variantam raksturīga sinusoidāla un intrasinusoidāla mazo limfocītu infiltrācija kaulu smadzenēs [128].

4.6.4. Limfocītu skaita dubultošanās laiks

Limfocītu dubultošanās laiks – ļoti parasts laboratoriskais rādītājs, kas ļauj orientēties B HLL prognozē. Šis profesora E. Montserata (*E. Montserrat*) 1986. gadā piedāvātais rādītājs būtiski papildina B HLL stadijas, jo stadiju konstatācija neatzīst B HLL progresijas ātrumu [130].

Limfocītu skaita dubultošanās laiks, kas ir lielāks par 12 mēnešiem, raksturo pacientu grupu ar salīdzinoši labu prognozi. Pacientiem ar leikocītu dubultošanās laiku, kas mazāks par 6 mēnešiem, vidēja dzīvildze ir ievērojami mazāka nekā vidēji pacientiem ar hronisko B šūnu limfoleikozi, un tā ir indikācija terapijas uzsākšanai. Tomēr, saskaņā ar E. Nikitina (*E. Nikitin*) datiem šī rādītāja prognozējošā loma saglabājas tikai II stadijas ietvaros [135, 177]. Klīniskos pētījumos šis rādītājs tiek aprēķināts šādi: limfocītu dubultošanās laiks (LyDL) = limfocītu sākotnējais līmenis (lysl) (μ l) reiz mēnešu skaits (msk) starp mērījumiem sadalīts ar starpību starp otro (Olym) un pirmo limfocītu mērījumiem (Plym) (μ l).

$$\text{LyDL} = \text{lysl} \times \text{msk} / \text{Olym} - \text{Plym} (\mu\text{l})$$

Šis rādītājs nav stabils, tas ar laiku var mainīties. Nevar teikt, ka dubultošanās laiks tieši saistīts ar proliferatīvo aktivitāti. B HLL šūnas daļās vairāk kaulu smadzenēs,

bet asinīs vairāk pakļautas apoptozei. Tādēļ dubultošanās laiks ir audzēja klona un mikrovīdies savstarpējo attiecību rezultāts. Svarīgi, ka šim rādītājam ir liela klīniskā nozīme [123, 150].

4.6.5. Laktātdehidrogenāze (LDH)

Laktātdehidrogenāze ir glikolītiskais ferments, kas piedalās glikozes transformācijas (piruvāta un laktāta interkonversijas katalīze) beigu etapos, katalizē atgriezenisko L laktāta oksidācijas reakciju piruvātā [88, 179].

LDH – citoplazmatiskais, cinku saturošs ferments sastopams praktiski visos cilvēka audos un orgānos, tā koncentrācija audos ir daudz lielāka nekā asins serumā. Vislielākā aktivitāte tiek atzīmēta nierēs, aknās, sirdī, skeleta muskuļos, aizkuņģa dziedzerī, asins šūnās (dažādi audi atšķiras pēc LDH izofermentatīvā sastāva) [86].

LDH līmeņa paaugstināšanās asins serumā tiek atklāta vairumam pacientu ar ļaundabīgām slimībām. Īpaši augstas fermenta aktivitātes vērtības saistītas ar Hodžkina slimību, ļaundabīgām vēdera dobuma un plaušu slimībām. Mērens LDH paaugstinājums novērojams leukēmijas gadījumā [11, 99].

Dažādu seroloģisko fermentu izmatošana HLL diagnostikai ir efektīva, jo tas dod iespēju precīzāk izvērtēt iespējamo slimības norisi un smagumu. Tā kā viens seroloģiskais marķieris neļauj vispusīgi izvērtēt HLL, tādēļ B. Desablens u. c. (*B. Desablens et al.*) 1998. gadā veica pētījumu, kurā izvērtēja ne tikai LDH, bet arī β_2 MG, CD23 [43]. Iepriekšminēto seroloģisko marķieru pētījums sniedz svarīgu informāciju HLL norises prognozēšanai [97]. Pamatojoties uz šo pētījumu S. Molica u. c. (*S. Molica et al.* 1999. gadā raksturoja Binē sistēmas HLL stadiju klīniski bioloģisko īpatnību [126].

4.6.6. Ģenētiskas pārmaiņas hroniskas limfoleikozes gadījumā

Attīstoties jaunām tehnoloģijām, tādām kā fluorescentā *in situ* hibridizācija, līdz 50% palielinājies gadījumu skaits, kad pacientiem tiek atklāti daudzskaitlīgi strukturāli traucējumi hromosomās. Īpaši bieži atrod delēciju 13q14 (51%), kurai pēc biežuma seko delēcija 11q22 q23 (17% –20%), tālāk – trisomija 12 (15%), delēcija 17p13 un 6q [1, 59, 140, 168].

Trisomija 12 ir saistīta ar atipisku morfoloģiju, limfocītu imūnfenotipu (CD5-, FMC7+, imūnglobulīna spēcīga ekspresija) un slimības progresēšanu [134]. Pacienti ar delēciju 11q ir gados jaunāki, ar smagāku slimības klīnisko stadiju diagnozes noteikšanas brīdī, ar izteiktu limfadenopātiju perifērajās, abdominālajās un mediastinālajās limfmezglos un 9 mēnešu intervālu līdz ārstēšanas uzsākšanai, salīdzinot ar 43 mēnešiem pacientiem bez delēcijas [5, 51, 63].

17. hromosomas aberācija ir asociēta ar gēna p53 mutāciju un slimības rezistenci pret terapiju. Tāpat gēna p53 mutācijas un ekspresijas līmeņa paaugstināšanās korelē ar slimības progresēšanu, ar rezistenci pret fludarabīnu, ar leikozes šūnu atipisku morfoloģiju un ar prolimfātiskas leukēmijas attīstību [116, 168]. Tiek ziņots par jauniem hromosomu bojājumiem, kas nav sporādiski gadījumi: translokācija 6p24-25 un 12p12-13, anomālija 4q21 un monosomija 21 [37, 162].

Vienai piektdaļai hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientu tiek atzīmēts heterozigotātes zudums 10q23.3 – audzējsupresora gēna PTEN secībā, turklāt PTEN gēna mutācija netika atrasta, lai gan PTEN olbaltumvielas ekspresija pacientiem nav vai arī ir būtiski pazemināta, kas varētu liecināt par šīs fosfatāzes lomu hroniskas limfoleikozes molekulārajā patoloģijā [114].

4.6.7. Mutāciju statuss hroniskas limfoleikozes gadījumos

Imūnglobulīnu variablā reģiona gēnu mutatīvais statuss ir pamatmarķieris ilglaicīgai hroniskās limfoleikozes prognozei. Tas tiek vērtēts ar polimerāzes ķēdes reakcijas un noteiktā genoma gabala nukleotīdu secības noteikšanas palīdzību [159, 180]. Šis marķieris liecina par šūnu, no kurās rodas hroniska limfoleikoze, nobriešanas līmeni. Katra onkoloģiskā slimība sākās ar vienu vienīgo ļaundabīgo šūnu. Tipiskā HLL gadījumā šī šūna ir B limfocīts.

Audzēja transformācija notiek uz naivo jeb jaunavīgo (pregerminālo) B limfocītu līmeņa ar sekojošu bloku to turpmākā diferenciācijā un audzēja šūnu klona proliferāciju [2, 57].

Ne retāk sastopams B HLL ar B limfocītu atmiņas postgerminālo šūnu audzēja transformāciju. Par to liecina atklātās imūnglobulīnu variablā reģiona gēnu hipermutācijas [80, 136, 173].

Saskaņā ar Ig variablā reģiona mutatīvo statusu, izdalīti divi B HLL varianti ar mutācijām (IgVH+) vai bez atmiņas šūnām un bez variablā reģiona mutācijām (IgVH-), kad klons sastāv no naivām šūnām, kas vēl nav kontaktējušas ar izraisītāju [110].

Pusei no slimniekiem, kuriem limfoleikoze izveidojusies no atmiņas šūnām, ārstēšanas nepieciešamība nav radusies [79]. Tāda hroniska limfoleikoze norit labvēlīgi. Ja hroniska limfoleikoze radusies no naivām šūnām, tad tā norit agresīvāk un ātrāk nepieciešama terapijas nozīmēšana. Remisiju ilgums ir mazāks, ārstēšana ir jāatjauno biežāk [70].

Pēdējos gados intensīvi tiek pētīta Ig gēnu variablo reģionu mutatīvā statusa surogātmārķiera ZAP70 olbaltumvielas ekspresija [41, 136]. Pierādīts, ka šīs olbaltumvielas ekspresija IgVH HLL variantā asociējas ar sliktu prognozi. Mutatīvā statusa vietā var izmantot arī mārķierus, kas liecina par to pašu. Tie ir imūnfenotipiskie mārķieri – CD38 un ZAP70 [69, 90].

Germinatīvā centra VH gēnu homologijas pakāpēm un šo pakāpju prognostiskajai nozīmei veltīti diezgan daudzi darbi. Sakarā ar to, ka nav tieša paņēmiena, kā novērtēt visu antivielu specifiskumu un šo antivielu daudzumu dotajam subjektam (B šūnu variants), tiek veikta netiešā analīze, lai noteiktu VH, JH un DH gēnu izmaiņu biežumu. Šādas analīzes darbietilpības dēļ šobrīd ir pieejami tikai ierobežoti dati par VH, JH un DH variantiem dažāda vecuma veseliem cilvēkiem. Limfātisko audzēju gadījumā tiek analizēts repertuārs nevis atsevišķās šūnās, bet tajos audzēja B šūnu klonos, kuru nēsātāji ir pacienti. Ja attiecīgā tipa limfomas izlasē VH, JH un DH gēnu lietošanas biežums sakrīt ar normu, tad antigēnu selekcijas patoģenētiskā nozīme ir mazticama [110]. Turpretī, ja VH, JH un DH gēnu sastāvs būtiski atšķiras no normas, tad var pieņemt, ka dotā audzēja priekšteča šūnas ir tikušas pakļautas antigēnu selekcijai. Tāpat kā daudziem citiem limfātiskiem audzējiem, hroniskai B šūnu limfoleikozei ir raksturīgs, ka antivielu variantam nav gadījuma raksturs. Pieņemamā homologijas pakāpe ir 98%. Tas nozīmē, ka VH gēna secība var atšķirties no germinatīvā centra secības par 4 nukleotīdiem. Šobrīd zināmo allēļu polimorfisms VH gēniem ir ļoti zems, tāpēc maz ticams, ka atšķirība lielākā nukleotīdu skaitā ir tikai nejaušība [69, 80, 136, 173].

Zviedru pētnieku grupa atlasīja hroniskas B šūnu limfoleikozes slimniekus, kuriem variablo domēnu kodēja gēns VH3-21. Turklāt variablā domēna (DH un JH gēni) struktūra šiem pacientiem bija praktiski vienāda. Vairumā gadījumu tika izmantota viena un tā paša tipa vieglā ķēde, kuras variablie reģioni bija praktiski

identiski. Tāda antivielu struktūras sakritība dažādiem slimniekiem nevar būt tikai sagādīšanās, un, iespējams, liecina par to, ka eksistē vienots antigēns, kuram ir patoģenētiska nozīme hroniskas B šūnu limfoleikozes attīstībā [33]. Vēl vairāk, izrādījās, ka hroniskas B šūnu limfoleikozes variants, kurā tiek noteikts VH3-21 gēns, ir ar samērā nelabvēlīgu prognozi – neatkarīgi no tā, ir vai nav mutācijas. Saskaņā ar G. Tobinu u.c. (G. Tobin et al.) (2004) VH3-21 tiek atklāts ievērojami biežāk ziemeļu valstīs, īpaši Zviedrijā (9%), un retāk dienvidu zemēs (2–3%) [82, 85, 173].

Neatkarīgs prognostiskais faktors ir hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientu sadalījums divās apakšgrupās pēc pazīmes – ir vai nav hipermutācijas gēnos IgVH. Tam ir liela praktiska nozīme, jo membrānu un citoplazmatisko olbaltumvielu spektrs audzēja šūnās IgVH+ un IgVH– apakšgrupu pacientiem atšķiras [38, 80, 81, 96].

G. Tobins u.c. (G. Tobin et al.) parādījuši, ka pacientiem ar mutācijām variablajā domēnā liela prognostiskā nozīme ir sadalījumam apakšgrupās stadijās (A versus B+C). Šie autori piedāvājuši dalīt hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientus 3 apakšgrupās:

1. bez variablā domēna mutācijas;
2. ar variablā domēna mutāciju stadijā A;
3. ar variablā domēna mutāciju stadijās B/C.

Mutāciju statusa kombinēšana ar stadijām nav ticams prognostisks faktors, mutāciju statusa noteikšanai pati galvenā priekšrocība ir iespēja prognozēt nelabvēlīgu hroniskas B šūnu limfoleikozes gaitu jau tad, kad slimība ir tikko aizsākusies [173].

Gēnu mutāciju statusa izpēte variablajā domēnā ir darbietilpīga metodika, kuru maz iespējams pielietot praktiskajā medicīnā, tāpēc pēdējos gados arvien aktuālāka kļūst mutāciju statusa surogātu marķieru meklēšana [25, 36, 40, 137, 166].

4.6.8. CD38 ekspresija

CD38 – tas ir transmembrānais glikoproteīns, kas ekspresējas uz dažādu šūnu populācijām. Šis marķieris ir jaunajos B limfocītos, plazmatiskajās šūnās, tā vājāka ekspresija tiek novērota uz nobriedušiem B limfocītiem, bieži tiek noteikta uz jaunajiem monocītiem. HLL gadījumos patoloģisko limfocītu populācijai ir raksturīgi divi CD38 ekspresijas varianti: <30% šūnu ar CD38+ un >30% [39, 81].

1990. gadu beigās tika atrasta korelācija mutāciju statusam ar CD38 ekspresiju. Praktiski visiem pacientiem ar variablā domēna mutācijām variantu B HLL bija zema

CD38 ekspresija. Un otrādi, pacientiem bez variablā domēna mutācijas variē CD38 ekspresija [137]. Ir pierādīts, ja CD38+ ekspresijas līmenis >30% – šīs šūnas satur nemutējošu IgVH gēnu.

Saskaņā ar R. Damli (*R. Damle*) (1999) nav pilnīgas atbilstības starp CD38 ekspresiju un mutāciju statusu, kas neļauj izmantot CD38 kā surogātu marķieri [39,40,82]. Autore piedāvā izmantot divu pazīmju kombināciju. Vissliktākā prognoze tiek atzīmēta apakšgrupas CD38+VH– pacientiem, bet labākā – ja ir pazīme CD38–VH+. CD38 ekspresija pati par sevi jau ir ticama prognostiska pazīme [31, 120, 133, 139].

Globāls hroniskas B šūnu limfoleikozes ekspresiju profila izvērtējums tika veikts trijos liela apjoma pētījumos, izmantojot mikročipus (*Klein*, 2001; *Rosenwald*, 2001; *Haslinger*, 2004) [85, 107, 153]. Divos pētījumos mikročipus izmantoja, lai salīdzinātu hronisku B šūnu limfoleikozi ar dažādām normālu limfocītu subpopulācijām un lai izdalītu ģenētiskās atšķirības hroniskas B šūnu limfoleikozes ietvaros. Saskaņā ar U. Kleinu u.c. (*U. Klein et al.*) hroniska B šūnu limfoleikoze ir tuvāka B atmiņas šūnām, nekā jebkurai citai no subpopulācijām [107, 193]. A. Rozenvalds u.c. (*A. Rosenwald et al.*) salīdzināja hroniskas B šūnu limfoleikozes variantus ar atšķirīgu mutāciju statusu un secināja, ka tas slimības variants, kas norit bez mutācijām, ir tuvāks aktivētām B šūnām. Arī kopējais hroniskas B šūnu limfoleikozes ekspresiju profils saskaņā ar Rozenvalda datiem lielā mērā atbilst atmiņas šūnām [69, 153]. C. Haslingera (2004) pētījumā veikts gēnu ekspresiju profila novērtējums ar genoma aberācijām un mutāciju statusu [85]. Visos trijos pētījumos tika identificēti vairāki gēni ar izteiktu ekspresiju un vairāki vāji ekspresējami gēni dažādu hroniskas B šūnu limfoleikozes variantu gadījumos.

CD38 līmeņa noteikšana tiek veikta ar plūsmas citometrijas palīdzību un ir svarīgs prognostiskais parametrs, kas ir apstiprināts ar J. Binē (*J. Binet*) (1981) darbu [9]. Pacientu, kuriem ir nemutējis IgVH gēns, vidējā dzīvildze ir 8 gadi. Pacienti, kuriem ir mutējis gēns, dzīvo 26 gadus. CD38 ir svarīgs prognostiskais faktors mutējošā un nemutējošā gēna noteikšanai un pacientu grupas sadalīšanai prognostiskās apakšgrupās.

4.6.9. 70-kDa zeta asociētās olbaltumvielas (ZAP-70) ekspresija

ZAP-70 (70-kDa zeta asociētā olbaltumviela), tirozinkināzes saimes membrānā olbaltumviela – šūnu, T limfocītu un nomācējšūnu galvenā signālmolekula.

T limfocītu aktivācija notiek ar T šūnu receptoru savienojuma ar antigēnu saturošām šūnām starpniecību (makrofāgi, dendrītšūnas un B limfocīti). Šī procesa rezultātā aktivizējas tirozinkināze un fosforilē iekššūnu CD3 kompleksa olbaltumvielu. Vissvarīgākais pārstāvis no CD3 saimes ir CD3 zeta, kas saistās ar ZAP-70. Šis savienojums fosforilē transmembrāno olbaltumvielu, aktivē T limfocītu. Šī procesa finālā T šūnai ir spēja diferencēties, attīstīties un veikt citokīnu sekrēciju [110, 141].

Izrādās, ka viens no svarīgajiem gēniem, kas atšķir hroniskas B šūnu limfoleikozes variantus ar dažādu mutāciju statusu, ir gēns, kas koordinē proteīnkināzi ZAP-70, kura nodod signālus, kas nāk no T šūnu receptora. Šis gēns ekspresējas tajā hroniskas B šūnu limfoleikozes variantā, kuram nav raksturīgo mutāciju variablajā domēnā un neekspresējas variantā ar mutācijām [25, 36]. Šis atklājums uzreiz guva tālāku attīstību un kļuva par pamatu diagnostiskam testam, ko veic ar plūsmas citometrijas ar fluorescējošu krāsvielu vai imunohistoķīmijas palīdzību.

A. Vistners u.c. (*A. A. Wiestner et al.*) (2003) grupā, kurā bija 107 hroniskas limfoleikozes pacienti, parādīja, ka ZAP-70 ir gēns, kas vislabāk sadala hroniskas limfoleikozes apakštipus pēc mutāciju statusa: pacientiem bez VH gēnu mutācijas gēns ZAP-70 ekspresējās 5,54 reizes spēcīgāk nekā ar VH gēnu mutācijām [187]. Šajā pētījumā ZAP-70 ekspresija pareizi prognozēja mutāciju statusu 93% pacientu, tomēr daudzām laboratorijām radās problēma, kā noteikt ZAP-70 ekspresijas robežvērtības. ZAP-70 ekspresijas nesakritība ar mutāciju statusu dažādos avotos variē no 5 līdz 23% [71].

Šī iekššūnu marķiera diagnostika notiek ar plūsmas citometrijas palīdzību.

4.6.10. Timidīnkināzes līmeņa noteikšanas prognostiskā nozīme HLL gadījumā

Timidīnkināze (TK) ir šūnu ferments, kas piedalās DNS sintēzē, un tam ir galvenā loma dioksitimidīna katalītiskā pārveidē dioksitimidīna monofosfātā [73, 78, 190]. Ferments iesaistās G1/S šūnu cikla fāzē, un tā līmenis korelē ar audzēja šūnu

proliferatīvo aktivitāti. Tas ir saistīts ar timidīnkināzes aktivāciju šūnā pirms tās dalīšanas un īsteno ne tikai eksogēnā, bet arī endogēnā timidīna fosforilēšanu, paātrinot DNS uzbūves procesu [86, 109]. Tādēļ timidīnkināzes līmenis atspoguļo šūnu proliferācijas aktivitāti [115, 190].

Pēdējo gadu darbos parādīta timidīnkināzes paaugstinātā līmeņa nelabvēlīgā prognostiskā loma. Klīniskie pētījumi pierādīja augstu TK koncentrāciju audzēja procesos. Pirmreizēji TK līmenis kā prognostiskais marķieris tika noteikts Ne Hodžkina limfomas (NHL) gadījumā, pēc tam kā prognostisku marķieri to izmantoja HLL un mielomas slimības gadījumā [53, 54, 74, 95].

Vairums klīnisko pētījumu, kas saistīti ar TK līmeņa noteikšanu, veltīti tādām diagnozēm kā krūts vēzis, plaušu vēzis, prostatas vēzis. Solitāro audzēju gadījumā TK līmenis atspoguļo onkoloģiskā procesa aktivitāti un ir indikators ārstēšanai [84, 170, 194].

Pēc C. Magnaka (*C. Magnac*) (2000) viedokļa, TK arī šobrīd joprojām ir vērtīgs NHL marķieris, ja tā līmenis korelē ar klīnisko stadiju [119]. Arī TK līmeņa vērtēšana nodrošina prognostisku informāciju HLL pacientiem neatkarīgi no slimības klīniskiem raksturojumiem [100,124]. Pie tādiem secinājumiem nonāca HLL zinātnieku grupa T. Seilera (*T. Seiler*) vadībā (2006) [156]. Pēc TK līmeņa var izvērtēt slimības un audzēja aktivitāti [12, 20].

Šī marķiera paaugstinātais līmenis agrīnās stadijās pēc C. Metjū (*C. Matthews*) (2006) [124] liecina par slimības ātru progresēšanu, C. F. Kalandera (*C. F. Kallander*) (1984) [100] darbs rāda, ka TK līmenis mazinās, ja ārstēšanas rezultātā mazinās slimības stadija pēc Raja klasifikācijas. Dažos viņa darbos tika izsekota arī TK līmeņa un mutatīvā statusa saikne. TK līmeņa noteikšana ietekmē ārstēšanu, uz ko savā darbā norādīja M. Montillo (*M. Montillo*) (2005) [128].

Tika atklāta arī šī marķiera saistība ar limfocītu divkāršošanās laiku. Šo marķieri aktīvi izmanto kā neatkarīgu prognostisku faktoru HLL stabilo un ātri progresējošo variantu noteikšanā. [12, 100] Augstu TK līmeni saista ar īsu dzīves ilgumu un sliktu prognozi HLL slimniekiem [37, 109, 157].

4.7. Hroniskas B šūnu limfoleikozes ārstēšana

4.7.1. Hroniskas B šūnu limfoleikozes ārstēšanas metožu attīstība

Aprakstot ārstēšanas metodes, jāatzīmē, ka vēsturiski hroniskas limfoleikozes, tāpat kā citu hronisku leikozu terapija, sākās ar arsēna, etiluretāna un simptomātisko līdzekļu pielietošanu. No XX gs. sākuma līdz vidum atsevišķu grupu palielinātu limfmezglu, liesas apstarošanai (retāk – visa ķermeņa apstarošanai) aktīvi izmantoja rentgenstarus [14].

Tomēr, pēc mūsdienu kanoniem, metode ir zaudējusi savu patstāvīgo nozīmi, kalpojot vienīgi kā paliatīva, bet dažos gadījumos kā ķīmijterapiju papildinoša metode ievērojami palielinātu limfmezglu gadījumā [75, 111].

Patlaban hroniskas B šūnu limfoleikozes ārstēšanā izmanto:

- monoķīmijterapiju ar alkilējošiem preparātiem: hlorambucilu, ciklofosfamīdu ar vai bez kortikosteroīdiem [83];
- polikīmijterapijas kursus (COP, CHOP, CAP, POACH) [147];
- monoterapiju ar purīnu analogiem (fludarabīnu, kladribīnu, pentostatīnu) vai tos apvienojumā ar citiem citostatiskiem preparātiem [14, 15, 169];
- terapiju ar monoklonālajām antivielām (alemtuzumabs, rituksimabs) [102, 112];
- hematopoēzes cilmes šūnu transplantāciju, gēnu terapiju, vakeīnas un citas ārstēšanas metodes, kas vēl atrodas klīnisko pētījumu stadijā [75, 104, 121].

Alkilējošas darbības preparāts hlorambucils, kuru lieto kopš 1955. gada, ir parādījis augstu efektivitāti, minimālu toksiskumu un līdzestību, tas ir ļāvis uzlabot dzīvildzes vidējo ilgumu pacientiem no 55 līdz 60 mēnešiem, salīdzinot ar rentgenterapiju (40–42 mēneši) [188].

Vēlāk uzsāka lietot ciklofosfamīdu, galvenokārt tad, kad neefektīvs izrādījās hlorambucils. Kopumā alkilējošo preparātu efektivitāte ir 40–60%, no tiem pilna atbilde tika novērota mazāk nekā 20% pacientu [147].

Polikīmijterapijas shēmas lieto gadījumos, kad vāja efektivitāte ir bijusi hlorambucilam vai ciklofosfamīdam, kā arī ir ievērojamas audzēja masas (pārsvārā palielināti limfmezgli, hepatosplenomegālija). Tomēr, pēc dažādiem datiem, remisijas

ilgums un pacientu kopējā dzīvildze būtiski neuzlabojās, salīdzinot ar hlorambucila monoterapiju [48, 158].

Jaunie preparāti no purīna nukleozīdu analogu grupas – fludarabīns, kladribīns – un adenoīndezamināzes neatgriezeniskais inhibitors pentostatīns ir būtiski mainījuši pieeju hroniskas limfoleikozes ārstēšanai un tiek lietoti kā pirmās līnijas terapijas pacientiem, kuriem pirmo reizi uzstādīta hroniskas limfoleikozes diagnoze, jo to efektivitāte ir ļoti augsta [13, 171].

Lai izvērtētu fludarabīna efektivitāti salīdzinājumā ar hlorambucilu, tika veikti vairāki randomizēti pētījumi, kuru rezultātus apkopoja K. Rajs u.c. (*K. Rai et al.*) (2000). Saskaņā ar šiem datiem, kopējā atbilde uz fludarabīnu atzīmēta 70% gadījumu (27% pacientu sasniegta pilna remisija, 43% – daļēja remisija), kas bija ievērojami vairāk, salīdzinot ar pacientiem, kuri saņēma hlorambucilu. Tiem kopējā atbilde bija 43% gadījumu (3% pacientu sasniegta pilna remisija, 40% – daļēja remisija). Vidējā dzīvildze pārliecinoši bija augstāka pacientiem, kuri saņēma fludarabīnu (vidēji – 27 mēneši), salīdzinot ar pacientiem, kuri saņēma hlorambucilu (vidēji – 17 mēneši), tomēr kopējā dzīvildze pētījuma pabeigšanas brīdī abās pacientu grupās izrādījās vienāda – 30 mēneši. Galīgie rezultāti par ietekmi uz dzīvildzi, ārstējot slimniekus ar fludarabīnu, šobrīd vēl nav saņemti [20,144].

Purīnu analogu toksiskuma dēļ hlorambucilu var apsvērt tādu gadus vecu hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientu ārstēšanai, kuriem ir smagas blakus slimības, tādas kā hroniska nieru slimība, kuras gadījumā, neraugoties uz ārstēšanu, paredzamā dzīvildze ir mazāka par vienu gadu [28, 99]. Fludarabīna neefektivitātes gadījumā par vislabāko stratēģiju tiek uzskatīta pacientu iekļaušana klīniskā pētījumā. Pret terapiju rezistentu pacientu ārstēšanā, kā arī slimības recidīvu ārstēšanā saskaņā ar S. O`Braijs (S. O`Brien) (1998) rezultātiem efektīva kombinācija ir fludarabīns ar mitoksantronu un ciklofosfamīdu [8].

Franču hroniskas limfoleikozes kooperatīvā izpētes grupa arī ir pierādījusi fludarabīna priekšrocības, salīdzinot ar citiem ķīmijterapijas (CAP, CHOP) režīmiem [66].

Viena no alternatīvām pieejām hroniskas limfoleikozes terapijai ir monoklonālo antivielu izmantošana – alemtuzumabs (*Alemtuzumab*, humanizēta anti-CD52 antiviele), kas agrāk bija pazīstams kā CAMPATH-1H un rituksimabs (*Rituximab*, mabtera, himēriska anti CD20 antiviele), kombinējot tos ar fludarabīnu (imūnķīmijterapija), kā arī ar standarta polikīmijterapijas režīmu CHOP (R-CHOP) [143,151]. Alemtuzumabs

mijiedarbojas ar antigēnu CD52, kurš ekspresējas uz virsmas kā normāliem, tā arī ļaundabīgiem T un B limfocītiem, un neekspresējas uz hemopoētiskajām cilmes šūnām. Tāda mijiedarbība izraisa šūnas bojāeju 3 mehānismu darbības rezultātā: komplementa aktivēšana, antivielas atkarīgais šūnu citotoksiskums un apoptozes indukcija [32]. Šobrīd terapija, izmantojot alemtuzumabu, tiek uzskatīta par efektīvu līdzekli tiem hroniskas limfoleikozes pacientiem, kuri nav agrāk saņēmuši specifisku citostātisko ārstēšanu, un tā efektivitāte ir salīdzināma ar fludarabīna efektivitāti. Kombinēta fludarabīna un alemtuzumaba lietošana uzskatāma par perspektīvāku stratēģiju. Turklāt alemtuzumabs tiek izmantots, kā konsolidējošs līdzeklis, lai nostiprinātu citostātiskās terapijas efektu [102, 106, 127].

Alemtuzumaba izmantošana palielina citolomegavīrusu infekciju attīstības risku, kas savukārt noved pie ganciklovīra izmantošanas un ievērojami palielina ārstēšanas izmaksas [102].

Rituksimabs saistās ar antigēnu CD20 un ir mazefektīvs hroniskas limfoleikozes monoterapijā [112].

Kortikosteroīdu izmantošana monoterapijas veidā pacientiem ar hronisku limfoleikozi tiek rekomendēta vienīgi autoimūnu komplikāciju gadījumā, jo šajos gadījumos atzīmē augstu oportūnisko infekciju un osteoporozes risku [27, 44].

Starp citiem preparātiem un ārstēšanas stratēģijām hroniskas limfoleikozes pacientiem jāizdala kaulu smadzeņu allogēnās transplantācijas izmantošana, kas tomēr šiem pacientiem nav standarta metode ārstēšanā un tai ir nopietni ierobežojumi. Pirmkārt, šis ārstēšanas veids netiek izmantots pacientiem, kas vecāki par 50 gadiem, ar labdabīgu slimības gaitu – šādā situācijā vispār nav nepieciešama agresīva ārstēšana. Otrkārt, izmantojot allogēno transplantāciju atzīmē augstu, ar transplantāciju saistītu letalitāti, kas pat specializētos centros sasniedz 30–40%. Pēc vairāku autoru datiem, kaulu smadzeņu allogēnā transplantācija ir ar vislielāko efektu slimības sākumā un tiek lietota galvenokārt pacientiem, kas ir jaunāki par 50 gadiem, refraktāriem pret fludarabīna terapiju [104, 121].

Vēl viens jauns un augsti efektīvs preparāts ir *Ofatumumab* (*Azerra*) – monoklonālā CD20 antivielā uz B šūnu membrānām. Preparāts ir efektīvs hroniskas limfoleikozes pacientu, kas ir rezistenti pret citiem terapijas veidiem, ārstēšanā. *Ofatumumab* ir efektīvs recedivējošiem pacientiem ar hronisku limfoleikozi, kas tika ārstēti ar alemtuzumabu. Sasniegta arī augsta efektivitāte slimnieku ar lieliem limfmezglu izmēriem ārstēšanā [175, 186].

Hroniskas B šūnu limfoleikozes bioterapijas iespējas pētītas, izmantojot kā piemēru interferonu, tomēr šīs metodes efektivitāte netika apstiprināta [195].

Tiek pētītas iespējas pielietot *antisense* oligonukleotīdus un dendrītiskās šūnas. Tās ir ķīmiski modificētas vienas ķēdes DNS ar secību, kas ir komplementāra noteiktas mRNS nukleotīdu secībai [176]. Pateicoties tam, *antisense* oligonukleotīdi spēj inhibēt noteiktu gēnu ekspresiju. Hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientiem par visperspektīvāko mērķi *antisense* oligonukleotīdiem tiek uzskatīts gēns BCL-2, kura hiperekspresija veicina B šūnu apoptozes traucējumu. Pirmais klīnikā plaši izmēģinātais preparāts G3139 (nātrija oblimersens, *Genasense*) ir parādījis savu efektivitāti kā monoterapijā, tā arī kombinācijā fludarabīns + ciklofosfamīds un ar rituksimabu [26, 163].

Tiek pētītas dažādu apoptozes inducētāju iespējas: transretīnskābe (ATRA), flavopiridols, depsipectīds, GW506U78 (ara-GTP), kā arī *Laktacistin*, MG132, *Tetrocarcin A* un KRN5500 [12]. Hroniskas B šūnu limfoleikozes gēnu terapijas mērķis ir hroniskās B šūnu limfoleikozes fenotipa modifikācija. B šūnu receptora CD40 mijiedarbībai ar tā ligandu CD40L (vai CD154) uz aktivētām T šūnām ir izšķiroša loma B-šūnu aktivēšanā, to izdzīvošanā un diferenciācijā [106, 166]. Hroniskas B šūnu limfoleikozes šūnas var piespiest, izmantojot adenovīrusa vektoru Ad-CD154, lai tās ekspresētu CD40L (CD154), kas pārvērstu leikozes šūnas par ļoti efektīvām antigēnu prezentējošām šūnām, kas savukārt veicinās specifisko autologo citotoksisko T limfocītu indukciju [68, 183].

4.7.2. Atbildes kritēriji ārstēšanas efektivitātes novērtēšanā

Kritēriji terapijas atbildei, kas ļauj izvērtēt hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientu ārstēšanu, tiek vērtēti pēc progresijas no klīniska līdz imunomorfoloģiskam izvērtējumam. Tos ir izstrādājis ASV Nacionālais vēža institūts (NCI) un Starptautiskā hroniskas limfoleikozes darba grupa (IWCLL), un tas daudzējādā ziņā ir veicinājis tradicionālās ķīmijterapijas un radioterapijas rezultātu pārskatīšanu (4.4. tabula). Jaunās prasības pēc pilnas remisijas sasniegšanas iekļauj sevī mazāk nekā 30% limfocītu esamību kaulu smadzeņu aspirātā, nodulāru un intersticiālu agregātu izzušanu trepanbiopsijā [128], lai kaulu smadzenēs būtu mazāk par 10% šūnu, kas ekspresē

antigēnus CD5 un CD19, imūnglobulīnu pārkārtošanās normalizēšanos *Southern-blotting* testā un kapa(κ)/lambda(λ) attiecības normalizēšanos [30, 105].

Vienoti kritēriji nepieciešami atbildes novērtēšanai, lai varētu salīdzināt dažādu terapiju rezultātus. Klīniskā praksē šiem kritērijiem ir daudz mazāka nozīme [3, 13, 30].

4.4. tabula

Atbildes kritēriji, ārstējot hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientus

Atbilde	NCI kritēriji	IWCLL kritēriji
Pilna remisija	Limfadenopātijas neesamība, hepatosplenomegālija fiziskā un/vai atbilstošās vizualizācijas metodēs; vispārējas intoksikācijas simptomu neesamība, normāla asinsaina: neitrofilie $>1,5 \times 10^9/l$, trombocīti $>100 \times 10^9/l$, Hb $>110 \text{ g/l}$ (bez transfūzijām), limfocīti $<4,0 \times 10^9/l$, kaulu smadzenēs ar normālām šūnām, limfocitoze $<30\%$; ilgums – ne mazāks par diviem mēnešiem	Nav slimības izpausmju
Daļēja remisija	Limfocītu skaita asinīs samazināšanās par 50%, limfadenopātijas 50% mazināšanās un/vai splenomegālijas un/vai hepatomegālijas 50% mazināšanās un viens vai vairāki no šādiem kritērijiem: neitrofilie $>1,5 \times 10^9/l$ vai 50% pieaugums, salīdzinot ar sākotnējo, trombocīti $>100 \times 10^9/l$ vai 50% pieaugums, salīdzinot ar sākotnējo, Hb $>110 \text{ g/l}$ (bez transfūzijām) vai 50% pieaugums, salīdzinot ar sākotnējo; ilgums – ne mazāks par diviem mēnešiem	Pāreja no C stadijas uz A vai B stadiju; no B stadijas uz A stadiju
Stabilizācija	Nav pilnas vai daļējas remisijas vai slimības progresēšanas	Slimības stadija nemainās
Progresēšana	Viena vai vairāku šādu kritēriju klātbūtne: limfmezglu palielināšanās $>50\%$ fiziskā izmeklēšanā ar intervālu 2 nedēļas un/vai jaunu grupu iesaistīšanās, aknu un liesas palielināšanās izmēros par 50%, salīdzinot ar sākotnējo vai pirms tam nebijušas hepatomegālijas un/vai splenomegālijas, limfocītu absolūtā skaita palielināšanās asinīs $>50\%$ līdz minimums $5 \times 10^9/l$, transformācija uz Rihtera sindromu vai prolimfocitāro leikozi ar $>55\%$ prolimfocītiem	Pāreja no A stadijas uz B vai C stadiju, no B stadijas uz C stadiju

4.7.3. Kritēriji terapijas uzsākšanai

Terapiju, kādu saņem hroniskas B šūnu limfoleikozes pacients, nosaka tas, kādai riska grupai pacients pieder (4.5. tabula). Neapšaubāmi kopīga ir tendence, saskaņā ar ko jaunāku pacientu ārstēšana ar vienu vai vairākiem nelabvēlīgas prognozes faktoriem ir vērsta uz maksimālo audzēja klona eradikāciju un centieniem panākt pilnīgu

izārstēšanos. Savukārt gados vecu pacientu terapijas mērķis ir vērsts uz vispārējas dzīvildzes palielināšanu un bezrecidīva perioda pagarināšanu, saglabājot apmierinošu dzīves kvalitāti [103, 105, 185, 196].

4.5. tabula

**Pieeja hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientu terapijai atkarībā no to
risku grupas (Seiler et al., 2006) [156]**

Riska grupa	HLL stadija	Terapijas taktika	Piezīmes
Zema	A(0), A(I)	Novērošana	Infekciozo komplikāciju ārstēšana
Vidēja	A(II), B(I), B(II)	Terapiju sāk, ja ir pazīmes, ka slimība progresē	Iespējams uzsākt ārstēšanu arī bez slimības progresēšanas pazīmēm, bet pastāvot augsta riska faktoriem
Augsta	C(III), C(IV)	Tūlītēja terapijas uzsākšana	Vecumā līdz 65 gadiem – agresīva taktika, kas vērsta uz izārstēšanos; vecākiem par 65 gadiem – terapija vērsta uz dzīvildzes palielināšanu, saglabājot apmierinošu dzīves kvalitāti

Noteicoša loma pacientu ar hronisku limfoleikozī sākuma stadijā ārstēšanā ir „novērošanas un nogaidīšanas” taktikai, kad indikācijas terapijas uzsākšanai ir slimības progresēšanas pazīmes. Šādas pieejas mērķtiecību apstiprina divu plašu randomizētu pētījumu rezultāti [48].

Parādoties slimības pazīmēm, nekavējoties jānozīmē specifiska ārstēšana. Terapijas uzsākšanai patlaban ir pārskatītas un paplašinātas indikācijas (E. Montserrat et al., 1988):

- limfocītu skaita divkārtšāšanās periods mazāks par 12 mēnešiem;
- drudzis bez infekcijas procesa esamības;
- ķermeņa masas samazināšanās par vairāk nekā 10% sešu mēnešu laikā;
- izteikts vājums;
- anēmija un/vai trombocitopēnija, ko izraisījusi kaulu smadzeņu infiltrācija;
- autoimūna anēmija un/vai trombocitopēnija;
- biežas infekcijas komplikāciju epizodes;
- masīva vai progresējoša limfadenopātija un splenomegālija;
- perifēro asiņu hiperleikocitoze vairāk nekā $150 \times 10^9/l$;
- patoloģisko limfocītu masīva infiltrācija kaulu smadzenēs (vairāk nekā 80%) [129, 131].

Limfocītu skaita divkārtšošanās laiks jāaplūko kopā ar klīnisko situāciju, nevis jāizmanto kā kritērijs nekavējošai terapijas uzsākšanai [30].

Atšķirībā no neskaidrās taktikas, ārstējot slimniekus slimības sākuma stadijā, pēc tam, kad pacienti iekļauti vidēja riska apakšgrupā, nekādas šaubas par terapijas uzsākšanas laiku nepastāv.

4.7.4. Mūsdienu rekomendācijas HLL ārstēšanai

Lēmums par ārstēšanas uzsākšanu galvenokārt ir atkarīgs no pacienta klīniskā statusa. Zemām riska grupām (Binē A vai Rajs 0) reti nepieciešama tūlītējā ārstēšana, izņemot infekcijas slimību gadījumus. Vidējās riska grupas (Binē A/B vai Rajs I/II) ārstēšana biežāk tiek atlikta līdz objektīvu datu par slimības progresēšanu saņemšanas [132].

ASV Nacionālā vēža institūta darba grupa (NCI-WG) 2002. gadā publicēja norādījumus par terapijas uzsākšanu:

- Konstitucionālie simptomi, kas ir raksturīgi HLL gadījumā.
- Kaulu smadzeņu progresējošs bojājums.
- Autoimūnā anēmija vai trombocitopēnija, kas slikti padodas ārstēšanai ar kortikosteroīdiem.
- Masīvā vai progresējošā splenomegālija.
- Masīvā vai progresējošā limfadenopātija.
- Progresējošā limfocitoze (*Kay et al.*, 2002) [97].

Tātad, lēmums par terapijas uzsākšanu un veiktās ārstēšanas mērķis ir balstīts uz katrā konkrētajā gadījumā individuāli izvēlētu terapiju, ievērojot minētos faktorus [158].

Bezsimptomu gadījumi agrīnās stadijās – novēro un gaidi. Simptomu attīstīšanās var būt indikācija ķīmijterapijas vai imūnterapijas nozīmēšanai, pastāv kaulu smadzeņu transplantācijas iespēja. Tomēr pacientiem ar augstu riska grupu un infekciju komplikāciju risku nepieciešama tūlītēja ārstēšanas veikšana [75, 103].

4.8. Noslēgums

Hroniska B šūnu limfoleikoze kā biežākā Eiropas un Ziemeļamerikas pieaugušo iedzīvotāju leikozes forma ir slimība ar skaidri izteiktām klīniski laboratoriskām, imunofenotipiskām un molekulāri ģenētiskām izpausmēm [72].

Mūsdienās tiek izstrādātas un uzlabotas klīniskās pārbaudes hroniskas B šūnu limfoleikozes pacientu vadīšanā, tomēr šo metožu ieguldījums pacientu kopējās dzīvildzes rādītāju uzlabošanā pagaidām vēl nav konkretizējies [98].

Esošās indikācijas terapijas uzsākšanai ir standarts, kas neņem vērā būtiskas atšķirības hroniskās leikozes pacientiem ar dažādām riska grupām [147].

Par mērķtiecīgu uzskatāma prognostisko faktoru kompleksa noskaidrošana, kas veicinās precīzāku terapijas uzsākšanas laika noteikšanu, neraugoties uz to, ka pacients atrodas pagaidām vēl agrā slimības stadijā. Iegūtie dati var kļūt par pamatu vienotam algoritmam, kas ļautu standartizēt pieeju hroniskas limfoleikozes pacientu ārstēšanā, īpaši slimības agrajās stadijās.

5. MATERIĀLI UN METODES

5.1. Pacienti, klīniskais raksturojums

Pētījumā tika iekļauti Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas (RAKUS), Valsts Hematoloģijas centra (šobrīd Ķīmijterapijas un hematoloģijas klīnika) 120 pirmreizēji slimnieki ar hronisku B šūnu limfocitāri leikēmiju (HLL). Pētījuma veikšanai tika saņemta Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauja, lēmums Nr. 9 (skatīt 1.pielikumu). Visi pacienti parakstīja piekrišanas veidlapu, kas apstiprināta Ētikas komitejā (skatīt 2.pielikumu).

Izmeklēto HLL pacientu vecums svārstījās robežās no 35 līdz 81 gadam, vidējais vecums bija $66,87 \pm 1,007$. Starp pacientiem 60 slimnieki (50%) bija vīrieši un 60 (50%) sievietes. Vidējais vīriešu vecums $68,51 \pm 8,72$ gadi, sievietēm – $65,42 \pm 1,56$. Pētījumu pilnībā beidza 97 pacienti, 3 pacienti pētījuma laikā nomira – nāves cēlonis progresējoša HLL, 20 pacienti izstājās – cēlonis nav zināms (skatīt 5.1. tabulu).

5.1. tabula

Pacientu vispārējais raksturojums

Raksturojošais rādītājs	Pacienti
Vīrieši (skaits)	60
Sievietes (skaits)	60
Vidējais pacientu vecums (gados)	$66,87 \pm 1,007$
Vidējais sieviešu vecums (gados)	$65,42 \pm 1,56$
Vidējais vīriešu vecums (gados)	$68,51 \pm 8,72$
No pētījuma izstājušies pacienti, cēlonis nav zināms	20
Mīrušo pacientu skaits, kas nepabeidza pētījumu (skaits)	3

Visiem slimniekiem HLL diagnoze tiek noteikta, balstoties uz Pasaules Veselības organizācijas (PVO) pieņemtajām rekomendācijām, kas iekļauj: pilnās asins analīzes, mielogrammas datus, perifēro asins un kaulu smadzeņu limfoīdu elementu imūnfēnotipēšanu.

5.2. Pacientu dalījums atkarībā no slimības stadijas

Pētījumā visi slimnieki tika sadalīti pēc Raja klasifikācijas stadijas [144]. Stadija konstatēta diagnozes noteikšanas laikā. 5.2. tabulā parādīts sadalījums pēc Raja stadijas. Visvairāk slimnieku bija I un II stadijā, attiecīgi 38 un 40 slimnieki.

5.2. tabula

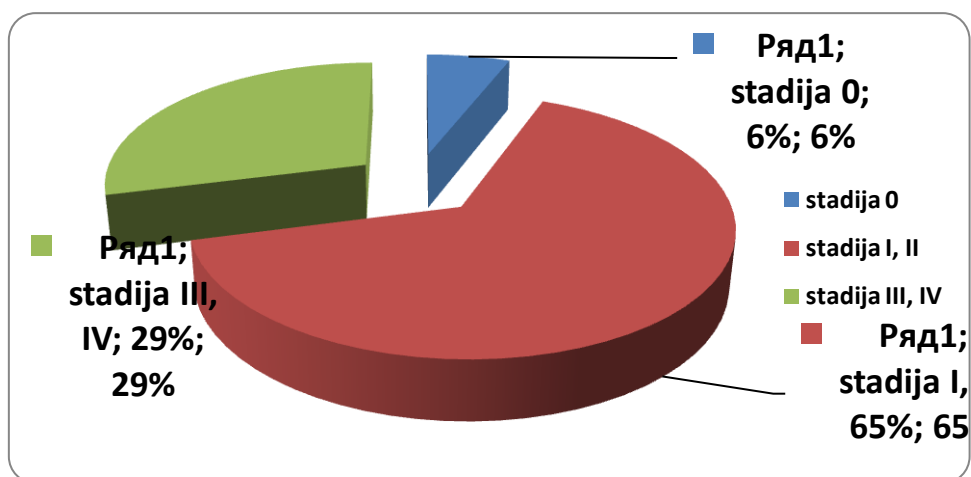
HLL slimnieku sadalījums pēc stadijām

Nr.	Stadija pēc Raja klasifikācijas	Slimnieku skaits	Slimnieki, %
1.	0 stadija	7	6
2.	I stadija	38	32
3.	II stadija	40	33
4.	III stadija	19	16
5.	IV stadija	16	13

5.3. Pacientu dalījums grupās atkarībā no varianta

Saskaņā ar literatūras datiem, ņemot vērā progresēšanas risku, kā aprakstīts T. Seilera (T. Seiler) 2006. gada darbā, pacienti atkarībā no slimības norises varianta tika sadalīti 3 grupās – agrīnā (Raja 0, Binē I), viduvējā (Raja I, II, Binē B), progresīvā (Raja III, IV, Binē C) [156]. Katrai grupai raksturīgs īpašs slimības norises variants. Sadalījums pēc slimības norises variantiem šajā pētījumā tika veikts, ņemot vērā klīniskās īpatnības. Atkarībā no klīniskās norises īpatnībām HLL pacienti bija sadalīti 3 grupās. Pirmajā grupā tika iekļauti 7 slimnieki ar 0 stadiju, tas ir labdabīgs HLL norises variants (L), otrajā grupā apvienoti 78 slimnieki ar I un II stadiju, tas ir lēni progresējošs HLL norises variants (LP), no tiem 38 slimniekiem tika noteikta I stadija, bet 40 cilvēkiem – II stadija. Trešajā grupā tika apvienoti 35 slimnieki ar III un IV stadiju, tas ir ātri progresējošs HLL norises variants (ĀP). No tiem 19 cilvēkiem noteikta III stadija, bet 16 slimniekiem – IV stadija. 5.2. tabulā parādīts slimnieku sadalījums pēc stadijām.

Pirmajā pacientu grupā bija 7 cilvēki (6%) ar labdabīgu slimības norisi. Otrajā slimnieku grupā bija 78 cilvēki (65%), slimībai bija lēni progresējošais raksturs. Trešajā grupā bija 35 slimnieki (29%), slimībai bija ātri progresējošs raksturs. 5.1. attēlā atspoguļots slimnieku sadalījums grupās pēc slimības norises varianta.



5.1. att. HLL slimnieku sadalījums grupās pēc slimības norises varianta

5.4. Hroniskas limfoleikozes diagnostika

Visi standarta laboratorijas izmeklējumi tika veikti RAKUS.

TK līmeņa noteikšana tika veikta RSU Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā.

ZAP-70 ekspresija un CD38 ekspresija tika veikta Rīgas hematoloģijas centra hemapatoloģiskās laboratorijas bāzē (laboratorijas vadītāja A. Rivkina). Tika veikts arī šūnu imunitātes vērtējums (relatīvā un absolūtā limfocītu satura noteikšana ar marķieriem CD3, CD4, CD8, CD3/CD16), humorālās imunitātes vērtēšana (CD20 – limfocītu satura).

Ultrasonoskopiskās izmeklēšanas tika veiktas RAKUS klīnikā „Linezers”, Valsts Hematoloģijas centrā.

Trepanbiopsijas un limfmezgla biopsijas izvērtējums tika veikts Rīgas hematoloģijas centrā.

5.5. Kopējais diagnostiskais apjoms

Lai diagnosticētu hronisku B šūnu limfoleikozi, pētījumā izmeklētajiem slimniekiem tika veikts vispusīgs pētījumu spektrs, kas iekļāva sevī standarta analīzes un pētījuma metodes. 5.3. un 5.4. tabulā atspoguļoti dati par veikto pētījumu kopējo apjomu diagnosticēšanas brīdī. 5.5. un 5.6. tabulā atspoguļoti dati par veikto pētījumu –

kopējais apjoms pēc 6 mēnešiem. 5.7. un 5.8. tabulā atspoguļoti dati par veikto pētījumu – kopējais apjoms pēc 12 mēnešiem.

5.3. tabula

Standartizmeklējumu apjoms diagnosticēšanas brīdī

Nr.	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu absolūts skaits	Slimnieku skaits, kam veica analīzi, %
1.	Klīniskā apskate	120	100
2.	Vispārējā asins analīze	120	100
3.	LDH	120	100
4.	β_2 mikroglobulīns	120	100
5.	Limfmezgla preparāta histoloģiskais izmeklējums	53	44,16
6.	Mielogramma	120	100
7.	Kaulu smadzeņu histoloģiskā izmeklēšana	61	50,8
8.	Limfmezgla preparāta imūnhistoķīmiskā izmeklēšana	10	8,3
9.	USG	120	100

5.4. tabula

Kopējais noteikto parametru apjoms diagnosticēšanas brīdī

Nr.	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu absolūts skaits	Slimnieku skaits, kam veica analīzi, %
1.	Perifēro asins šūnu imūnfenotipēšana	120	100
2.	ZAP-70 ekspresijas līmenis	120	100
3.	CD38 ekspresijas līmenis	120	100
4.	TK saturs asins sērūmā	120	100

5.5. tabula

Standartizmeklējumu apjoms pēc 6 mēnešiem

Nr.	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu absolūts skaits	Slimnieku skaits, kam veica analīzi, %
1.	Klīniskā apskate	109	100
2.	Vispārējā asins analīze	109	100
3.	LDH	109	100
4.	β_2 mikroglobulīns	109	100
5.	USG	109	100

5.6. tabula

Kopējais noteikto parametru apjoms pēc 6 mēnešiem

Nr.	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu absolūts skaits	Slimnieku skaits, kam veica analīzi, %
1.	Perifēro asins šūnu imūnfenotipēšana	109	100
2.	ZAP-70 ekspresijas līmenis	109	100
3.	CD38 ekspresijas līmenis	109	100
4.	TK saturs asins serumā	109	100

No pētījuma izstājās 11 pacienti. 2 pacientu nāves iemesls bija progresējusi slimība, 9 – nezināms iemesls.

5.7. tabula

Standartizmeklējumu apjoms pēc 12 mēnešiem

Nr.	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu absolūts skaits	Slimnieku skaits, kam veica analīzi, %
1.	Klīniskā apskate	97	100
2.	Vispārējā asins analīze	97	100
3.	LDH	97	100
4.	β_2 mikroglobulīns	97	100
5.	USG	97	100

5.8. tabula

Kopējais noteikto parametru apjoms pēc 12 mēnešiem

Nr.	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu absolūts skaits	Slimnieku skaits, kam veica analīzi, %
1.	Perifēro asins šūnu imūnfenotipēšana	97	100
2.	ZAP-70 ekspresijas līmenis	97	100
3.	CD38 ekspresijas līmenis	97	100
4.	TK saturs asins serumā	97	100

No pētījuma izstājās 12 pacienti, salīdzinot ar pēc 6 mēnešiem izmeklēto pacientu skaitu. 1 pacienta nāves iemesls bija progresējusi slimība, 11 – nezināms iemesls.

Limfmezgla preparāta histoloģiskais izmeklējums, mielogramma, kaulu smadzeņu histoloģiskā izmeklēšana un limfmezgla preparāta imūnhistoķīmiskā

izmeklēšana tika veikta visiem pacientiem tikai pirms terapijas. Pētījuma uzdevumos neietilpa iepriekš minēto parametru dinamikas kontrole.

5.5.1. Pacientu klīniskā stāvokļa novērtējums

Primāro apskati veica sertificēti ārsti hematologi RAKUS Ķīmijterapijas un hematoloģijas klīnikā un Rīgas Hematoloģijas centrā. Klīniskā apskate tika veikta visiem pirmreizējiem pacientiem, tās laikā tika precizēts hematoloģiskais stāvoklis, perifēro limfmezglu stāvoklis, hepatosplenomegālijas, ādas un gļotādas stāvoklis, tika izvērtēts pacientu objektīvais stāvoklis.

5.5.2. Asins analīze

Asins ainas noteikšana tika veikta katram pacientam pirmajā vizītē un pēc tam katrā nākamajā vizītē. E. Gulbja laboratorija (EGL) izmanto šādas asins ainas noteikšanas metodes: elektriskās pretestības mērīšanas princips, ciānmethemoglobīna metode (hemoglobīnam), matemātiskā funkcija no MCV (hematokrīts), aprēķināšana pēc standartmetodes (MCV, MCH, MCHC, RDW). Pilnā asins ainā tika noteikti šādi hematoloģiski rādītāji: WBC (leikocīti), RBC (eritrocīti), HGB (hemoglobīns), HCT (hematokrīts), MCV (vidējais eritrocītu tilpums), MHC (vidējais hemoglobīna saturs eritrocītā), MCHC (vidējā hemoglobīna koncentrācija eritrocītos), PLT (trombocīti), *Lymph%* (limfocītu relatīvais skaits), *Neut%* (neitrofilu relatīvais skaits), *Lymph#* (limfocītu absolūtais skaits), *MHD#* (sajauktas grupas šūnu absolūtais skaits), *Neut#* (neitrofilu absolūtais skaits), RDV-CV (eritrocītu anizocitoze), PDW (trombocītu anizocitoze), MPW (vidējais trombocītu tilpums), P-LCR (lielo trombocītu līmenis). Izmantotā aparātūra: analizatori: *Pentra 120 Retic*, *Pentra 120DF*, *Pentra 120DX* (ABX Diagnostics). Izmantotā metode sīkāk aprakstīta: I. B. Henry. *Clinical Diagnosis and Managment by Laboratory Methods*, 1996 [88].

Šīs metodes ir pārskatītas, uzlabotas un aprakstītas E.Gulbja laboratorijas „Klīnisko analīžu rokasgrāmatā” 2011.gadā.

5.5.3. β_2 mikroglobulīna noteikšana

β_2 mikroglobulīns ir zemas molekulas olbaltumviela, kas atrodas dažādu epiteliālo šūnu, limfocītu un makrofāgu, kā arī daudzu audzēju šūnu virsmās. β_2 mikroglobulīns ir marķieris dažādu limfoproliferatīvu slimību gadījumā.

E. Gulbja laboratorija (EGL) izmanto standartmetodi β_2 mikroglobulīna noteikšanai – imūnķīmisko luminescenci. Aparatūra, ko izmanto minētajai metodei, ir analizators *Immulite 2000* (*Siemens Healthcare Diagnostics Products Ltd.*). Referentās vērtības ir 1,01–1,73 mg/L.

5.5.4. Laktātdehidrogenāzes noteikšana

Laktātdehidrogenāze ir ferments, kas atrodas gandrīz visos organisma audos – šūnu citoplazmā, eritrocītos. Fermentu veido vairāki izoenzīmi, kam piemīt audu specifitāte. LDH noteikšanu izmanto ļaundabīgu audzēju diagnostikā. EGL izmanto standartmetodi LDH noteikšanai – kinētiskā reakcija ar piruvātu-laktātu pēc DGKC rekomendācijas. Aparatūra, ko izmanto minētai metodei, ir analizators *Hitachi 917* (*Roche Diagnostics*). Referentās vērtības ir 200–480 U/L.

5.5.5. Imūnfenotipēšana

Limfocītu elementu virsmas marķieru pētīšanai tika izmantota testa sistēma ar antivielu paneli, kas iekļāva CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD38. Imūnfenotipēšanas veikšanai perifērās asinis ievietoja EDTA saturošos konteineros. Iegūtajām asinīm pievienoja 10 μ l ar fluoriscīnu konjugētu monoklonu antivielu: anti- CD5, -CD 10, -CD 19, -CD20, -CD22, -CD23, -CD38 (firma *Beckman Coulter Immunocytometry systems, Miami, Florida, USA*), inkubēja 30 minūtes istabas temperatūrā, tumsā. Izpētīta arī CD5/CD19/CD38 un CD5/CD19/CD23 koekspresija, izmantojot fluoresceīna izotiocinātu (FITC), konjugētās anti CD3 antivielas saākētas ar fikoeritrīna (PE) konjugētām anti-HLA-DR antivielām, FITC konjugētās antra-CD3 antivielas saākētas ar anti-CD(16+56) antivielām (firma *Immunotech, Francija*). Pēc tam šūnas divkārt atmazgāja, suspendēja 500 μ l buferētā fizioloģiskā šķīdumā, veica

paraugu analīzi uz plūsmas citofluorimetra Epics XL, *Beckman Coulter*, Maiami, Florida.

5.5.6. ZAP-70 ekspresijas noteikšana

Pēc limfocītu izdalīšanas uz fikorverografīna blīvuma gradienta veica divkārtējo atmazgāšanu ar vidi 199. Noteica šūnu dzīvotspēju ar 0,1% trepānzilā šķīdumu (tā bija ne zemāka kā 95%). Noteica šūnu daudzumu Gorjajeva kamerā un noveda limfocītu duļķu koncentrāciju līdz 5 mlj/ml ar pilnu kultūru vidi, kas sastāv no RPMI-1640 ar 10% aktivētā teļa gaļas embrionālā seruma pievienojumu, 2mM L-glutamīna un 40 µg/ml gentamicīna. Mēģenēs pievienoja brefeldīnu A 10 µg/ml koncentrācijā un ionomicīnu – 1 µg/ml un inkubēja 4 stundas 37° C temperatūrā CO₂ inkubatorā ar 7,5% mitrumu. Pēc inkubācijas perioda pabeigšanas šūnas samaisīja un pārnesa pa 100 µl mēģenēs. Tālāk, 100 µl asins pievienoja 20 µl monoklonālu antivielu anti-CD5, -CD19 pie virspusējiem antigēniem un inkubēja istabas temperatūrā 20 minūtes, tumsā. Eritrocītu līzei katrā mēģenē pievienoja 0,5 ml *Optilyse* šķīduma un inkubēja istabas temperatūrā 15 minūtes. Tālāk veica šūnu fiksēšanu ar 250 µl šķīduma *Cytofix/Cytopenn* (*Beckman Coulter*, Maiami, Florida) pievienošanu un inkubāciju 20 minūtes istabas temperatūrā, tumsā. Šūnas atmazgāja divkārt ar vidi (PBS+1% BSA, 0,1% NaN₃). Atmazgātām šūnām pievienoja permabilizējošo šķīdumu *Perm/Wash*. Pēdējais etaps bija 20 µl iekššūnu, kas konjugētas ar fluoriscīnu monoklonālu antivielu anti-ZAP-70 (*Beckman Coulter*, Maiami, Florida), iekrāsošana. Paraugu analīzi veica arī uz plūsmas citofluorimetra. ZAP-70 rezultāts lielāks par 20% ir pozitīvs.

5.5.7. TK līmeņa noteikšana asins serumā

Timidīnkināze (TK) ir viens no svarīgākajiem fermentiem [1, 8], kas parāda šūnu aktivitāti. Dalīšanās procesā paaugstināts šūnu daudzums saistīts ar ļaundabīgu slimību un aktīvu audzēja procesu. Līdzīgs process ir HLL [9, 10]. Timidīnkināzes līmenis asins serumā ir zems un atbilst ļaundabīgo šūnu dalīšanās skaitam. Darbā tika izmantota ELISA metode, kas ietver šādas darbības.

Pirmā diena:

1. Sagatavot un atsaldēt nepieciešamos komponentus.
2. Izšķīdināt A un B reaģentus.
3. Uzklāt 10 µl no katra parauga bedrītēs analīzei.
4. Pievienot 500 µl šķīduma paraugu atšķaidīšanai planšetes bedrītēs.
5. Pārnest 10 µl atšķaidītu paraugu SORB planšetes attiecīgās bedrītēs.
6. Sagatavot reaktīvo maisījumu, pievienojot 2 ml REAG B šķīduma REAG A šķīdumam.

7. Pievienot 100 µl reaktīvā maisījuma SORB planšetes bedrītēs. Aizzīmogot SORB planšeti ar lipīgu lenti un inkubēt 33° C grādu temperatūrā nakts garumā.

Otrā diena:

8. Sagatavot un atsaldēt nepieciešamos komponentus.
 9. Sagatavot skalošanas buferi.
 10. Izšķīdināt fermenta konjugātu.
 11. Noskalot SORB planšeti.
 12. Uzklāt 100 µl fermenta konjugāta šķīduma uz bedrītes. Aiztaisīt ciet ar vāku un inkubēt 33° C grādu temperatūrā 90 minūtes.
 13. Sagatavot substrāta šķīdumu.
 14. Noskalot planšeti.
 15. Uzklāt 120 µl substrāta šķīduma uz bedrīti.
 16. Izmērīt optisko blīvumu pie 405 nm tūlīt pēc substrāta uzklāšanas, kā arī pēc 30 minūtēm, 3–4 stundām un nepieciešamības gadījumā aptuveni pēc 20 stundām.
 17. Apstrādāt iegūtos datus pēc programmas pielikumā.
- TK līmenim vesela cilvēka asins serumā jābūt ne mazāk kā 50 ng/l, bet šī TK minimālās atklāšanas metode (jutīgums) bija 100 ng/l.

5.5.8. Histoloģiskie izmeklējumi

Mūsdienās B HLL diagnozes noteikšanai kaulu smadzeņu analīze vairs nav tik svarīga kā iepriekš. Pašlaik ar imūnfenotipēšanas palīdzību var ātri un efektīvi noteikt diagnozi, ka arī kontrolēt terapijas efektivitāti un saslimšanas recedīva iespēju visiem pacientiem [155].

Tomēr diagnozes apstiprināšanai tika veikta kaulu smadzeņu punktāta jeb kaulu smadzeņu aspirāta izpēte. Pacientiem, kuriem bija konstatēta limfadenopātija, veica limfmezgla biopsiju ar šādiem histoloģiskiem izmeklējumiem. Limfmezgla preparāta histoloģisko un imūnhistoķīmisko izmeklēšanu veica RHC hematopatoloģiskajā laboratorijā (laboratorijas vadītāja dr. A. Rivkina).

Trepānbioptātu pētīšanā atklāti trīs kaulu smadzeņu infiltrācijas ar limfoīdiem elementiem varianti:

1. Kaulu smadzeņu bojājuma pirmajam variantam bija raksturīga limfoīdu infiltrātu esamība trepānbioptātā un visu nobriešanas formu esamība normālā hemopoēzē, daudzums ne mazāk kā 50%.

2. Kaulu smadzeņu perēkļa intersticiālajai infiltrācijai bija raksturīga limfocītu esamība visos redzes laukumos, to blīvo sakopojumu vairāk nekā pusē kaulu smadzeņu dobumu. Kopā ar limfocītiem bija arī prolimfocīti. Visām ģenerācijām bija normālās hemopoēzes audi, tomēr to kvantitatīvais saturs nepārsniedza 30%.

3. Trešais infiltrācijas tips raksturojās ar limfoīdu elementu pārsvaru visos redzes laukumos (limfocīti, prolimfocīti un limfoblasti). Limfoīdu elementu starpā šūnas ar normālu hemopoēzi retas.

Imūnhistoloģiskās izmeklēšanas laikā izmanto antivielas, kas savienojas ar izmeklējamā materiāla šūnu receptoriem. B-HLL raksturīgi mazie limfocīti ar CD19, CD20, CD5 fenotipu.

5.5.9. Rezultātu statistiskās analīzes metodes

Pacientu sadalījuma pārbaude veikta ar D'Agostino–Pīrsona (*D'Agostino-Pearson*) testu. Normāla sadalījuma neatbilstības gadījumā izmantoti neparametriskie testi. Normāla sadalījuma gadījumā grupas tika salīdzinātas, izmantojot atkārtoto mērījumu ANOVA testu (*repeated measures ANOVA*), bet normālā sadalījuma neatbilstības gadījumā ar Kruskala–Volisa testu (*Kruskal-Wallis*) ar sekojošu Danna (*Dunns*) pēctestu. Ja rezultāti starp grupām bija statistiski ticami, tad pēc Kruskala–Volisa testa veica Manna–Vitnija (*Mann-Whitbey*) U testu. Normālā sadalījuma neatbilstības gadījumā korelācijas tika vērtētas ar Spīrmana (*Spearman*) testu, bet, ja dati bija neatbilstoši normālajam sadalījumam, tad tika veikts Pīrsona tests. Rezultāti tika novērtēti kā statistiski ticami, ja $p < 0,05$. Attēlos dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95%

konfidencialitātes intervāls. Visi dati tika statistiski apstrādāti, izmantojot statistikas programmas *GraphPadPrism* 5 versiju (*San Diego*, Kalifornija, ASV). Visi rezultāti tabulās un zīmējumos parādīti vidējās aritmētiskās un tās standartkļūdas veidā ($M \pm t$). Tādejādi, 120 HLL slimniekiem veikti asins limfoīdu šūnu un kaulu smadzeņu kompleksi morfoloģiskie, imunoloģiskie un imūnhistoķīmiskie pētījumi ar iegūto datu statistisku apstrādi.

6. REZULTĀTI

6.1. Asins analīžu rezultāti

6.1.1. Asins aina

Visiem pētījumā iesaistītajiem slimniekiem izmeklēti perifēro asiņu rādītāji. Analīžu rezultāti apkopoti 6.1. tabulā.

No 6.1. tabulā atspoguļotajiem datiem redzams, ka slimniekiem tika atklāta ticama eritrocītu, trombocītu un hemoglobīna LP un ĀP skaita samazināšanās, leukocītu absolūtā limfocītu skaita palielināšanās, salīdzinot ar HLL slimnieku rādītājiem L apakšgrupā.

6.1. tabula

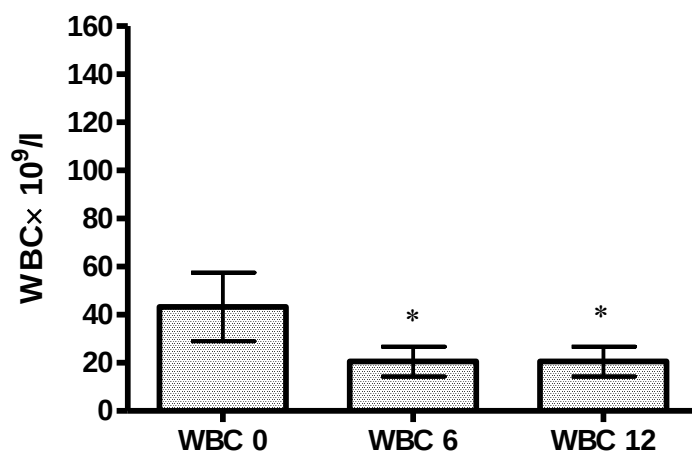
Perifēro asiņu rādītāji HLL slimniekiem diagnostikas brīdī

Rādītājs	L (n – 7)		LP (n – 78)		ĀP (n – 35)	
	skaits	p	skaits	p	skaits	p
Hemoglobīns, g/l	126 ± 0,56	p=0,001	107,2 ± 0,2	p=0,001	99,3 ± 0,33	p=0,001
Eritrocīti, x 10 ¹² /l	4,3 ± 0,16	p=0,001	3,9 ± 0,30	p=0,001	3,4 ± 0,2	p=0,001
Leukocīti, x 10 ⁹ /l	13,1 ± 0,71	p=0,001	33,8 ± 0,65	p=0,001	69,8 ± 0,18	p=0,001
Limfocīti, x 10 ⁹ /l	6,1 ± 0,2	p=0,0003	40,0 ± 0,41	p=0,0003	57,7 ± 0,33	p=0,0003
Trombocīti, x 10 ⁹ /l	250,7 ± 0,4	p=0,0001	167,8 ± 0,1	p=0,0001	140,7 ± 0,12	p=0,0001

Atšķirības starp slimnieku apakšgrupām L un slimniekiem LP apakšgrupā ir ticamas, atšķirības starp slimnieku apakšgrupām LP ā un ĀP ir ticamas.

6.1.2. Leikocītu (WBC) skaits

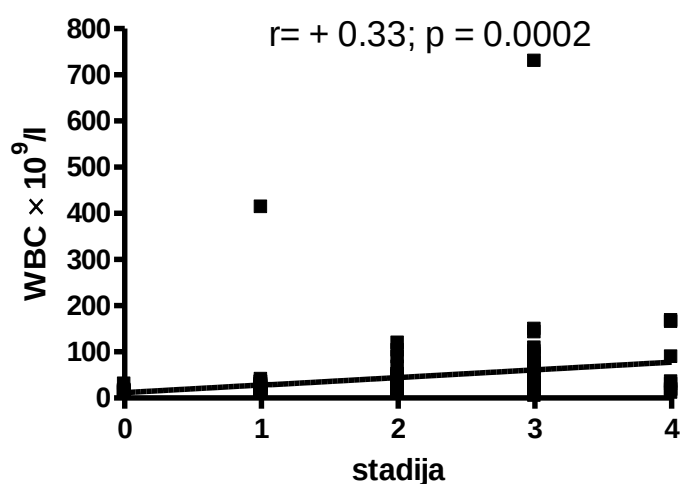
Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu un divpadsmit mēnešu terapija samazina leikocītu skaitu asinīs hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – 20 x 10⁹/l ± 3 x 10⁹/l pret 43 x 10⁹/l ± 7 leikocītu/10⁹/l, (p=0,001) pēc 6 mēnešiem, 21 x 10⁹/l ± 3 x 10⁹/l pret 43 x 10⁹/l ± 7 leikocītu/10⁹/l, (p=0,001) pēc 12 mēnešiem.



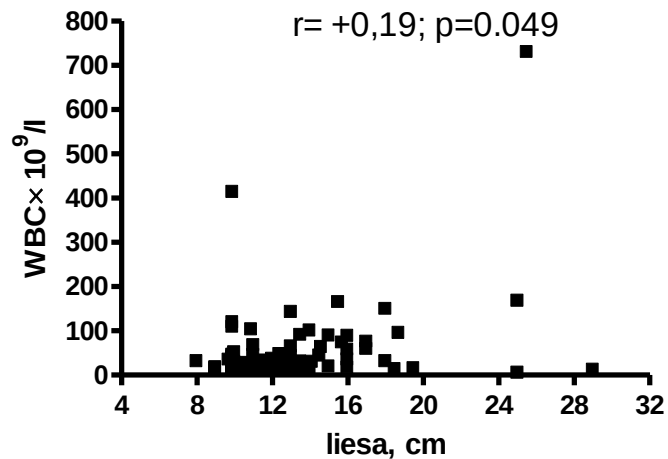
6.1. att. Leikocītu skaits (WBC) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas (WBC 0), 6 mēnešus pēc terapijas (WBC 6) un 12 mēnešus pēc terapijas (WBC 12)

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95% konfidencialitātes intervāls, $p = 0,001$, salīdzinot WBC 0 un WBC 6 un WBC 0 un WBC 12.

Analizējot visus pacientus pirms terapijas, ieguvām statistiski ticamu pozitīvu korelāciju starp leikocītu skaitu (WBC) un stadiju ($r = +0,33$; $p = 0,0002$, skatīt 6.2. attēlu) un starp leikocītu skaitu un liesas garenizmēru ($r = +0,19$; $p = 0,045$, skatīt 6.3. attēlu).



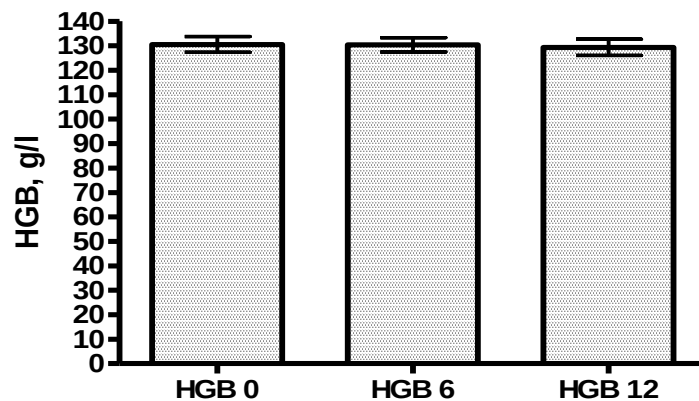
6.2. att. Korelācija starp leikocītu skaitu (WBC) un stadiju. Spīrmana tests



6.3. att. Korelācijas starp leukocītu skaitu (WBC) un liesas garenizmēru. Spīrmana tests

6.1.3. Hemoglobīna līmenis

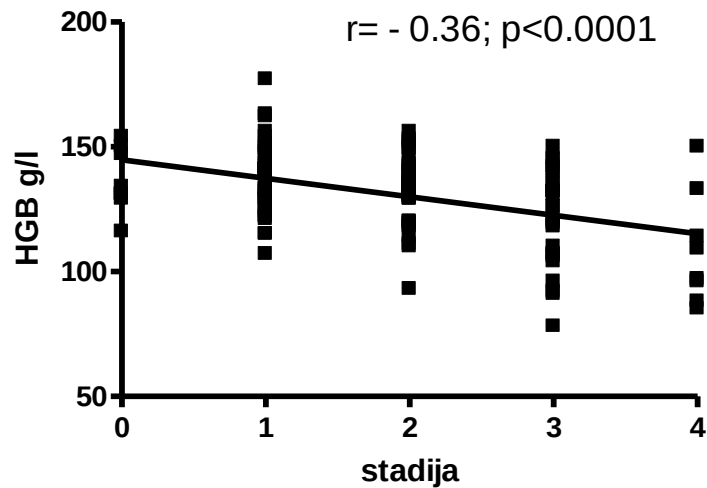
Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu un divpadsmit mēnešu terapija neietekmē hemoglobīna līmeni asinīs hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem (6.4. attēls).



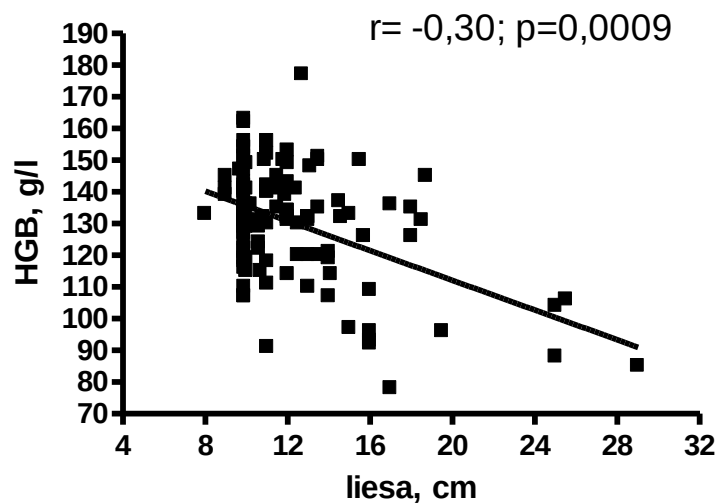
6.4. att. Hemoglobīna līmenis (HgB) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas (HgB 0), 6 mēnešus pēc terapijas (HgB 6) un 12 mēnešus pēc terapijas (HgB 12)

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95% konfidencialitātes intervāls.

Analizējot visus pacientus kopā pēc stadijām, ieguvām statistiski ticamu negatīvu korelāciju starp stadiju un hemoglobīna līmeni ($r = -0,36$; $p = 0,0001$; skatīt 6.5. attēlu) un starp hemoglobīna līmeni un liesas izmēru ($r = -0,30$; $p = 0,0009$; skatīt 6.6. attēlu).



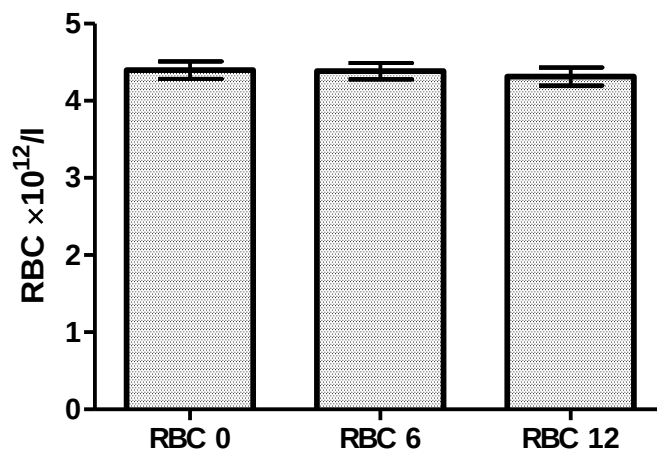
6.5. att. Korelācija starp hemoglobīna daudzumu (HgB) un stadiju. Spīrmana tests



6.6. att. Korelācija starp hemoglobīna daudzumu (HgB) un liesas izmēru. Spīrmana tests

6.1.4. Eritrocītu (RBC) skaits

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu un divpadsmit mēnešu terapija neietekmē eritrocītu skaitu asinīs hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem (6.7. attēls).

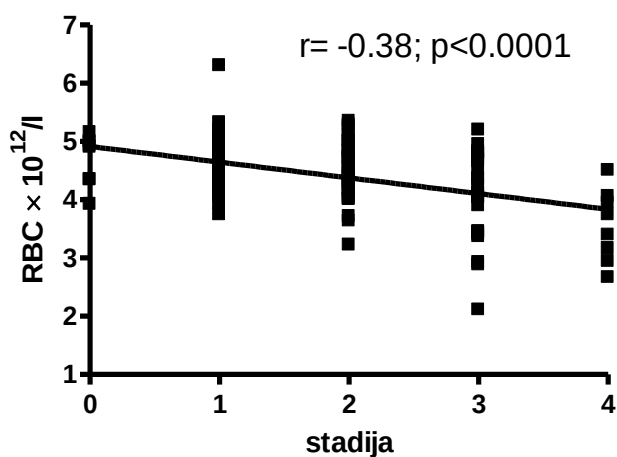


6.7. att. Eritrocītu skaits (RBC) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas (RBC 0), 6 mēnešus pēc terapijas (RBC 6) un 12 mēnešus pēc terapijas (RBC 12)

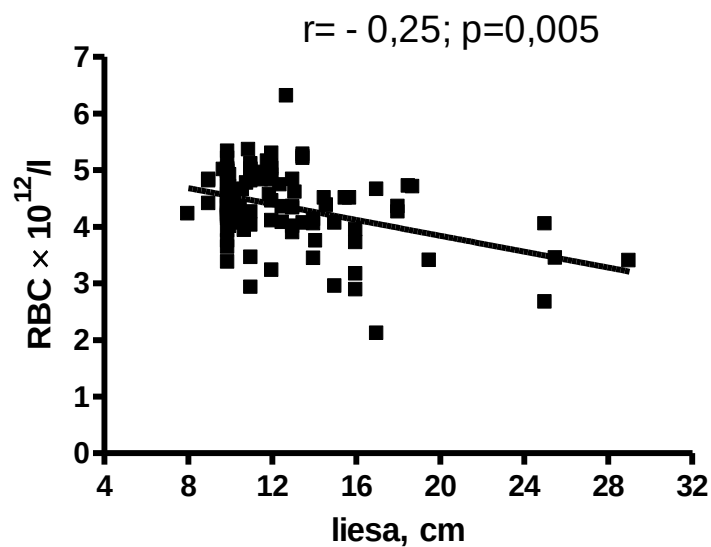
Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95% konfidencialitātes intervāls.

Analizējot visus pacientus kopā pēc stadijām, ieguvām statistiski ticamu negatīvu korelāciju starp RBC skaitu un stadiju ($r = -0,38$; $p = 0,0001$; skatīt 6.8. attēlu), kā arī negatīvu korelāciju starp RBC un liesas izmēru (skatīt 6.9. attēlu).

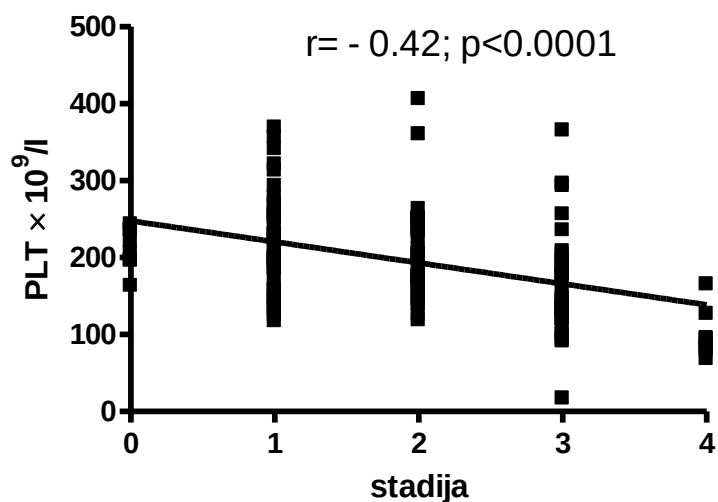
Netika atrasta korelācija starp eritrocītu daudzumu un limfmezglu diametru.



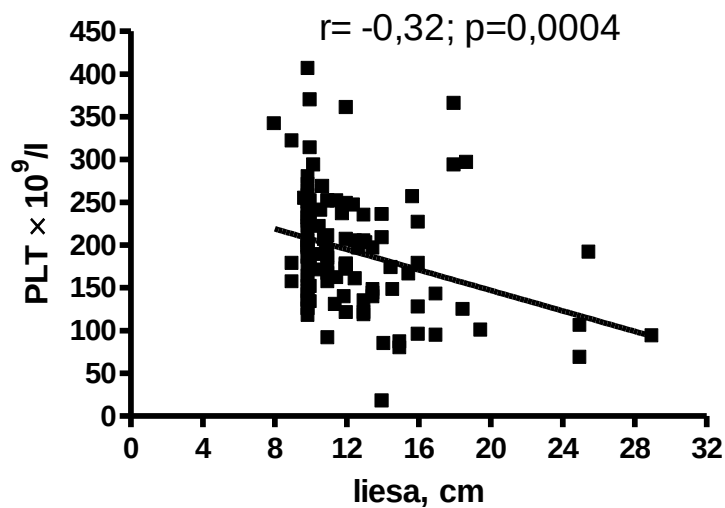
6.8. att. Korelācija starp eritrocītu skaitu (RBC) un stadiju. Spīrmana tests



Analizējot visus pacientus kopā pēc stadijām, ieguvām statistiski ticamu negatīvu korelāciju starp stadiju un trombocītu skaitu ($r = -0,42$; $p = 0,0001$; skatīt 6.11. attēlu) un negatīvu korelāciju starp trombocītu daudzumu un liesas izmēru ($r = -0,32$; $p = 0,0004$; skatīt 6.12. attēlu).



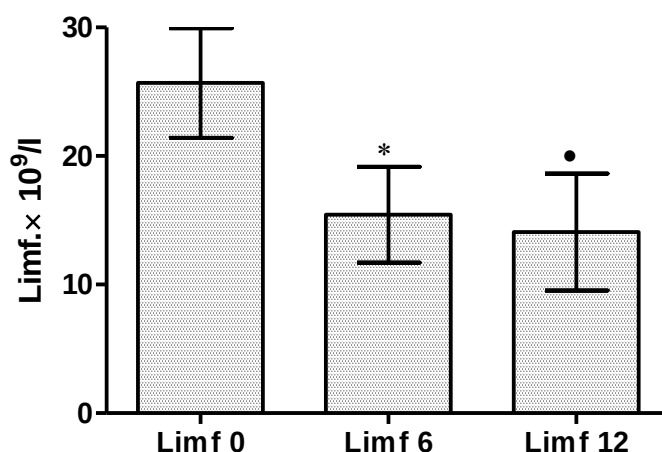
6.11. att. Korelācija starp trombocītu skaitu (PLT) un stadiju. Spīrmana tests



6.12. att. Korelācija starp trombocītu skaitu (PLT) un liesas izmēru. Spīrmana tests

6.1.6. Limfocītu skaits

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu mēnešu terapija samazina limfocītu absolūto skaitu asinīs hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $15,44 \pm 1,88$ pret $25,68 \pm 2,16$ limfocītu/ $10^9/l$ ($p = 0,01$). Savukārt 12 mēnešu terapija arī ar ticamību samazina limfocītu skaitu $14,08 \pm 2,29$ pret $25,68 \pm 1,88$ limfocītu/ $10^9/l$ ($p = 0,001$).



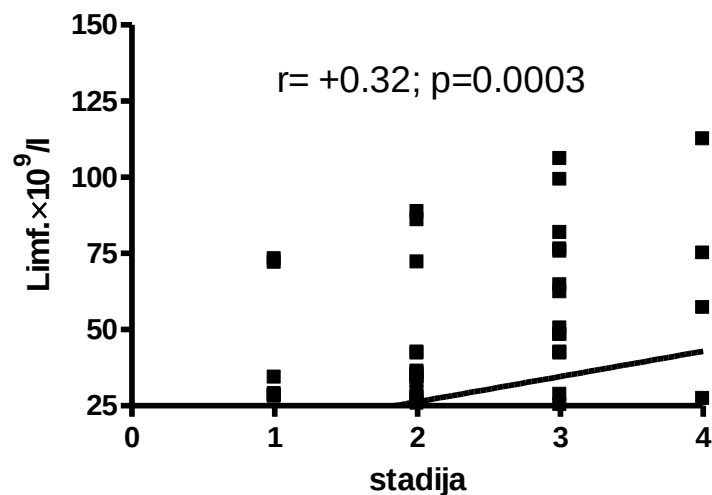
6.13. att. Limfocītu skaits (Limf.) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas (Limf. 0), 6 mēnešus pēc terapijas (Limf. 6) un 12 mēnešus pēc terapijas (Limf.12)

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95% konfidencialitātes intervāls,

salīdzinot Limf. 0 un Limf. 6 * $p = 0,01$

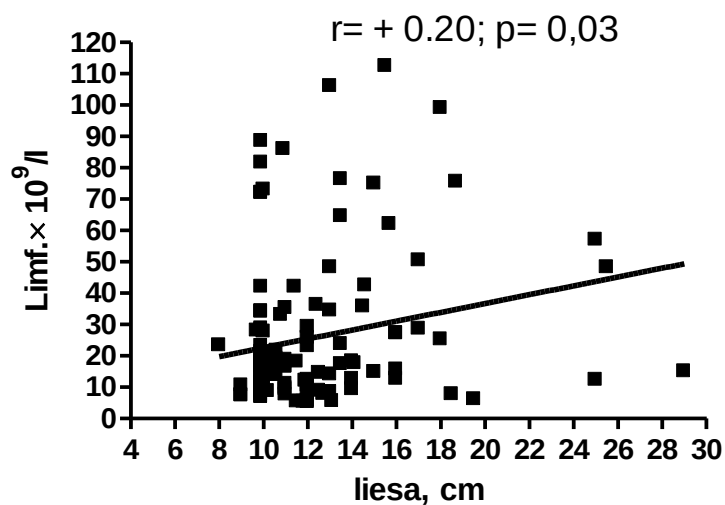
salīdzinot Limf. 0 un Limf. 12 • $p = 0,001$.

Analizējot visus pacientus kopā pēc stadijām, ieguvām statistiski ticamu pozitīvu korelāciju starp stadiju un limfocītu skaitu ($r = +0,32$; $p = 0,0003$; skatīt 6.14. attēlu).



6.14. att. Korelācija starp limfocītu skaitu un stadiju. Spīrmana tests

Analizējot visus pacientus kopā, konstatējām pozitīvu korelāciju starp limfocītu absolūto skaitu un liesas garenizmēru ($r = +0,20$; $p = 0,03$; skatīt 6.15. attēlu).

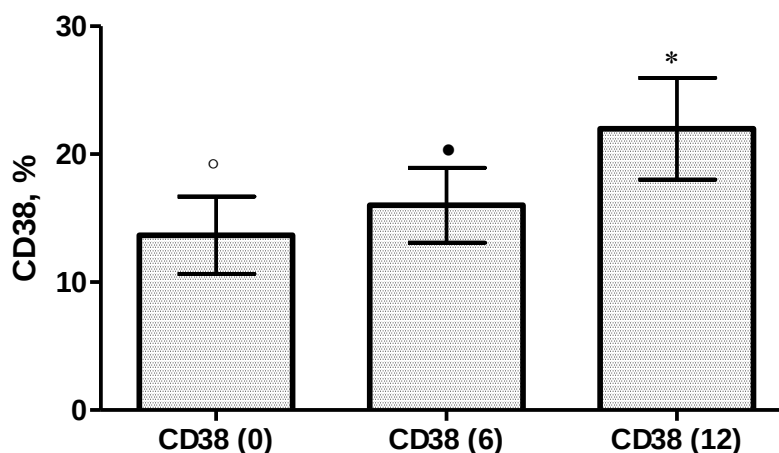


6.15. att. Korelācija starp limfocītu absolūto skaitu un liesas garenizmēru. Spīrmana tests

6.1.7. CD38 daudzums

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu mēnešu terapija palielina CD38 % skaitu hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $16,01\% \pm 1,474\%$ pret $13,66\% \pm 1,526\%$ ($p = 0,01$). Savukārt 12 mēnešu terapija arī ar

statistisko ticamību palielina CD38 % daudzumu – gan salīdzinot ar pirmsterapijas datiem, gan ar 6 mēnešu terapijas rezultātiem respektīvi, $21,99\% \pm 2,008\%$ pret $13,66\% \pm 1,526\%$ ($p = 0,0001$) un $21,99\% \pm 2,008\%$ pret $16,01\% \pm 1,474\%$ ($p = 0,03$).



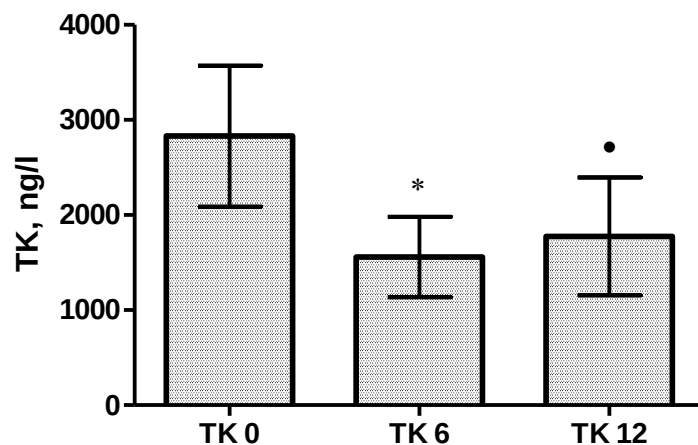
6.16. att. CD38 % skaits hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas [CD38 (0)], 6 mēnešus pēc terapijas [CD38(6)] un 12 mēnešus pēc terapijas [CD38(12)]

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95% konfidencialitātes intervāls. $p = 0,01$, salīdzinot [CD38 (0)] un [CD38 (6)]; * $p=0,0001$, salīdzinot [CD38 (0)] un [CD38 (12)] un • $p=0,03$, salīdzinot [CD38 (6)] un [CD38 (12)].

Netika konstatēta statistiski ticama korelācija starp CD38 un stadiju, liesas izmēru un limfmezglu diametru.

6.1.8. TK daudzums

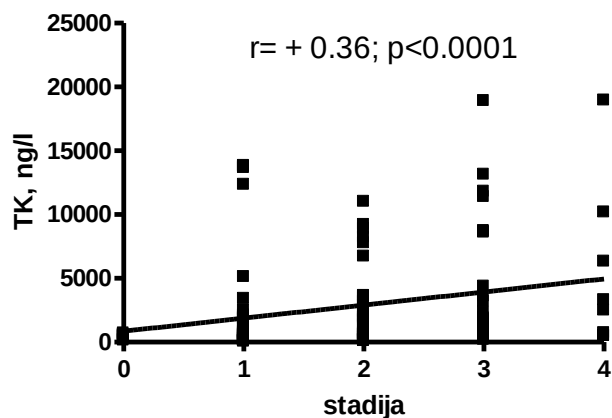
Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu mēnešu terapija samazina TK daudzumu hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $1557,0 \text{ ng/l} \pm 213,70 \text{ ng/l}$ pret $2821,0 \text{ ng/l} \pm 374,70 \text{ ng/l}$ ($p = 0,0001$). Savukārt 12 mēnešu terapija arī samazina TK daudzumu ar ticamību $1775,0 \text{ ng/l} \pm 312,40 \text{ ng/l}$ pret $2821,0 \text{ ng/l} \pm 374,70 \text{ ng/l}$ ($p = 0,02$).



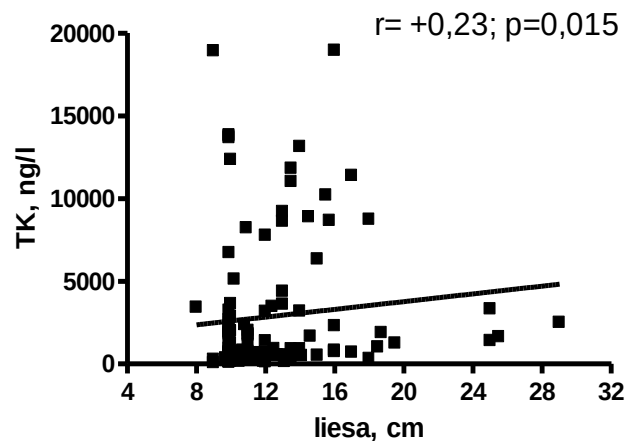
6.17. att. TK daudzums hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas (TK 0), 6 mēnešus pēc terapijas (TK 6) un 12 mēnešus pēc terapijas (TK 12)

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95% konfidencialitātes intervāls. * $p = 0,0001$, salīdzinot TK 0 un TK 6 un • $p = 0,02$, salīdzinot TK 0 un TK 12.

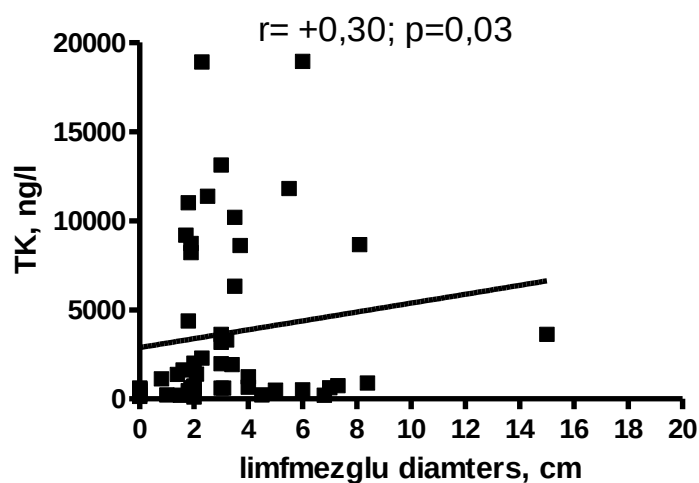
Analizējot visus pacientus kopā pēc stadijām, konstatējām pozitīvu korelāciju starp TK daudzumu un stadiju ($r = +0,36$; $p = 0,0001$; skatīt 6.18. attēlu), starp TK daudzumu un liesas izmēru ($r = +0,23$; $p = 0,015$ skatīt 6.19. attēlu) un starp TK daudzumu un maksimālo limfmezglu diametru ($r = +0,30$; $p = 0,03$; skatīt 6.20. attēlu).



6.18. att. Korelācija starp TK daudzumu un stadiju. Spīrmana tests



6.19. att. Korelācija starp TK daudzumu un limfmezglu diametru. Spīrmana tests

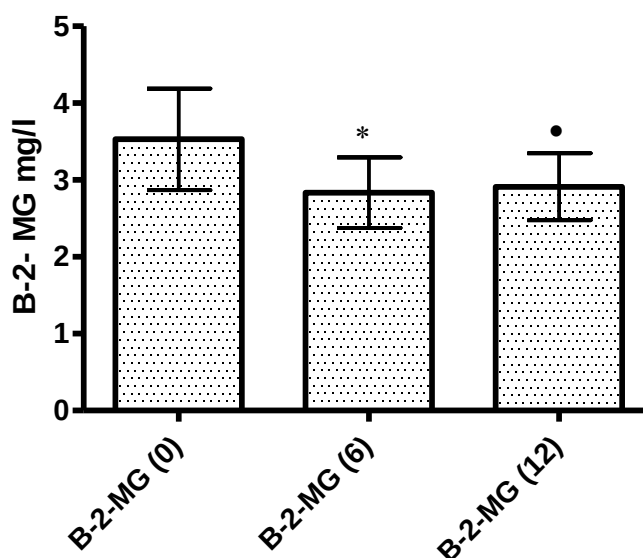


6.20. att. Korelācija starp TK daudzumu un limfmezglu diametru. Spīrmana tests

6.1.9. β_2 mikroglobulīna daudzums

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu mēnešu terapija samazina β_2 MG daudzumu hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $2,84 \text{ mg/ml} \pm 0,22 \text{ mg/ml}$ pret $3,55 \text{ mg/ml} \pm 0,32 \text{ mg/ml}$ ($p = 0,0018$). Arī divpadsmit mēnešu terapija samazina β_2 MG daudzumu ar ticamību $3,055 \text{ mg/ml} \pm 0,27 \text{ mg/ml}$ pret $3,55 \text{ mg/ml} \pm 0,32 \text{ mg/ml}$ ($p = 0,02$).

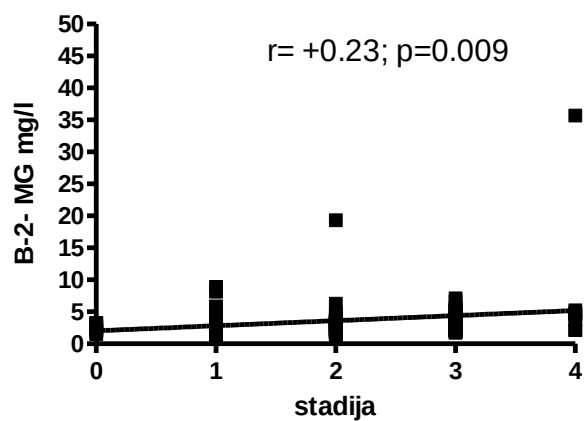
Nav statistiski ticamu atšķirību starp sešu un divpadsmit mēnešu terapiju un β_2 MG daudzumu, lai gan sešu mēnešu ilgai terapijai ir tendence vairāk samazināt β_2 MG daudzumu, salīdzinot ar divpadsmit mēnešu ilgu terapiju.



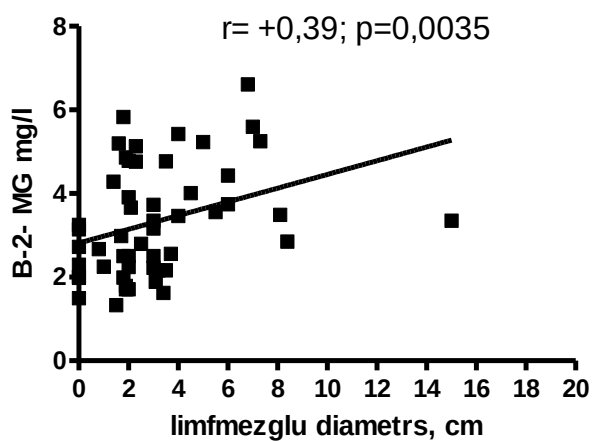
6.21. att. β_2 MG daudzums hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas [β_2 MG (0)], 6 mēnešus pēc terapijas [β_2 MG (6)] un 12 mēnešus pēc terapijas [β_2 MG (12)]

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējais 95% konfidencialitātes intervāls. * $p = 0,0018$, salīdzinot β_2 MG (0) un β_2 MG (6) un • $p = 0,02$, salīdzinot β_2 MG (0) un β_2 MG (12).

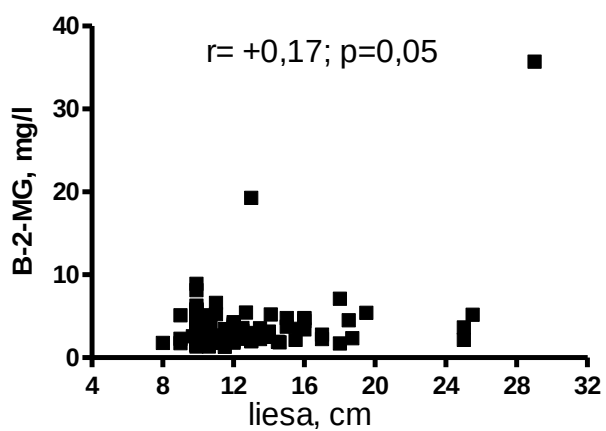
Analizējot visus pacientus kopā, konstatējām pozitīvu korelāciju starp β_2 MG daudzumu un stadiju ($r = +0,23$; $p = 0,009$; skatīt 6.22. attēlu), starp β_2 MG daudzumu un maksimālo limfmezglu diametru ($r = +0,39$; $p = 0,0035$; skatīt 6.23. attēlu) un korelācija starp β_2 MG daudzumu un liesas garenizmēru ($r = +0,17$; $p = 0,05$; skatīt 6.24. attēlu).



6.22. att. Korelācija starp β_2 MG daudzumu un stadiju



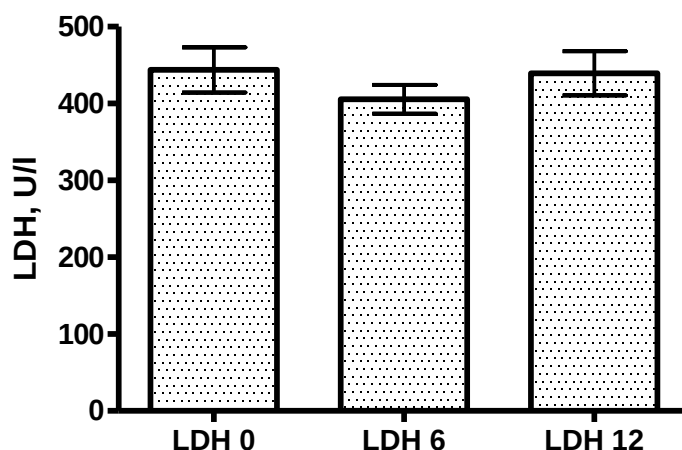
6.23. att. Korelācija starp β_2 MG daudzumu un limfmezglu diametru. Spīrmana tests



6.24. att. Korelācija starp β_2 MG daudzumu un liesas garenizmēru. Spīrmana tests

6.1.10. Laktātdehidrogenāzes (LDH) daudzums

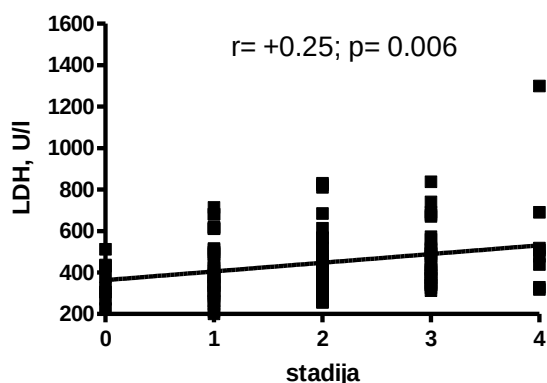
Analizējot LDH, iegūti dati, ka sešu un divpadsmit mēnešu terapija neietekmē LDH līmeni hroniskas limfoleikozes pacientiem (skatīt 6.25. attēlu).



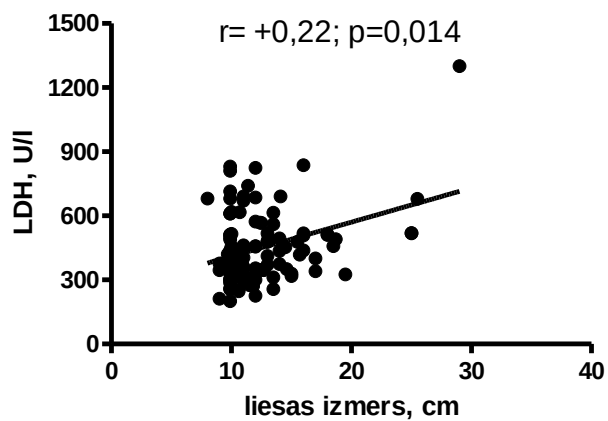
6.25. att. LDH daudzums hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas (LDH 0), 6 mēnešus pēc terapijas (LDH 6) un 12 mēnešus pēc terapijas (LDH 12)

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējā 95% konfidencialitātes intervāls.

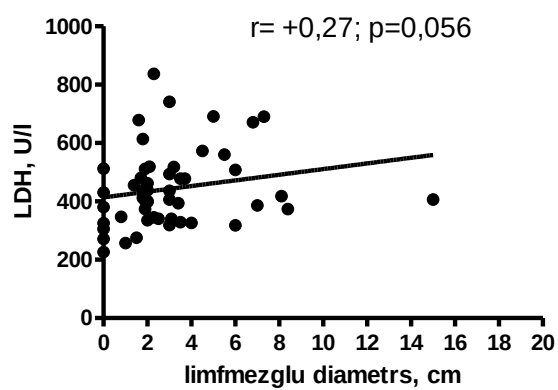
Analizējot visus pacientus kopā pēc stadijām, konstatējām statistiski ticamu pozitīvu korelāciju starp LDH līmeni un stadiju ($r = +0,25$; $p = 0,006$; skatīt 6.26. attēlu), LDH līmeni un liesas garenizmēru ($r = +0,22$; $p = 0,014$; skatīt 6.27. attēlu) un korelācija starp limfmezglu diametru un LDH ($r = +0,27$; $p = 0,056$; skatīt 6.28. attēlu).



6.26. att. Korelācija starp LDH līmeni un stadiju. Spīrmana tests



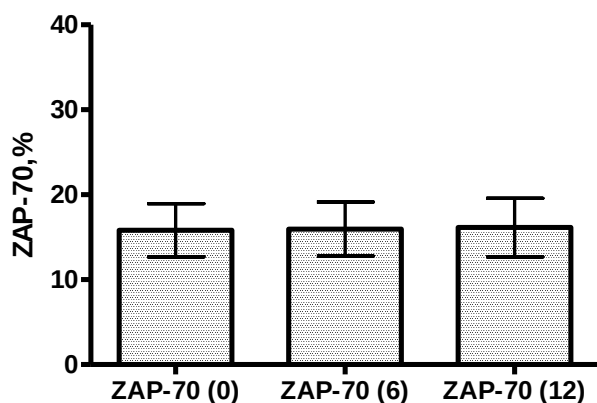
6.28. att. Korelācija starp LDH līmeni un liesas izmēru. Spīrmana tests



6.29. att. Korelācija starp LDH līmeni un limfmezglu diametru. Spīrmana tests

6.1.11. ZAP-70 daudzums

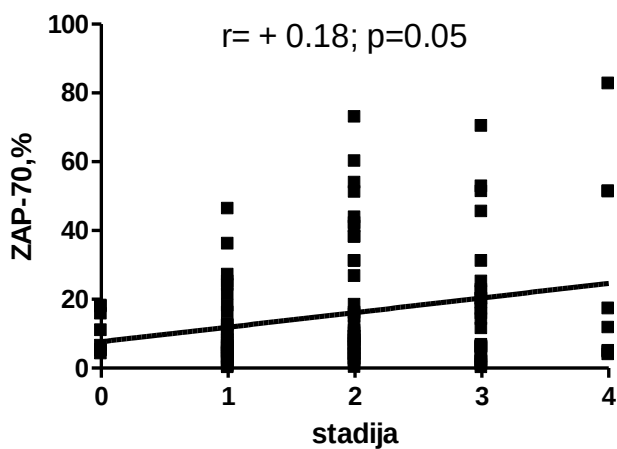
Pētījumā netika atrastas statistiski ticamas atšķirības ZAP-70 rādītājos pirms, sešu un divpadsmit mēnešus pēc terapijas (skatīt 6.30. attēlu).



6.30. att. ZAP-70 hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas (ZAP 0), 6 mēnešus pēc terapijas (ZAP 6) un 12 mēnešus pēc terapijas (ZAP 12)

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ vidējā 95% konfidencialitātes intervāls.

Darbā konstatējām pozitīvu korelāciju starp stadiju un ZAP-70 ($r = +0,18$, $p=0,05$; skatīt 6.31. attēlu).



6.31. att. Korelācija starp stadiju un ZAP-70. Spīrmana tests

Pētījumā netika atrasta korelācija starp liesas garenizmēru, limfmezglu diametru un ZAP-70.

6.1.11.1. ZAP-70 ekspresijas un citu prognozes faktoru analīze HLL gadījumā

Prognostisko marķieru atkarības atklāšanai no ZAP-70 ekspresijas tika izvēlēts

robežlīmenis 20%. Šo lielumu kā ierobežojošo kopā ar līdzautoriem savā darbā 2008. gadā piedāvāja *M. Ertault-Daneshpouy* [55]. Analizējamie prognostiskie faktori darbā tika salīdzināti ar ZAP-70 līmeni: ZAP-70 >20% vai ZAP-70+ variants un ZAP-70 <20% vai ZAP-70– variants. Šis sadalījums ir svarīgs pacientu grupām ar ātri progresējošu un lēni progresējošu slimības variantu norises noteikšanai.

6.1.11.2. ZAP-70 līmeņa ekspresija ar CD19+/CD5+ šūnām HLL slimniekiem ar dažādiem slimības norises variantiem

Šajā pētījumā ZAP-70 noteicām audzēja klonā šūnās CD19+/CD5+. Atkarībā no slimības norises varianta un stadijas slimniekus dalīja divās grupās: ZAP-70– un ZAP-70+. L grupā iekļauti 7 slimnieki ar labdabīgu HLL norises variantu. LP grupā apvienoti 78 slimnieki ar lēni progresējošu slimības norises variantu. ĀP grupā iekļauti 35 slimnieki ar ātri progresējošu variantu. No iegūtajiem datiem redzams, ka ZAP-70 līmenis nemainās, neskatoties uz laika posmu un saņemto ārstēšanu. Šo parametru var ņemt par pamatu pētāmā grupā. Saskaņā ar iegūtajiem datiem visu slimnieku grupas var sadalīt ZAP-70 negatīvos un ZAP-70 pozitīvos pacientos un izvērtēt slimības gaitu, pēc šī sadalījuma. Šīs olbaltumvielas līmeņa pētīšanā atklātas likumsakarības (6.2. tabula).

Grupa sadalīta apakšgrupās, viena apakšgrupa sastāv no 61 ZAP-70+ pacientiem un otra apakšgrupa no 59 ZAP-70– pacientiem. Kā redzams no tabulas datiem, 11% pacientu no grupas ar progresējošu norisi raksturīga ZAP-70+ ekspresija. Labdabīgā HLL norises varianta grupā slimnieku skaits pēc ZAP-70+ marķiera bija 72% no šīs atlases kopējā pacientu skaita. Lēni progresējošā varianta grupā 67% raksturīga ZAP70+ ekspresija un 33% pacientu negatīvi pēc pētāmā marķiera (ZAP-70–).

6.2. tabula

ZAP-70 līmeņa ekspresija ar CD19+/CD5+ šūnām HLL slimniekiem ar dažādiem slimības norises variantiem

ZAP-70 ekspresija	L (n – 7)		LP (n – 78)		ĀP (n – 35)	
	skaits	%	skaits	%	skaits	%
ZAP-70–	2	28	26	33	31	89
ZAP-70+	5	72	52	67	4	11

ZAP-70 līmeņa ekspresija ar CD19+/CD5+ šūnām HLL slimniekiem ar dažādiem slimības norises variantiem pēc 6 mēnešiem

ZAP-70 ekspresija	L (n – 6)		LP (n – 70)		ĀP (n – 33)	
	skaits	%	skaits	%	skaits	%
ZAP-70–	2	33	22	31	30	91
ZAP-70+	4	67	48	69	3	9

Pēc 6 mēnešiem ZAP-70+ apakšgrupā bija 55 pacienti un ZAP-70– apakšgrupā 54 pacienti. Kā redzams no tabulas datiem, 9% pacientiem no grupas ar progresējošu norisi raksturīga ZAP-70+ ekspresija un 91% ar progresējošu norisi raksturīga ZAP-70– ekspresija. Labdabīgā (L) grupā slimnieku skaits pēc ZAP-70+ marķiera bija 67%, no šīs atlasses kopējā pacientu skaita un ZAP-70– apakšgrupā bija 33%. Lēni progresējošā (LP) varianta grupā 69% raksturīga ZAP-70+ ekspresija un 31% pacientu negatīvi pēc pētāmā marķiera (ZAP-70–). Informācija noformēta 6.3.tabulā.

ZAP-70 līmeņa ekspresija ar CD19+/CD5+ šūnām HLL slimniekiem ar dažādiem slimības norises variantiem pēc 12 mēnešiem

ZAP-70 ekspresija	L (n – 2)		LP (n – 67)		ĀP (n – 28)	
	skaits	%	skaits	%	skaits	%
ZAP-70–	2	100	19	28	25	89
ZAP-70+	0	0	48	72	3	11

Pēc 12 mēnešiem ZAP-70+ apakšgrupā bija 51 pacients un ZAP-70– apakšgrupā 46 pacienti. Kā redzams no tabulas datiem, 11% pacientu no grupas ar progresējošu norisi raksturīga ZAP-70+ ekspresija un 89% no grupas ar progresējošu norisi raksturīga ZAP-70–. Labdabīgā (L) grupā pēc ZAP-70+ marķiera nebija neviena pacienta un ZAP-70– apakšgrupā bija 2 pacienti, kas atbilst 100%. Lēni progresējošā (LP) varianta grupā 72% raksturīga ZAP-70+ ekspresija un 28% pacientu negatīvi pēc pētāmā marķiera (ZAP-70–). Dati atspoguļoti 6.4. tabulā.

6.1.12. HLL standarta prognozes faktoru analīze ar atšķirīgu ZAP-70 ekspresiju

Analizējot tādos tradicionālus HLL prognostiskos parametrus kā dzimums, limfocītu absolūtais skaits un limfocītu divkāršošanās laiks, secinām, ka ZAP-70–

apakšgrupā limfocītu absolūtais daudzums ir $32,6 \pm 0,03 \times 10^9/l$ ($p < 0,05$); limfocītu divkāršošanas laiks ir $>$ par 12 mēnešiem ($p < 0,05$). Apakšgrupā ZAP-70+ limfocītu absolūtais daudzums ir $69,6 \pm 0,32 \times 10^9/l$ ($p < 0,05$); limfocītu divkāršošanās laiks ir $9,1 \pm 1,1$ mēneši ($p < 0,05$). Tajā pašā laikā netika atklāta korelācija starp pacientu dzimumu un apakšgrupām ZAP-70– un ZAP-70+ ($p > 0,05$). Dati parādīti 6.5. tabulā.

6.5. tabula

HLL prognozes faktoru analīze slimnieku grupās ar atšķirīgu ZAP-70 ekspresiju

Rādītājs		ZAP-70 ekspresija		Atšķirību ticamība
		ZAP-70–	ZAP-70+	
Dzimums	V	30 (51%)	41 (67%)	$p > 0,05$
	S	29 (49%)	20 (33%)	$p > 0,05$
Limfocītu abs. daudz., $\times 10^9/l$		$32,6 \pm 0,03$	$69,6 \pm 0,32$	$p < 0,05$
Limfocītu divkārš. laiks, mēn.		>12 mēn.	$9,1 \pm 1,1$	$p < 0,05$

6.1.13. Imūnfenotipisko marķieru ekspresijas vērtējums HLL slimniekiem ar dažādu ZAP-70 ekspresiju

Izpētīta virspusējo marķieru ekspresija ZAP-70– un ZAP-70+ apakšgrupās. Analizēti trīs imūnfenotipisko marķieru klasteri: diferencējošie (CD19, CD20), diferenciāli diagnosticējošie (CD5, CD23). Diferenciālie marķieri ir nepieciešami limfocītu populācijas sadalei T šūnās un B šūnās. Diferenciāli diagnostiskos marķierus izmanto diagnozes noteikšanai, jo katrai slimībai atbilst noteikts šūnu fenotips. HLL noteicošie marķieri ir CD5, CD23.

6.6. tabula

Diferencējošo marķieru ekspresijas raksturs HLL slimniekiem

ZAP-70 apakš-grupas	CD19					CD20				
	marķieru ekspresijas līmenis, šūnu skaits %					marķieru ekspresijas līmenis, šūnu skaits %				
	<20	20-70	70-90	>90	p	<20	20-70	70-90	>90	p*
ZAP-70–	2	5	46	6	$<0,05$	2	3	46	8	$<0,05$
ZAP-70+	0	3	44	14	$<0,05$	0	2	52	7	$<0,05$

*p – atšķirību ticamība starp grupām.

Pētījumā monocītu piemaisījums mononukleāru frakcijā, kurā veikta imūnfenotipēšana, bija neliels, t. i., monocīti analīzes veikšanas laikā nepārsniedza 10% visos gadījumos. Šūnu skaita vērtējums starp dažādiem slimniekiem veikts ar noteikumu, ka mononukleāru frakcija satur galvenokārt audzēja B šūnas, tas ir, tajā bija CD19 ekspresija. ZAP-70+ grupā CD19 ir visiem, ekspresējās vairāk nekā uz 80% šūnu, izņemot 3 slimniekiem. ZAP-70– grupā tikai 2 slimniekiem CD19 ekspresējās uz <20% šūnu. Summārie dati pēc virspusējo marķieru ekspresijas lieluma parādīti 6.7. tabulā. Katrs skaitlis tabulā nozīmē slimnieku skaitu, kuriem šūnu daudzums, kas ekspresē šo marķieri, atrodas noteiktās robežās.

6.7. tabula

Diferenciāli diagnosticējošo marķieru ekspresijas raksturs HLL slimniekiem

ZAP-70 apakš- grupas	CD5					CD23				
	marķieru ekspresijas līmenis, šūnu skaits %					marķieru ekspresijas līmenis, šūnu skaits %				
	<20	20-70	70-90	>90	p	<20	20-70	70-90	>90	p*
ZAP-70–	0	8	12	39	<0,01	2	5	33	19	<0,05
ZAP-70+	0	0	8	53	<0,01	1	13	29	18	<0,05

*p – atšķirību ticamība starp grupām.

Zināms, ka B HLL diagnozes noteikšanai ar imūnfenotipiskās analīzes palīdzību fenotipam jāsaturs CD23+ un CD5+ limfocītus. Iegūtie dati to apliecina. Abās ZAP-70– un ZAP-70+ apakšgrupās pacientu pamatskaitam tika atrasts augsts abu diferenciāli diagnosticējošo marķieru procenta saturs. Statistiski ticama varbūtība CD5 marķierim $p < 0,01$; CD23 $p < 0,05$.

Kā redzam 6.7. tabulā, pētījumos netika atklātas statistiski svarīgas atšķirības diferencējošu un diferenciāli diagnosticējošo antigēnu ekspresijā, ņemot vērā ZAP-70 ekspresiju.

6.1.14. CD25 un CD38 aktivācijas marķieru ekspresija dažādās HLL slimnieku grupās ar dažādu ZAP-70 ekspresiju

Aktivācijas marķieriem nav svarīgas diagnostiskās lomas diagnozes noteikšanā ar plūsmas citometrijas palīdzību, bet šie marķieri raksturo limfocītu aktivācijas

procesu. CD38 – multifunkcionāls membrānais virspusējais glikoproteīns, kas ekspresējās ar dažādām šūnām, ieskaitot T un B limfocītus noteiktos to attīstības posmos. Kā transmembrānais receptors tas regulē proliferāciju un T un B limfocītu diferenciāciju [55]. Starp citiem CD38 liganda efektiem atzīmē kināžu aktivāciju un olbaltumvielu fosforilēšanu. CD25 ir uz aktivētajiem T un B limfocītiem un makrofāgiem, paaugstinās limfoproliferatīvā procesa aktivitātes gadījumā. Tāpēc bija svarīgi izanalizēt saikni starp aktivācijas marķieriem un ZAP-70+ un ZAP-70– apakšgrupām HLL pacientiem.

6.8. tabula

Aktivācijas marķieru ekspresijas salīdzinājums HLL slimniekiem

ZAP-70 apakš- grupas	CD25					CD38				
	marķieru ekspresijas līmenis, šūnu skaits %					marķieru ekspresijas līmenis, šūnu skaits %				
	<20	20-70	70-90	>90	p	<20	20-70	70-90	>90	p*
ZAP-70–	48	6	3	2	<0,05	59	0	0	0	<0,05
ZAP-70+	18	15	23	5	<0,05	12	16	28	5	<0,05

*p – atšķirību ticamība starp grupām.

Iegūtie rezultāti liecina, ka ZAP-70– grupā vairumam pacientu ir abi marķieri ar līmeni mazāk par 20%. CD38 marķieris ZAP-70– grupā augstāk par 20% netiek noteikts. CD25 marķierim raksturīga pacientu daudzuma samazināšanās, palielinoties marķiera līmenim. ZAP-70+ grupai raksturīgs vislielākais pacientu daudzums abu analizējamo marķieru gadījumā, ja marķiera līmenis ir 70–90% (attiecīgi CD25 – 23 pacienti un CD38 – 28 pacienti). Abiem marķieriem, ja rādītāja līmenis ir augstāks par 90%, arī raksturīgs vienāds pacientu daudzums – 5. Abiem marķieriem ir apmēram vienāds pacientu daudzuma sadalījums apakšgrupās ar marķieru līmeni mazāk nekā 20% un 20–70%.

6.1.15. Korelācija starp ZAP-70 un LDH

Pētījumā sniegti dati, kas atspoguļo saikni starp LDH līmeni un dažādiem ZAP-70 līmeņiem. Zināms, ka LDH līmeņa palielināšanās var raksturot limfoproliferatīvā procesa aktivitāti.

Korelācija starp ZAP-70 un LDH

ZAP-70, %	LDH, U/l sākumā	LDH, U/l pēc 6 mēn.	LDH, U/l pēc 12 mēn.
ZAP70- <20	382,10 ± 96,14	380,80 ± 88,70	454,60 ± 199,60
ZAP-70+ >20	520,0 ± 220,20	443,40 ± 94,25*	477,10 ± 123,30

Dati izteikti kā vidējais ± standarta deviācija (SD). *p < 0,05, salīdzinot LDH sākumā un LDH pēc 6 mēnešiem. Manna Vitneja U tests.

6.9. tabulā atspoguļotie dati liecina, ka ZAP-70– līmeņa 0–20% korelācijas starp LDH pirms ārstēšanas uzsākšanas, tā arī pielietotas terapijas procesā netika atklātas. Apakšgrupai ar līmeni vairāk nekā 20% (ZAP70+) pēc 6 ārstēšanas mēnešiem atklāta LDH parametra samazināšanās, ar ticamību p < 0,05.

6.1.16. Korelācija starp ZAP-70 un β_2 MG

Darbā izanalizēta saikne starp dažādiem ZAP-70 un β_2 MG līmeņiem trīs dažādos periodos: pirms ārstēšanas, pēc 6 mēnešu novērošanas un pēc 12 mēnešiem.

6.10. tabulā parādīta saikne starp dažādiem ZAP-70 līmeņiem un β_2 MG līmeni dažādos novērošanas periodos pētāmajā pacientu grupā. ZAP-70– apakšgrupā ar līmeni 10–20% β_2 MG līmenis pirms ārstēšanas un pēc 6 novērošanas mēnešiem samazinājās ar ticamu korelāciju p < 0,05. Tomēr ZAP-70+ apakšgrupā ar līmeni, kas augstāks par 20%, salīdzinot β_2 MG līmeni starp pacientiem pirms ārstēšanas un pēc 12 novērošanas mēnešiem, ticamība bija p < 0,0074. Citi tabulas dati savā starpā nekorelē.

Korelācija starp ZAP-70 un β_2 MG

ZAP-70, %	β_2 MG sākumā	β_2 MG pēc 6 mēn.	β_2 MG pēc 12 mēn.
ZAP-70- <20	2,83 ± 3,18	2,32 ± 0,63 *	2,65 ± 0,88
ZAP-70+ >20	3,09 ± 2,84	2,51 ± 0,76*	2,40 ± 0,80**

Dati izteikti kā vidējais ± standarta deviācija (SD). *p < 0,05, salīdzinot β_2 MG un β_2 MG pēc 6 mēnešiem; *p < 0,05, salīdzinot β_2 MG un β_2 MG pēc 6 mēnešiem; **p < 0,0074, salīdzinot β_2 MG un β_2 MG pēc 12 mēnešiem.

6.1.17. Korelācija starp ZAP-70 un CD38

Šajā nodaļā tomēr ir parādīta atkarība starp ZAP-70 līmeni ar dažādu CD38 daudzumu un dažādos novērošanas periodos. ZAP-70– apakšgrupā ar līmeni 0–20% novērojama CD38 līmeņa paaugstināšanās tendence – starp sākotnējo CD38 līmeni un līmeni pēc 6 mēnešiem korelācija bija $p < 0,01$. Tomēr, ja salīdzina CD38 līmeni pirms ārstēšanas sākuma un pēc 12 mēnešiem, korelācija pieaug līdz $p < 0,006$. ZAP-70+ apakšgrupā ar līmeni >20% vērojama CD38 līmeņa samazināšanās pēc 6 novērošanas mēnešiem, bet korelācija netiek novērota. Salīdzinot CD38 līmeni pirms ārstēšanas un pēc 12 mēnešiem, korelācija bija tikai $p < 0,0001$. Dati atspoguļoti 6.11. tabulā.

6.11. tabula

Korelācija starp ZAP-70 un CD38

ZAP-70, %	CD-38	CD-38 pēc 6 mēn.	CD38 pēc 12 mēn.
ZAP-70– <20	$9,86 \pm 13,87$	$10,87 \pm 9,41^*$	$15,15 \pm 14,40^*$
ZAP-70+ >20	$13,83 \pm 3,18$	$12,32 \pm 0,63$	$22,65 \pm 0,88^{**}$

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ standarta deviācija (SD). * $p < 0,006$, salīdzinot CD38 un CD38 pēc 12 mēnešu terapijas; * $p < 0,01$, salīdzinot CD-38 pēc 6 un pēc 12 mēnešu terapijas; ** $p < 0,0001$, salīdzinot CD 38 un CD38 pēc 12 mēnešu terapijas.

6.1.18. Korelācija starp ZAP-70 un slimības stadiju

6.12. tabulā parādīti ZAP-70 līmeņa dati dažādos kontroles periodos visās Raja klasifikācijas stadijās. Korelācija starp ZAP-70 līmeni un slimības stadiju netika atklāta.

6.12. tabula

Korelācija starp ZAP-70 un slimības Raja stadiju

Stadija	ZAP-70 sākumā	ZAP-70 pēc 6 mēn.	ZAP-70 pēc 12 mēn.
0	$4,30 \pm 3,46$	$3,98 \pm 2,02$	$4,30 \pm 3,43$
I	$12,37 \pm 12,14$	$11,79 \pm 13,15$	$10,33 \pm 10,36$
II	$18,98 \pm 18,74$	$19,11 \pm 17,18$	$20,81 \pm 19,82$
III	$17,06 \pm 18,36$	$18,27 \pm 17,57$	$20,31 \pm 20,98$
IV	$28,38 \pm 29,55$	$27,30 \pm 27,62$	$19,67 \pm 21,12$

Dati izteikti kā vidējais $\pm$ standarta deviācija (SD).

ZAP-70 līmenis visos kontroles periodos pieaug, pieaugot stadijai. Visos ZAP-70 kontroles periodos parametra lielums apmēram vienāds II un III stadijā. Viszemākais ZAP-70 rādītājs visos kontrolperiodos 0 stadijā un visaugstākais IV stadijā.

6.1.19. Korelācija starp ZAP-70 un TK

C. Metjū u.c. (C. Matthews et al.) 2006. gadā [124] aprakstīja saikni starp TK līmeni un mutatīvo statusu pacientiem A stadijā pēc Binē klasifikācijas. 6.13. tabulā atspoguļoti TK līmeņu dati un dažādi novērošanas periodi dažādu ZAP-70 līmeņu gadījumā. ZAP-70– līmeņa no 0 līdz 20% gadījumā ir redzama TK līmeņa samazināšanas tendence visos kontroles periodos, $p < 0,02$ salīdzinot TK sākumā un TK pēc 6 mēnešu terapijas. $p < 0,01$, salīdzinot TK sākumā un TK pēc 12 mēnešu terapijas. Tomēr, ja ZAP-70+ līmenis ir augstāks nekā 20%, netiek novērota TK līmeņa samazināšanās tendence pēc 6 mēnešiem, salīdzinot TK līmeņus pēc 6 mēnešiem un pēc 12 mēnešiem.

6.13. tabula

Korelācija starp ZAP-70 un TK

ZAP-70, %	TK sākumā	TK pēc 6 mēn.	TK pēc 12 mēn.
ZAP-70– <20	2461 ± 4064	1126 ± 1602•	803 ± 1130*
ZAP-70+ >20	4098 ± 4676	2746 ± 3270	3883 ± 5146

Dati izteikti kā vidējais ± standarta deviācija (SD). • $p < 0,02$, salīdzinot TK sākumā un TK pēc 6 mēnešu terapijas. * $p < 0,01$, salīdzinot TK sākumā un TK pēc 12 mēnešu terapijas.

No sniegtajiem datiem redzams, ka pirms ārstēšanas TK līmenis visās ZAP-70 apakšgrupās ir augstāks. Visaugstākais analizējamā marķiera rādītājs ir vērojams ZAP-70+ apakšgrupā ar līmeni, kas ir augstāks par 20%. Pēc 6 mēnešiem veiktā kontrole liecina, ka visos ZAP-70 apakšgrupās līmeņos TK ievērojami pazeminājās. Veicot kontroli pēc 12 mēnešiem, TK līmeņa pazemināšanās saglabājās tikai apakšgrupā ar ZAP-70– (0–20%). ZAP-70+ apakšgrupā TK līmenis, salīdzinot ar kontroli pirms ārstēšanas, pazeminājās un paaugstinājās, salīdzinot ar TK līmeni pēc 6 mēnešiem.

6.2. Histoloģijas izmeklējumi

Spārnveida kaula trepānbiosija tika veikta līdz terapijas sākumam. Trepānbiosijas pieejamas 61 pacientam. Kaulu smadzeņu pētījumu rezultāti atspoguļoti 6.14. tabulā. Saskaņā ar tabulā norādītiem datiem, vairumam HLL slimnieku tika konstatēta izteikta kaulu smadzeņu difūzā infiltrācija ar nobriedušiem limfoīdiem elementiem.

6.14. tabula

Kaulu smadzeņu infiltrācijas tips ar limfoīdiem elementiem HLL slimniekiem pēc trepānbiospiāta morfoloģiskā pētījuma datiem

Kaulu smadzeņu infiltrācijas tips ar limfoīdiem elementiem	Pacientu skaits	Pacientu % no pētījumā iekļautā skaita
Perēķļaina infiltrācija	6	10
Difūzi perēķļaina infiltrācija	5	8
Difūza infiltrācija	50	82
Kopā	61	100

Limfmezgla mikroskopiskās izmeklēšanas laikā novērota zīmējuma izdzēšana difūzās infiltrācijas dēļ ar mazo limfocītu tipa šūnām – kā kapsulas, tā arī stromas, kas atbilst limfmezgla ainai hroniskās limfoleikozes gadījumā. 6 slimniekiem (5%) veikts limfmezgla preparāta imūnhistoķīmiskais pētījums.

7. PROGNOTISKO MARKĪERU DINAMIKA TERAPIJAS LAIKĀ

7.1. Terapijas varianti

Visi HLL pacienti, kuri piedalījās pētījumā, pēc terapijas veidiem tika sadalīti divās apakšgrupās. Pacientu grupa, kas nav saņēmusi nekādu terapiju – bez terapijas (b. th.) un pacientu grupa, kas saņēma ķīmijterapijas kursu variantus, kas iekļauj fludarabīnu (F, FC), pacientu grupa, kas saņēma polikīmijterapiju bez fludarabīna (COP, CHOP). Liela grupa slimnieku tika ārstēta ar preparātu *Chlorambucil* (leikerānu) (L). Dati par ķīmijterapijas variantiem parādīti 7.1. tabulā.

7.1. tabula

Ķīmijterapijas varianti

Ķīmijterapijas variants	Medikaments	Deva	Terapijas ilgums, dienas
L	Chlorambucil (Leikerāns)	0,1–0,2 mg/kg	14
LP	Chlorambucil (Leikerāns) Prednison	30 mg/m ² 80 mg/m ²	1 5
CHOP	Cyclophosphamide Doxorubicin Vincristine (Onkovins) Prednisone	300 mg/m ² 25 mg/m ² 1,0 mg/m ² 40 mg/m ²	5 1 1 5
COP	Cyclophosphamide Vincristine (Onkovins) Prednisone	400 mg/m ² 1,4 mg/m ² 100 mg/m ²	5 1 5
F	Fludarabine	25 mg/m ²	5
FC	Fludarabine Cyclophosphamide	30 mg/m ² 250 mg/m ²	3 3

Dati par slimnieku skaitu un terapijas veidiem parādīti 7.2. tabulā.

Terapijas varianti atkarībā no ārstēšanas perioda

Terapijas periods	Bez terapijas Abs. skaits	Leikerānu saturoša terapija Abs. skaits	Fludarabīnu saturoša terapija Abs. skaits	Fludarabīnu nesaturoša terapija Abs. Skaits	Kopējais pacientu skaits Abs. skaits
0 mēn. (Terapijas sākumā)	16	52	35	17	120
Pēc 6 mēn.	17	50	35	7	109
Pēc 12 mēn.	18	55	16	8	97

Iegūtie dati liecina, ka terapijas sākuma grupā bija 120 pacientu, pēc 6 mēnešiem – 109. Kopumā, 12 mēnešu pētījuma laikā, terapeitisku ārstēšanu saņēma 97 pacienti. Katrā periodā – terapijas sākumā, pēc 6 mēnešiem un pēc 12 mēnešiem – pacientu, kuri tika novēroti pēc principa „novēro un gaidi”, skaits grupā bija aptuveni vienāds. Tie bija 16 pacienti terapijas sākumā; 17 pēc 6 mēnešiem un 18 pēc 12 mēnešiem. Līdzīga tendence tika novērota ar slimnieku skaitu, kuri terapijas laikā saņēma leikerānu, – terapijas sākuma grupā bija 52 pacienti, pēc 6 mēnešiem 50 pacienti, pēc 12 mēnešiem 55 pacienti. Pacientu skaits, kuri saņēma fludarabīnu saturošu terapiju, bija vienāds terapijas sākumā, pēc 6 mēnešiem – 35 pacienti, bet pēc 12 mēnešiem tikai 16 pacienti.

Pacientu grupā, kas saņēma terapiju bez fludarabīna, sākumā bija 17 pacienti, pēc 6 mēnešiem – 7 un pēc 12 mēnešiem – 8 pacienti.

Analizējot pacientu grupas, vadoties no ārstēšanas periodiem un pamatojoties uz iepriekšminētajiem ārstēšanas variantiem, pēc pirmreizējās vēršanās pie ārsta un HLL diagnozes apstiprināšanas, slimnieki tika sadalīti apakšgrupās, pamatojoties uz Raja klasifikāciju, kā arī tika nozīmēta terapija. Izvēlētās ārstēšanas varianti atkarībā no apakšgrupas parādīti 7.3. tabulā. Terapiju nozīmēja ārstējošais ārsts hematologs. Tas, ka pacients ir iekļauts šajā pētījumā, neietekmēja terapijas izvēli.

7.3. tabula

Izvēlētās ārstēšanas varianti atkarībā no apakšgrupas

Stadijas apakšgrupas	Bez terapijas	Leikerānu saturoša terapija	Fludarabīnu saturoša terapija	Fludarabīnu nesaturoša terapija	Kopējais pacientu skaits
0–I	13	25	7	0	45
II	3	17	15	4	40
III–IV	0	8	13	13	35
Kopā	16	52	35	17	120

Pirmreizējās vēršanās laikā pie ārsta HLL diagnoze tika noteikta 120 pacientiem, no tiem bez terapijas, novērošanā atstāta grupa, kurā ietilpst 16 pacienti. Ar minimālo stadiju apakšgrupā 0–I bija 13 pacienti, apakšgrupā II bija 3 pacienti un apakšgrupā ar III–IV stadiju pacientu nebija. Kopējais pacientu skaits, kas saņēma dažādus terapijas veidus, bija 104. No tiem leikerāna terapija tika nozīmēta 52 pacientiem, ķīmijterapijas kursus ar fludarabīnu saturošu terapiju saņēma 35 pacienti, fludarabīnu nesaturošu terapijas kursu saņēma 17 pacienti.

7.4. tabulā parādīti dati par ārstēšanas variantiem apakšgrupās pēc 6 mēnešiem.

7.4. tabula

Ārstēšanas varianti apakšgrupās pēc 6 mēnešiem

Stadijas apakšgrupas	Bez terapijas	Leikerānu saturoša terapija	Fludarabīnu saturoša terapija	Fludarabīnu nesaturoša terapija	Kopējais pacientu skaits
0–I	13	21	7	0	41
II	3	24	10	1	38
III–IV	1	5	18	6	30
Kopā	17	50	35	7	109

Dažādus terapijas veidus saņēma 92 pacienti. Bez ārstēšanas, tikai novēroti tika 17 pacienti. Dažādi terapijas veidi, kas sadalīti pēc stadijām, parādīti 7.4. tabulā.

Pēc 12 mēnešiem grupu veidoja 97 pacienti. Terapeitisku ārstēšanu saņēma 79 pacienti, 17 pacienti tika tikai novēroti. Dati par terapijas variantiem apakšgrupās parādīti 7.5. tabulā.

Ārstēšanas varianti apakšgrupās pēc 12 mēnešiem

Stadijas apakšgrupas	Bez terapijas	Leikerānu saturoša terapija	Fludarabīnu saturoša terapija	Fludarabīnu nesaturoša terapija	Kopējais pacientu skaits
0–I	12	21	2	1	36
II	6	20	5	1	32
III–IV	0	14	9	6	29
Kopā	18	55	16	8	97

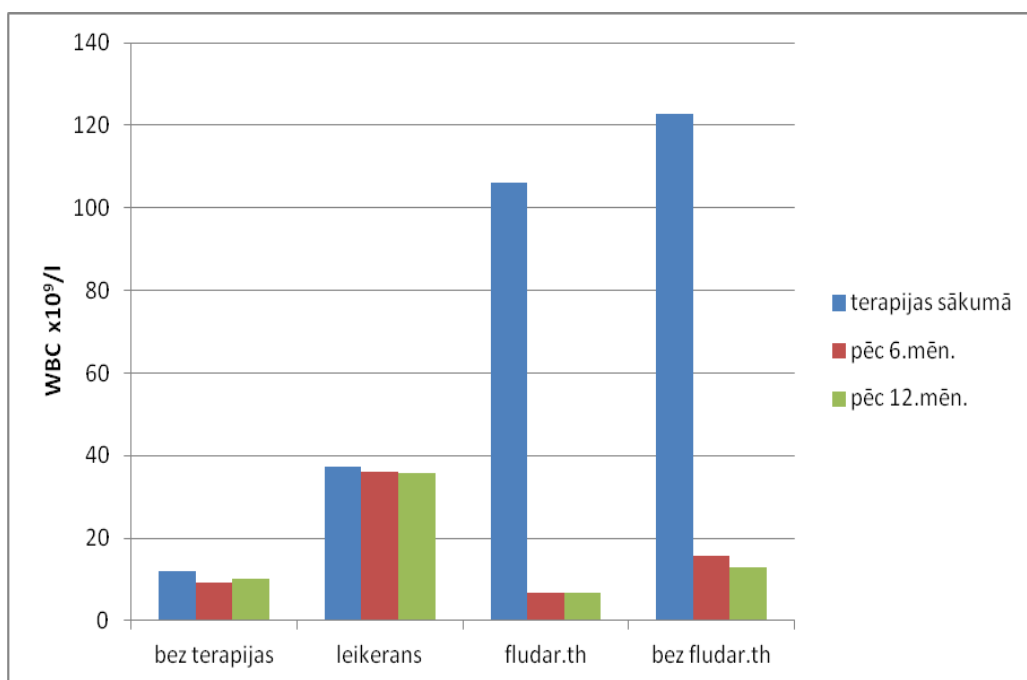
No parādītajiem datiem redzams, ka visā pētījuma periodā tikai novērošanā atradās apmēram vienāds slimnieku skaits (pirmreizējā kontrole – 16 pacienti, pēc 6 mēnešiem – 17 pacienti, pēc 12 mēnešiem – 18 pacienti). Pacientu grupa, kas saņēma leikerānu, sadalījās šādi: pirmreizējā vizīte pie ārsta – 52 pacienti, pēc 6 mēnešiem – 50 pacienti, pēc 12 mēnešiem – 55 pacienti. Apakšgrupa, kas saņēma fludarabīnu saturošu terapiju, sadalījās šādi: pirmreizējā vizīte pie ārsta – 35 pacienti, pēc 6 mēnešiem – tāpat 35 pacienti, pēc 12 mēnešiem – 16 pacienti. Apakšgrupā ar fludarabīnu nesaturošu terapiju pirmreizējā vizīte pie ārsta – 17 pacienti, pēc 6 mēnešiem – 7 pacienti, pēc 12 mēnešiem – 8 pacienti.

7.2. Leikocītu (WBC) skaita izmaiņas terapijas laikā

7.1. attēlā parādīts leikocītu skaits pacientiem ar HLL pirms ārstēšanas un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas. Visizteiktāk leikocītu skaitu samazināja 12 mēnešu fludarabīnu saturoša terapija. 6 vai 12 mēnešu leikerāna terapija statistiski ticami neietekmē leikocītu skaitu asinīs hroniskas limfoleikozes pacientiem. Pacientiem pēc 6 un 12 mēnešu fludarabīnu saturošas terapijas novērojām statistiski ticamu leikocītu skaita samazināšanos, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $77,18 \times 10^9/l \pm 28,91 \times 10^9/l$ pret $5,3 \times 10^9/l \pm 1,40 \times 10^9/l$ un $77,18 \times 10^9/l \pm 28 \times 10^9/l$ pret $5,35 \times 10^9/l \pm 1,43 \times 10^9/l$, leikocīti/ $10^9/l$ ($p < 0,035$ un $p < 0,04$).

Turklāt, pacientiem pēc 6 mēnešu fludarabīnu nesaturošas terapijas novērojām leikocītu skaita samazināšanās tendenci, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $86,87 \times 10^9/l \pm 35,96 \times 10^9/l$ pret $12,1 \times 10^9/l \pm 4,60 \times 10^9/l$, leikocīti/ $10^9/l$ ($p < 0,1$). Savukārt pēc 12 mēnešu fludarabīnu nesaturošas terapijas novērojām statistiski ticamu leikocītu skaita samazināšanos, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $86,87 \times 10^9/l \pm 35,96 \times 10^9/l$

pret $8,6 \times 10^9/l \pm 4,40 \times 10^9/l$, leikocīti/ $10^9/l$ ($p < 0,04$). Leikocītu skaits apakšgrupās bez terapijas paliek bez īpašām izmaiņām.

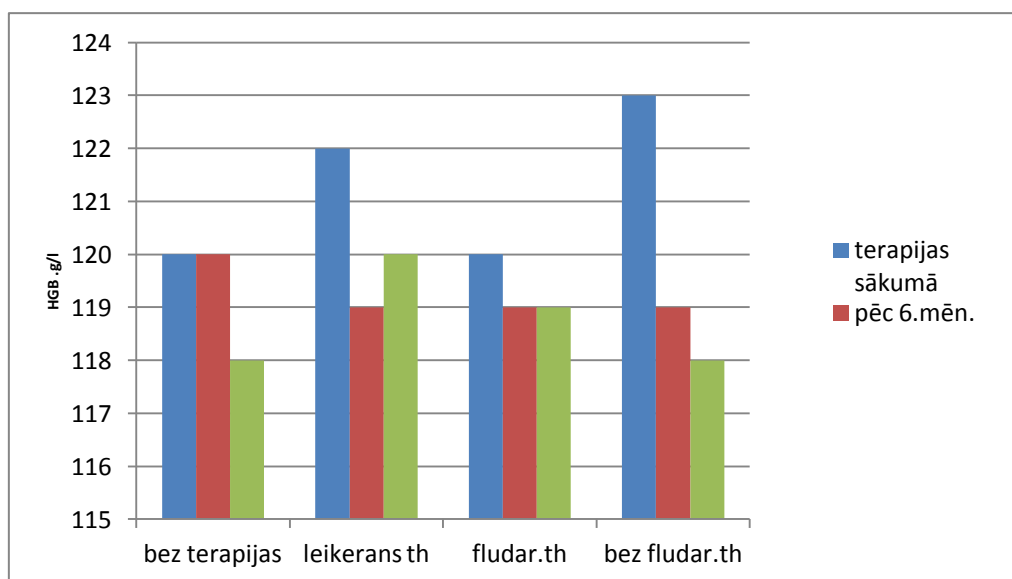


7.1. att. Leikocītu skaits (WBC) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 mēnešus pēc terapijas un 12 mēnešus pēc terapijas

7.3. Hemoglobīna līmeņa izmaiņas terapijas laikā

7.2. attēlā parādīts hemoglobīna līmenis pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu ilgas terapijas.

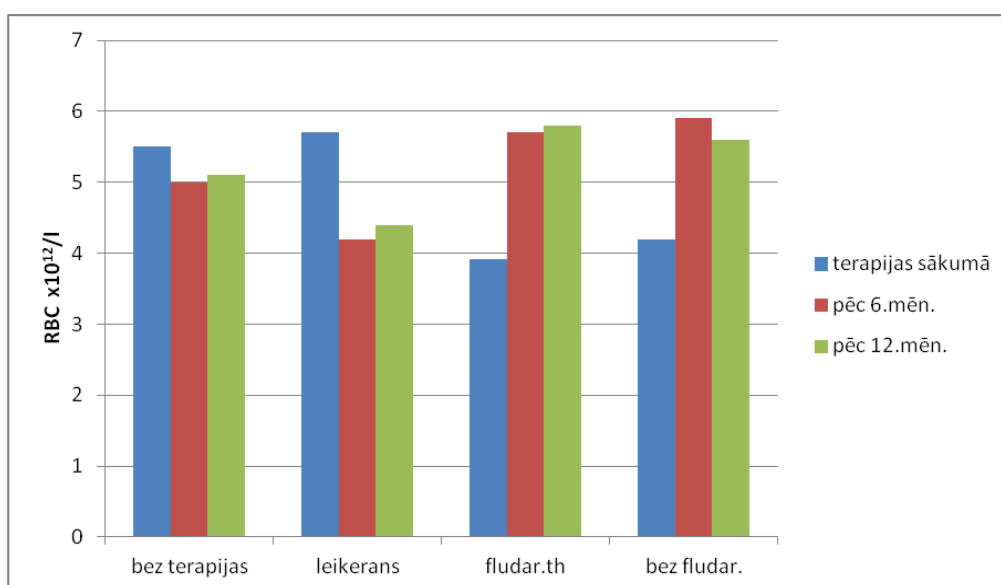
Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi bez terapijas, ar leikerānu, fludarabīnu saturošu un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 6 vai 12 mēnešiem hemoglobīna līmenis statistiski nemainās, salīdzinot ar pacienta sākuma novērošanas posmu.



7.2. att. Hemoglobīna līmenis (HGB) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 mēnešus pēc terapijas un 12 mēnešus pēc terapijas

7.4. Eritrocītu (RBC) skaita izmaiņas terapijas laikā

7.3. attēlā parādīts eritrocītu skaits pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākumposmā un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas. Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi bez terapijas, ar leikerānu, fludarabīnu saturošu un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 6 vai 12 mēnešiem eritrocītu skaits statistiski nemainās, salīdzinot ar pacienta sākuma novērošanas posmu.

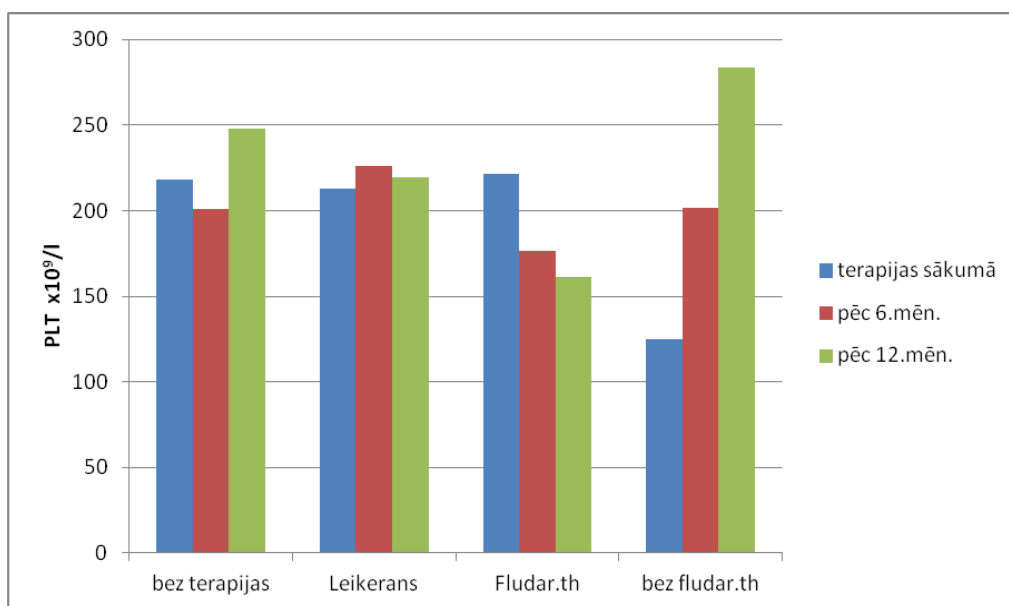


7.3. att. Eritrocītu skaits (RBC) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 mēnešus pēc terapijas un 12 mēnešus pēc terapijas

7.5. Trombocītu skaita izmaiņas terapijas laikā

7.4. attēlā parādīts trombocītu skaits pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi ar leikerāna terapiju un bez terapijas pēc 6 vai 12 mēnešiem trombocītu skaits statistiski ticami nemainās, salīdzinot ar pacientu sākuma novērošanas posmu. Savukārt pacientiem pēc 12 mēnešu fludarabīnu saturošas terapijas novērojām samazinātu trombocītu skaitu, salīdzinot ar pirmsterapijas rādītājiem – $200,8 \times 10^9/l \pm 20,35 \times 10^9/l$ pret $150,4 \times 10^9/l \pm 10,8 \times 10^9/l$ trombocīti $\times 10^9/l$ ($p < 0,046$). Turpretī pacientiem pēc 12 mēnešu fludarabīnu nesaturošas terapijas novērojām palielinātu trombocītu skaitu, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $199,0 \times 10^9/l \pm 84,4 \times 10^9/l$ pret $95,0 \times 10^9/l \pm 30,0 \times 10^9/l$, trombocīti $\times 10^9/l$ ($p < 0,049$).



7.4. attēls. Trombocītu skaits (PLT) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 mēnešus pēc terapijas un 12 mēnešus pēc terapijas

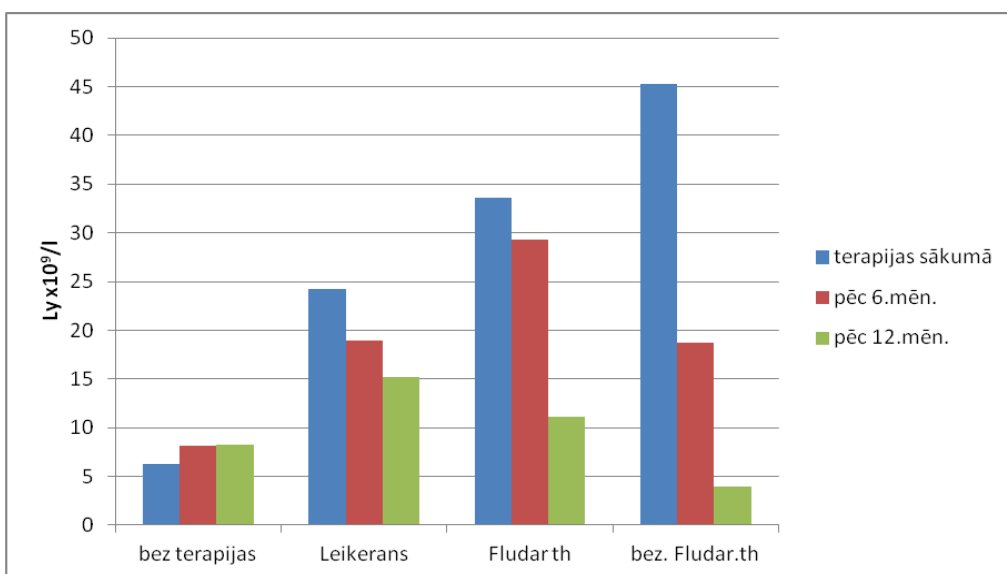
$p < 0,046$, salīdzinot fludarabīnu saturošu terapiju sākumā un fludarabīnu saturošu terapiju pēc 12 mēnešiem,

$p < 0,049$, salīdzinot fludarabīnu nesaturošu terapiju sākumā un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 12 mēnešiem.

7.6. Limfocītu skaita izmaiņas terapijas laikā

7.5. attēlā parādīts limfocītu skaits pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas.

Pētījumā iegūtie rezultāti rāda, ka bez terapijas apakšgrupā vērojama neliela tendence limfocītu skaitam palielināties bez statistiskas ticamības. Iegūtie rezultāti liecina, ka 12 mēnešu leikerāna terapija limfocītu skaitu palielina, bet 6 mēnešu terapija ar lielu statistisku ticamību limfocītu skaitu samazina, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $11,60 \times 10^9/l \pm 3,56 \times 10^9/l$ pret $21,40 \times 10^9/l \pm 2,78 \times 10^9/l$ limfocīti ($p < 0,03$). 12 mēnešu fludarabīnu saturoša terapija limfocītu skaitu samazina labāk nekā 6 mēnešu terapija, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $9,40 \times 10^9/l \pm 1,71 \times 10^9/l$ pret $28,0 \times 10^9/l \pm 5,63 \times 10^9/l$ limfocīti ($p < 0,01$). Līdzīgi arī fludarabīnu nesaturoša 12 mēnešu terapija, bet ne 6 mēnešu terapija, limfocītu skaitu samazina, salīdzinot ar pirms terapijas datiem $3,10 \times 10^9/l \pm 0,88 \times 10^9/l$ pret $44,32 \times 10^9/l \pm 0,96 \times 10^9/l$ limfocīti ($p < 0,048$).



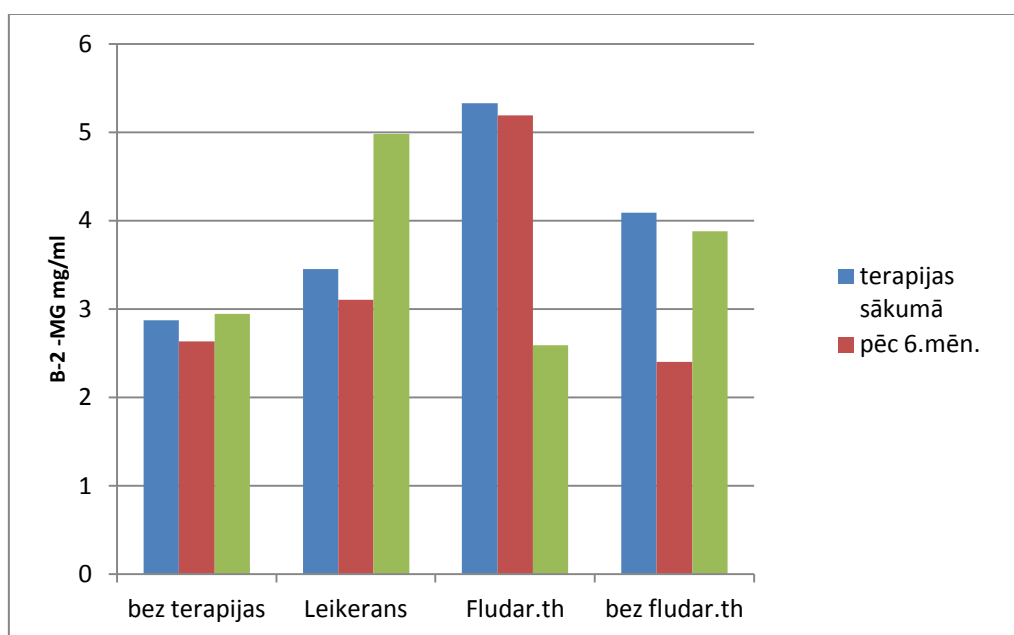
7.5. att. Limfocītu skaits (Ly) hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 mēnešus pēc terapijas un 12 mēnešus pēc terapijas

$p < 0,03$, salīdzinot leikerāna terapiju sākumā un leikerāna terapiju pēc 12 mēnešiem,
 $p < 0,01$, salīdzinot fludarabīnu saturošu terapiju sākumā un fludarabīnu saturošu terapiju pēc 12 mēnešiem,
 $p < 0,045$ salīdzinot fludarabīnu nesaturošu terapiju sākumā un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 6 mēnešiem,
 $p < 0,048$, salīdzinot fludarabīnu nesaturošu terapiju sākumā un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 12 mēnešiem.

7.7. β_2 mikroglobulīna līmeņa izmaiņa terapijas laikā

7.6. attēlā parādīts β_2 MG līmenis pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas.

Pētījumā konstatējām, ka apakšgrupā bez terapijas β_2 MG līmenis nepalielinās. Bet, ja salīdzina 6 un 12 mēnešu ilgu leikerāna terapiju, konstatējām, ka 12 mēnešu terapija palielina β_2 MG līmeni, salīdzinot ar 6 mēnešu terapiju $4,28 \text{ mg/ml} \pm 0,7 \text{ mg/ml}$ pret $2,86 \text{ mg/ml} \pm 0,24 \text{ mg/ml}$ ($p < 0,045$). Pētījumā konstatējām, ka 12 mēnešu fludarabīnu saturoša terapija samazina β_2 MG līmeni, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $2,12 \text{ mg/ml} \pm 0,47 \text{ mg/ml}$ pret $4,80 \text{ mg/ml} \pm 0,53 \text{ mg/ml}$ ($p < 0,02$). Arī 6 mēnešu ilga fludarabīnu nesaturoša terapija palielina β_2 MG līmeni, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $2,23 \text{ mg/ml} \pm 0,17 \text{ mg/ml}$ pret $3,55 \text{ mg/ml} \pm 0,59 \text{ mg/ml}$ ($p < 0,04$).



7.6. att. β_2 MG līmenis hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 un 12 mēnešus pēc terapijas

$p < 0,02$, salīdzinot fludarabīnu saturošu terapiju sākumā un fludarabīnu saturošu terapiju pēc 12 mēnešiem,

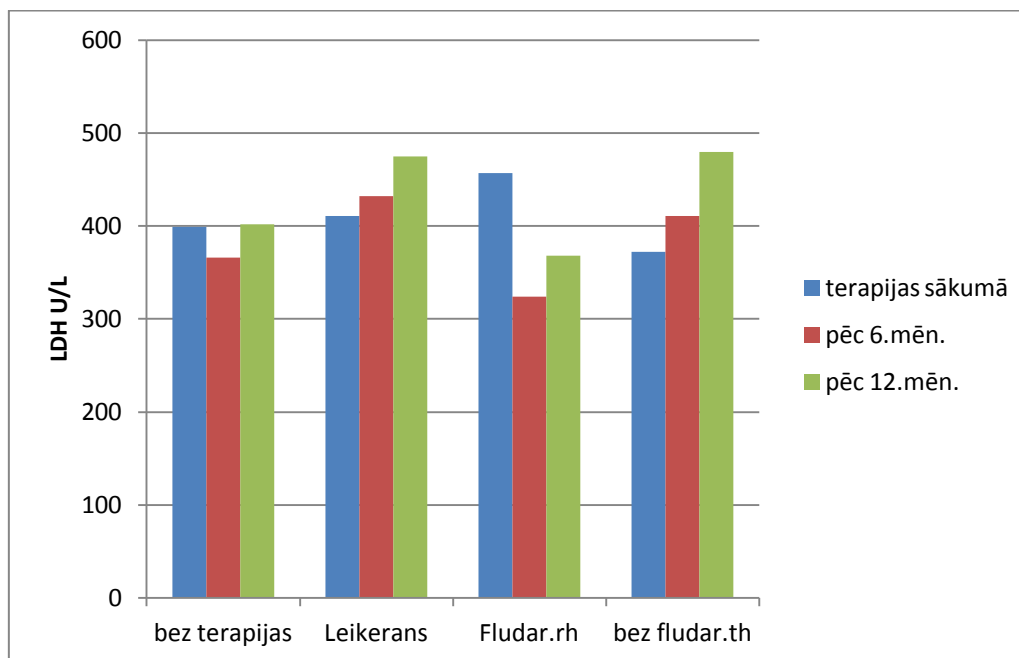
$p < 0,04$, salīdzinot fludarabīnu nesaturošu terapiju sākumā un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 6 mēnešiem,

$p < 0,045$, salīdzinot leikerāna terapiju pēc 6 mēnešiem un leikerāna terapiju pēc 12 mēnešiem.

7.8. LDH līmeņa izmaiņa terapijas laikā

7.7. attēlā parādīts LDH līmenis pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas.

Pētījumā iegūtie rezultāti parāda, ka gan 6, gan 12 mēnešu leikerāna terapijai ir tendence palielināt LDH līmeni. Fludarabīnu saturoša 12 mēnešu terapija samazina LDH līmeni, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $354,0 \text{ U/l} \pm 13.77 \text{ U/l}$ pret $438,0 \text{ U/l} \pm 18,76 \text{ U/l}$ ($p < 0.01$). Savukārt pēc 12 mēnešu polikēmijterapijas bez fludarabīnu saturošiem preparātiem LDH līmenis palielinās, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $449,0 \text{ U/l} \pm 31.00 \text{ U/l}$ pret $361,70 \text{ U/l} \pm 10.87 \text{ U/l}$ ($p < 0,04$).



7.7. att. LDH līmenis hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 un 12 mēnešus pēc terapijas

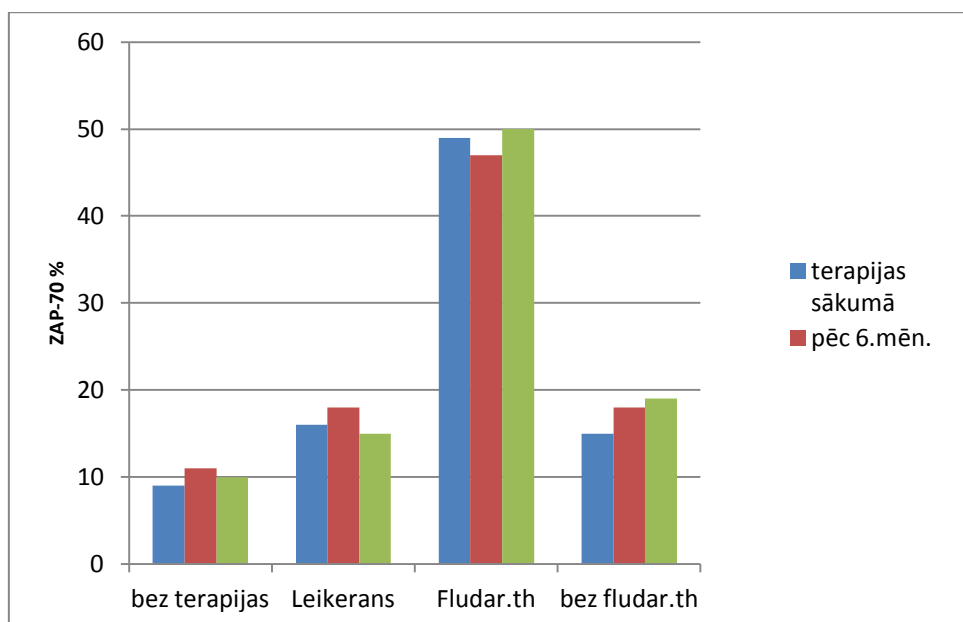
$p < 0,01$, salīdzinot fludarabīnu saturošu terapiju sākumā un fludarabīnu saturošu terapiju pēc 12 mēnešiem,

$p < 0,04$, salīdzinot fludarabīnu nesaturošu terapiju sākumā un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 12 mēnešiem.

7.9. ZAP-70 līmeņa izmaiņas terapijas laikā

7.8. attēlā parādīta ZAP-70 koncentrācija pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi bez terapijas, kā arī ar leikerānu, fludarabīnu saturošu terapiju un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 6 vai 12 mēnešiem ZAP-70 koncentrācija statistiski ticami nemainās, salīdzinot ar pacienta sākuma novērošanas posmu.

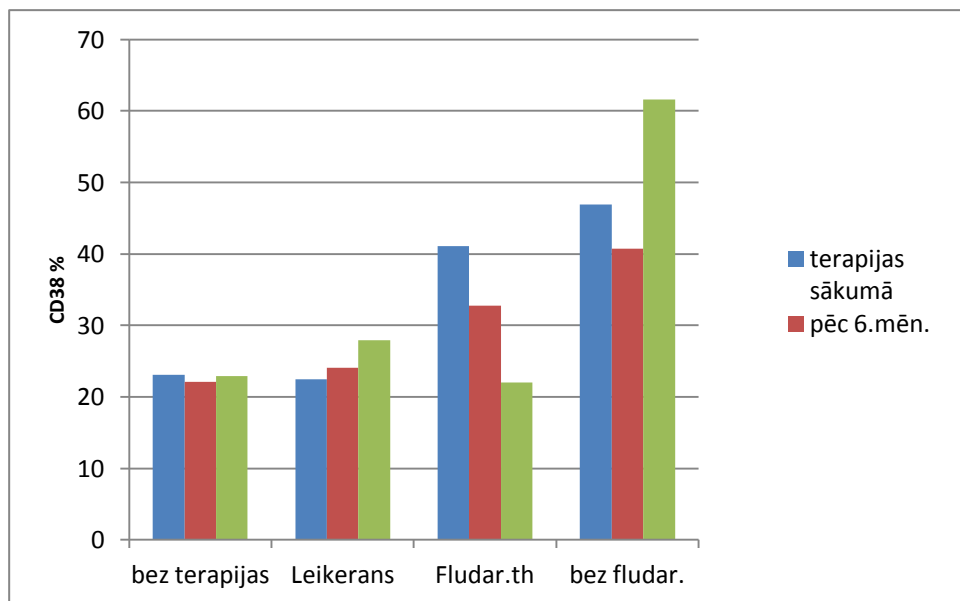


7.8. att. ZAP-70 koncentrācija hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 un 12 mēnešus pēc terapijas

7.10. CD38 līmeņa izmaiņas terapijas laikā

7.9. attēlā parādīta CD38 koncentrācija pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu terapijas.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi fludarabīnu saturoša 12 mēnešu terapija samazina CD38 līmeni, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $16,56\% \pm 5,47\%$ pret $34,5\% \pm 6,98\%$ ($p < 0,049$). Leikerānam un fludarabīnu nesaturošai 12 mēnešu terapijai ir tendence palielināt CD38 līmeni. Savukārt CD38 līmenis bez terapijas apakšgrupā nemainās.



7.9. att. CD38 līmenis hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 mēnešus pēc terapijas un 12 mēnešus pēc terapijas

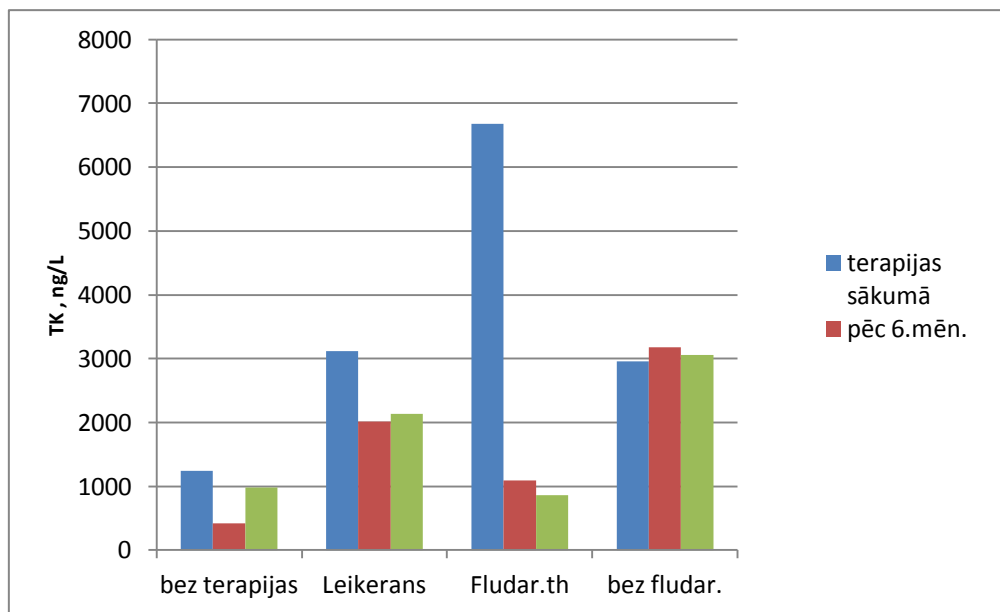
$p < 0,049$, salīdzinot fludarabīnu saturošu terapiju sākumā un fludarabīnu saturošu terapiju pēc 12 mēnešiem.

7.11. TK līmeņa izmaiņas terapijas laikā

7.10. attēlā parādīta TK koncentrācija pacientiem ar hronisku limfoleikozi novērošanas sākuma posmā un pēc 6 un 12 mēnešu ilgas terapijas.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi bez terapijas 6 un 12 mēnešu terapijai ir tendence samazināt TK līmeni. Leikerāna terapija 6 un 12 mēnešu terapijai ir tendence samazināt TK līmeni bez ticamības 3016 ± 7609 pret 2001 ± 3997 ($p < 0,0567$) un 3016 ± 7609 pret 2124 ± 4206 ($p < 0,0768$).

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi fludarabīnu saturoša 6 mēnešu, bet ar lielāku ticamību 12 mēnešu ilga terapija, samazina TK koncentrāciju, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $843,3 \pm 249,7$ pret $4861,0 \pm 1815,0$ ($p < 0,049$) un $597,0 \pm 267,4$ pret $4861,0 \pm 1815,0$ ($p < 0,045$).



7.10. att. TK līmenis hroniskas limfoleikozes pacientiem pirms terapijas, 6 mēnešus pēc terapijas un 12 mēnešus pēc terapijas

p <0,0567, salīdzinot leikerana saturošu terapiju sākumā un leikerana saturošu terapiju pēc 6 mēnešiem,

p <0,0768, salīdzinot leikerana saturošu terapiju sākumā un leikerana saturošu terapiju pēc 12 mēnešiem,

p <0,049, salīdzinot fludarabīnu saturošu terapiju sākumā un fludarabīnu saturošu terapiju pēc 6 mēnešiem,

p <0,045, salīdzinot fludarabīnu saturošu terapiju sākumā un fludarabīnu saturošu terapiju pēc 12 mēnešiem.

p <0,0957, salīdzinot fludarabīnu nesaturošu terapiju sākumā un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 6 mēnešiem,

p <0,0316, salīdzinot fludarabīnu nesaturošu terapiju sākumā un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 12 mēnešiem,

8. IEGŪTO REZULTĀTU APSPRIEŠANA

Hroniska limfoleikoze (HLL) ir ļaundabīga asins sistēmas slimība. Hroniska limfoleikoze ir izplatītākais leikozes veids starp visām hemoblastozēm [94]. Slimība ir zināma apmēram divsimt gadus, un visā šajā laikā hroniskas limfoleikozes diagnostika un ārstēšana ir būtiski mainījusies un uzlabojusies [16]. Tomēr tā joprojām ir aktuāla problēma gan pasaulē, gan Latvijā [192].

Vairāki pētnieki atzīmē, ka hroniska limfoleikoze ir heterogēna pēc klīniskām izpausmēm un slimnieku dzīves ilguma, kas svārstās no dažiem mēnešiem līdz gadu desmitiem. F. Kaligaris-Kapio (*F. Caligaris-Cappio*) 2008. gadā savā darbā aprakstīja mūsdienu uzskatus par HLL patoģenēzi, kā arī dažādus slimības norises variantus [16]. M. Horvics (*M. Horwitz*) veica HLL ģimenes gadījumu analīzi un pierādīja, ka katrā nākamajā paaudzē slimība izpaužas smagāk un arvien vairāk skar vecuma ziņā jaunākus pacientus [89]. Tātad slimības heterogenitāte atkarīga no vairākiem faktoriem. Ar terapijas izmaiņu, kas ļauj sasniegt pilnīgu remisiju, mainās slimnieku uzraudzības taktika, tādēļ jau agrīnos slimības posmos ir ļoti svarīgi noteikt, kāda HLL forma ir noteiktiem pacientiem. Tas katrā konkrētā gadījumā ļauj izvēlēties pareizu uzraudzības taktiku, realizēt individuālu ārstēšanu un kontroli. Šo problēmu palīdz risināt gan jau labi zināmi prognostiskie faktori (slimības stadijas noteikšana, limfocītu dubultošanās laiks, β_2 MG, LDG un citi), gan jauni prognostiskie marķieri – CD38, ZAP-70, TK.

Mūsu pētījums veikts uz RAKUS bāzes, Ķīmijterapijas un hematoloģijas klīnikā no 2007. līdz 2009. gadam. Pētījumā tika izmeklēti 120 HLL pacienti, no tiem 60 slimnieki (50%) bija vīrieši un 60 (50%) sievietes. Vidējais vīriešu vecums $68,51 \pm 8,72$ gadi, sievietēm – $65,42 \pm 1,56$. Analizējamā pacientu grupa bija viendabīga vecuma ziņā un veidoja vienādas apakšgrupas vīriešu un sieviešu skaita ziņā. Tomēr, visi autori pētījumos uzrāda datus, ka biežāk saslimst vīrieši nekā sievietes. Piemēram, E. Montserata (*E. Montserrat*) 1988. gada pētījuma grupā bija 261 pacients, 74% no tiem bija vīrieši [131].

Pētījumā visi slimnieki tika sadalīti pēc Raja klasifikācijas stadijas: 0 stadijā bija 7 pacienti; I stadijā – 38 pacienti; II stadijā – 40 pacienti; III stadijā – 19 pacienti un IV stadijā – 16 pacienti. Literatūrā nav aprakstīts slimības stadiju sadalījums pirmreizējiem HLL pacientiem, bet ir aprakstīts pacientu sadalījums pēc slimības progresēšanas riska principa. Prognozes paredzēšanas dēļ ievērojami labāk HLL iedalīt progresēšanas

variantos. Saskaņā ar literatūras datiem, ņemot vērā progresēšanas risku, kā aprakstīts T. Seileta (*T. Seiler*) 2006. gada darbā, pacienti tika sadalīti 3 grupās: agrīnā (Raja 0), viduvējā (Raja I, II), progresīvā (Raja III, IV) [156].

Pirmajā pacientu grupā bija 7 cilvēki (6%) ar labdabīgu slimības norisi. Otrajā slimnieku grupā bija 78 cilvēki (65%), slimībai bija lēni progresējošais raksturs. Trešajā grupā bija 35 slimnieki (29%), slimībai bija ātri progresējošs raksturs.

Visiem pacientiem veiktas asins analīzes. Darbā veikta statistiskā analīze un atklāta saikne starp asins analīzes parametriem un slimības stadiju. Šī atkarība ir svarīga, un to aprakstījuši vairāki autori, jo slimības stadija ļauj izvēlēties turpmāko pacienta uzraudzības taktiku. J. Hus (*J. Hus*) ar līdzautoriem veica analīzi 156 HLL pacientiem un pierādīja laboratorijas rādītāju saistību ar slimības attīstības tempiem [90]. Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka eksistē statistiski ticama saikne un ir pozitīva korelācija starp leukocītu līmeņa paaugstināšanos un slimības stadiju ($r = +0,33$; $p = 0,0002$), tika atklāta negatīva korelācija starp hemoglobīna līmeņa samazināšanos un slimības stadiju ($r = -0,36$; $p = 0,0001$), kā arī negatīva korelācija un ticama saikne starp eritrocītu līmeni un slimības stadiju ($r = -0,38$; $p = 0,0001$), starp trombocītu līmeni un slimības stadiju ir negatīva korelācija ($r = -0,42$; $p < 0,0001$), starp limfocītu līmeni un slimības stadiju ir pozitīva korelācija un ticama saikne ($r = +0,32$; $p = 0,0003$). Iegūtie statistiski ticamie dati starp asins parametru rādītājiem un slimības stadiju saskan ar V. G. Virda u.c. (*W. G. Wierda et al.*) [184] publicētiem datiem. Periodā no 1981. līdz 2004. gadam izanalizēti vairāk nekā 1500 pacienti. Pētnieku grupa publicēja rezultātus, kas liecina par leukocītu palielināšanos, palielinoties stadijai un eritrocītu un trombocītu līmeņa samazināšanos, palielinoties stadijai.

Tāpat veiktajā pētījumā izsekojama statistiski ticama saikne starp audzēja masas lielumu un asins parametriem. Izsekojama statistiska ticamība un pozitīva korelācija starp leukocītu līmeņa paaugstināšanos un liesas izmēru ($r = +0,19$; $p = 0,049$), starp eritrocītu daudzuma samazināšanos un liesas izmēru noteikta negatīva korelācija un ticama saikne ($r = -0,25$, $p = 0,005$), starp hemoglobīna līmeņa samazināšanos un liesas izmēru ir negatīva korelācija ($r = -0,30$, $p = 0,0009$), negatīva korelācija un ticama saikne ir arī starp trombocītu līmeņa samazināšanos un liesas izmēru ($r = -0,32$, $p = 0,0004$), starp limfocītu daudzuma palielināšanos un liesas izmēru ir pozitīva korelācija un ticama saikne ($r = +0,20$, $p = 0,03$). Audzēja masas lieluma atkarība no slimības stadijas, tās ietekme uz slimības norisi un HLL progresēšanas ātrums ir aprakstīti C. Rozmana (*C. Rozman*) pētījumā 1995. gadā. Mūsu pētījumā iegūtie dati sakrīt ar C.

Rozmana rakstu, kurā tiek analizēta pacientu ārstēšanas koncepcija, publicētajiem datiem [154]. Audzēja masas lielums ir svarīgs HLL progresijas pierādījums.

Daudzi autori norāda uz tādu prognostisko faktoru kā β_2 MG un LDH nozīmi. T. Seilers un citi (T. Seiler *et al.*) [156] savā darbā apraksta šo parametru līmeņa atkarību un slimības stadiju, bet nav atrasti dati par šo parametru saikni ar audzēja masas lielumu. Mēs veicām statistisku analīzi. Atklāta ticama saikne un pozitīva korelācija starp β_2 MG daudzumu un slimības stadiju ($r = +0,23$; $p = 0,009$), starp β_2 MG daudzumu un maksimālu limfmezglu diametru ir ticama saikne un pozitīva korelācija ($r = +0,39$; $p = 0,0035$) un starp β_2 MG daudzumu un liesas garenizmēru ir ticama saikne un pozitīva korelācija ($r = +0,17$; $p = 0,05$).

Līdzīgā tendence atzīmēta, analizējot LDH. Konstatējām statistiski ticamu, pozitīvu korelāciju un ticamu saikni starp LDH līmeni un slimības stadiju ($r = +0,25$; $p = 0,006$), statistiski ticamu, pozitīvu korelāciju un ticamu saikni starp LDH līmeni un liesas garenizmēru ($r = +0,22$; $p = 0,014$), korelāciju un ticamu saikni starp limfmezglu diametru un LDH ($r = +0,27$; $p = 0,056$).

Pēc A. Krobera (A. Krober) (2006) un M. Krespo (M. Crespo) (2003), īpaši svarīgs ir mutatīvais statuss vai tā surogātmarķieris ZAP-70, kas ļauj izšķirt slimnieku apakšgrupas ar atšķirīgu prognozi, īpaši agrīno stadiju robežās [36, 110]. ZAP-70 uzdevums ir aktivizēt tirozīnkināzi un fosforilēt iekššūnu CD3 kompleksa olbaltumvielu. T limfocītu aktivācija notiek ar T šūnu receptoru savienojumu ar antigēnu saturošu šūnu starpniecību (makrofāgi, dendrītšūnas un B limfocīti). Šis savienojums fosforilē transmembrāno olbaltumvielu un aktivē T limfocītu. Izrādās, ka viens no svarīgākajiem gēniem, kas atšķir hroniskas B šūnu limfoleikozes variantus ar dažādu mutāciju statusu, ir gēns, kas koordinē proteīnkināzi ZAP-70, kura nodod signālus, kas nāk no T šūnu receptora. Šis gēns ekspresējas tajā hroniskas B šūnu limfoleikozes variantā, kuram nav raksturīgo mutāciju variablaļā domēnā un neekspresējas variantā ar mutācijām [25, 36].

A. A. Vistners u. c. (A. A. Wiestner *et al.*) (2003) grupā, kurā ir 107 hroniskas limfoleikozes pacienti, pierādīja, ka ZAP-70 ir gēns, kas vislabāk sadala hroniskas limfoleikozes apakštipus pēc mutāciju statusa: pacientiem bez VH gēnu mutācijas gēns ZAP-70 ekspresējās 5,54 reizes spēcīgāk nekā pacientiem ar VH gēnu mutācijām [187]. Šajā pētījumā 93% pacientu ZAP-70 ekspresija pareizi prognozēja mutāciju statusu. Darbā analizēta 120 pirmreizējo pacientu grupa pirms ārstēšanas un dinamikā.

A. C. Bake (A. C. Bakke) 2006. gadā sīki aprakstīja ZAP-70 noteikšanas metodi un atzīmēja, ka šis parametrs ir stabils [7]. Pētījumā netika atrastas statistiski ticamas atšķirības ZAP-70 rādītājos pēc 6 un 12 mēnešiem terapijas. Pētāmajā grupā bija 87 pacienti, stadijas tika noteiktas pēc Raja klasifikācijas – 56 pacienti vīrieši un 31 – sievietes dažādās slimības stadijās. ZAP-70 līmeņa kontrole tika veikta pirms ārstēšanas un pēc veiktā ārstēšanas kursa.

Mūsu darbā konstatējām pozitīvu korelāciju starp stadiju un ZAP-70 ($r = +0,18$, $p = 0,05$). Literatūrā nav datu par ZAP-70 līmeņa atkarību no slimības stadijas, bet ir aprakstīta ZAP-70– un ZAP-70+ apakšgrupu atkarība no citiem faktoriem. Šo apakšgrupu analīzi savā pētījumā veica M. Ertolts-Danešpuvs u. c. (M. Ertault-Daneshpouy et al.) 2008. gadā [55]. Šajā darbā aprakstītas divas pacientu apakšgrupas A stadijā pēc Binē klasifikācijas, tika ņemts vērā pacientu dzimums, vecums un CD38 līmenis. ZAP-70– grupā iekļauti 40 pacienti, ZAP-70+ – 54 pacienti. Iepriekš minētā autora darbā arī netika atrasta saikne starp pacientu dzimumu dažādās ZAP-70 apakšgrupās [55].

Mūsu pētījumā pacientu grupa tika sadalīta apakšgrupās, vienā apakšgrupā bija 61 ZAP-70+ pacients, otrā apakšgrupā 59 ZAP-70– pacienti. 4 pacientiem jeb 11% pacientu no grupas ar progresējošu norisi raksturīga ZAP-70+ ekspresija. Labdabīgā grupā slimnieku skaits pēc ZAP-70+ marķiera bija 5 pacienti jeb 72% no šīs atlases kopējā pacientu skaita. Lēni progresējošā varianta grupā 52 pacientiem jeb 67% raksturīga ZAP-70+ ekspresija un ZAP-70– apakšgrupā ir 26 pacienti jeb 33%. Analizējot HLL „vecos” prognostiskos parametrus, tādus kā dzimums, limfocītu absolūtais skaits un limfocītu divkāršošanās laiks, mēs secinājām, ka ZAP-70– apakšgrupā limfocītu absolūtais daudzums ir $32,6 \pm 0,03 \times 10^9/l$, $p < 0,05$; limfocītu divkāršošanās laiks ir $>$ par 12 mēnešiem, $p < 0,05$. Apakšgrupā ZAP-70+ limfocītu absolūtais daudzums ir $69,6 \pm 0,32 \times 10^9/l$, $p < 0,05$; limfocītu divkāršošanās laiks ir $9,1 \pm 1,1$ mēn., $p < 0,05$. Tajā pašā laikā netika atklāta korelācija starp pacientu dzimumu un apakšgrupām ZAP-70– un ZAP-70+, $p > 0,05$.

Zināms, ka HLL diagnozes noteikšanai ar imūnfenotipiskās analīzes palīdzību, fenotipam jāsaturs CD23+ un CD5+ limfocītus. Iegūtie dati to apliecina. Abās ZAP-70– un ZAP-70+ apakšgrupās pacientu pamatskaitam tika atrasts augsts abu diferenciāldiagnosticējošo marķieru procenta saturs. Statistiski ticama varbūtība CD5 marķierim $p < 0,01$; CD23 $p < 0,05$. Iegūtie dati sakrīt ar analīzes rezultātiem M. Ertolts-

Danešpuvs u. c. (*M. Ertault-Daneshpouy et al.*) 2008. gada pētījumā [55]. Autors uzsver, ka šo marķieru noteikšanu var izmantot kā rutīnmetodi HLL diagnostikā.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi bez terapijas, kā arī ar leikerānu, fludarabīnu saturošu terapiju un fludarabīnu nesaturošu terapiju pēc 6 vai 12 mēnešiem ZAP-70 koncentrācija statistiski ticami nemainās, salīdzinot ar pacienta sākuma novērošanas posmu. Ievērojot rādītāja stabilitāti, to var izmantot HLL varianta noteikšanai saslimšanas sākumā. Vairāki autori uzskata, ka ZAP-70 līmenis slimības norises laikā nemainās. Starp šiem autoriem ir F. Van Bokštels (*F. Van Bockstaele*), kurš 2009. gadā ar līdzautoriem veica prognostisko marķieru pētījumu, kas tiek izmantots pacientiem HLL agrīnā stadijā [11]. Mūsu pētījums apstiprina šos secinājumus. Pastāv autoru viedoklis, piemēram, M. I. Del Principis (*M. I. Del Principe*) [141], ka ZAP-70 līmenis samazinās, ārstējot ar kortikosteroīdiem. Lai nonāktu pie šāda secinājuma, zinātnieku grupa veica novērojumus 3 gadu laikā. Mūsu pētījumā kortikosteroīdi tika izmantoti apakšgrupās ar fludarabīnu saturošu terapiju un fludarabīnu nesaturošu terapiju, bet ZAP-70 līmenis palika nemainīgs. Ievērojot šā rādītāja stabilitāti, to var izmantot HLL diagnostikai kopā ar citiem parametriem.

Vēl viens no prognostiskiem parametriem ir CD38. Pēc K. Čanga (*C. Chang*) (2003) ziņām, CD38 piemīt īpašība pie noteiktiem nosacījumiem stimulēt vai novērst cilvēka limfocītu apoptozi [24]. Citu liganda CD38 efektu starpā atzīmē kināžu aktivāciju un olbaltumvielu fosforilēšanu. Šajā darbā analizētas CD38 līmeņa dinamiskās izmaiņas HLL slimniekiem.

Mūsu darbā visi pacienti tika sadalīti ZAP-70– un ZAP-70+ apakšgrupās. Šajās apakšgrupās tika veikta CD38 līmeņa analīze. ZAP-70– apakšgrupā visiem pacientiem CD38 līmenis ir mazāks par 20%, $p = 0,05$, tajā pašā laikā ZAP-70+ apakšgrupā ir vislielākais pacientu daudzums ar CD38 līmeni 70–90% (28 pacienti). Salīdzinot CD38 līmeņa dinamiku apakšgrupā ar ZAP-70– līmeni līdz 20%, ir ievērots izteiktāks CD38 palielinājums (salīdzinot CD38 sākumā un CD38 pēc 12 mēnešu terapijas $9,86 \pm 13,87$ un $15,15 \pm 14,40$, $p = 0,006$; $10,87 \pm 9,41$ un $15,15 \pm 14,40$, $p = 0,01$, salīdzinot CD38 pēc 6 un pēc 12 mēnešu terapijas; $13,83 \pm 3,18$ un $22,65 \pm 0,88$, $p = 0,0001$, salīdzinot CD 38 un CD38 pēc 12 mēnešu terapijas.) salīdzinājumā ar ZAP-70+ apakšgrupu.

M. I. Del Principis (*M. I. Del Principe*) 2006. gadā [141] veica šo parametru saiknes analīzi un nonāca pie secinājuma: ja ZAP-70+ grupā ir augsts CD38, šiem pacientiem ir sliktāka prognoze, un otrādi, ja ZAP-70– apakšgrupā ir zems CD38 līmenis, prognoze pacientiem ir laba. T. J. Hamblins (*T. J. Hamblin*) 2002. gadā [81]

atklāja izteiktu korelāciju starp šiem 2 parametriem un piedāvāja šo pāri izmantot kā standartu HLL diagnostikā. Mūsu pētījumā izanalizēta saikne starp CD38 līmeni un slimības stadiju.

Pētījumā netika konstatēta statistiski ticama korelācija starp CD38 un slimības stadiju, kas sakrīt ar M. Montillo u. c. (*M. Montillo et al.*) (2005) [128] viedokli, lai arī savā darbā autors analizē ārstēšanas rezultātus, atzīmējot atkarību starp CD38 līmeni un slimības stadiju. Tajā pašā laikā zinātniskajās publikācijās nav datu par atkarību starp CD38 līmeni, liesas izmēru un limfmezglu lielumu. Šajā darbā pētīta CD38 līmeņa saikne ar iepriekš minētajiem parametriem, bet netika konstatēta statistiski ticama korelācija starp CD38, liesas izmēru un limfmezglu diametru.

Izanalizējot veiktās terapijas rezultātus un CD38 līmeņa izmaiņas, ieguvām šādus datus: sešu mēnešu ķīmijterapija palielina CD38 skaitu hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $16,01\% \pm 1,474\%$ pret $13,66\% \pm 1,526\%$ ($p = 0,01$). Savukārt 12 mēnešu terapija arī ar statistisku ticamību palielina CD38% daudzumu $21,99\% \pm 2,008\%$ pret $13,66\% \pm 1,526\%$ ($p = 0,0001$) gan salīdzinot ar pirmsterapijas datiem, gan ar 6 mēnešu terapijas rezultātiem $21,99\% \pm 2,008\%$ pret $16,01\% \pm 1,474\%$, ($p=0,03$). Pēc P. Ševaljēra u. c. (*P. Chevallier et al.*) (2002) [31] un U. Trumberga (*U. Thrumberg*) (2001) [172] viedokļa, CD38 līmeņa paaugstināšanās asociējas ar slimības progresēšanu. Mūsu dati sakrīt ar iepriekš minēto autoru datiem.

L. Z. Rasenti (*L. Z. Rassenti*) 2008. gadā [149] ar līdzautoriem, izanalizējot pirmreizējo pacientu CD38 līmeņa izmaiņas dažādās Binē stadijās, atklāja agresīvāku apakšgrupu ar augstu CD38 līmeni.

Izskatot atsevišķus veiktās terapijas veidus, iegūti šādi rezultāti: pacientiem ar hronisku limfoleikozi fludarabīnu saturoša 12 mēnešu terapija samazina CD38 līmeni, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $16,56\% \pm 5,47\%$ pret $34,5\% \pm 6,98\%$, ($p = 0,049$). Leikerāna un fludarabīnu nesaturošai 12 mēnešu terapijai ir tendence palielināt CD38 līmeni. Savukārt bez terapijas CD38 līmenis apakšgrupā nemainās. I. Del Gidīs u. c. (*I. Del Giudice et al.*) [69] 2005. gadā 201 neārstētu pacientu grupā noteica ZAP-70 un CD38 līmeni. Atkārtotas analīzes veiktas pēc 26 mēnešiem. Autors atzīmēja, ka augsta CD38 līmeņa gadījumā, īpaši HLL agrīnās stadijās, nekavējoties jāuzsāk terapija.

Mūsu pētījumā TK analīze veikta 120 primārajiem HLL slimniekiem, kuru vidējais vecums ir $66,87 \pm 1,007$ gadu. Grupā bija 60 sievietes un 60 vīrieši. Neeksistē vienots viedoklis par demogrāfiska rakstura saikni ar HLL norises smagumu un TK līmeni, kā arī ar prognostisku faktoru izteiksmi sievietēm un vīriešiem. Savukārt

pētījumā norādīti dati: atšķirības starp slimnieku grupām 0 stadijā (2718 ± 4008 ng/l), I, II stadijā (3712 ± 6798 ng/l) un III, IV stadijā (4259 ± 5230) ir ticamas ($p < 0,05$). Ja 0 stadijā netika atklātas statistiski svarīgas atšķirības TK saturā, ņemot vērā slimnieku dzimumu (vīrieši 2025 ± 3714 ng/l; sievietes 2574 ± 3598 ng/l), tad I, II stadijā (vīrieši 4567 ± 6471 ng/l, sievietes 2805 ± 4276 ng/l) un III, IV stadijā (vīrieši 9559 ± 1323 ng/l, sievietes 3930 ± 4369 ng/l) novērota šī marķiera divkārtēja paaugstināšanās vīriešiem, salīdzinot ar sievietēm. Zinātnisku darbu, kuros TK līmenis tiktu analizēts atkarībā no pacienta dzimuma, nav. E. Montserats (*E. Montserrat*) (1988) atzīmē, ka HLL visbiežāk sastopama vīriešiem, un tai raksturīga smagāka norise un nelabvēlīga prognostisku faktoru esamība [131].

Ir pētījumi, kas pierāda, ka TK līmenis atspoguļo kopējo audzēja masu. Savā darbā T. Seilers (*T. Seiler*) ar līdzautoriem (2006) 3 gadu laikā izpētīja procesa aktivitātes HLL slimniekiem dažādās slimības stadijās saskaņā ar Raja klasifikāciju [156]. Autoru grupa nonāca pie secinājuma, ka audzēja masas pieaugumu ar slimības progresēšanu pētnieki saista ar dalošos šūnu daudzuma palielināšanos, attiecīgi TK līmeņa paaugstināšanos asins serumā. Tātad TK produkcijas pieaugums dod ievērojamu proliferatīvu priekšrocību audzēja šūnām.

Mūsu darbā izanalizēti pacienti saskaņā ar Raja klasifikāciju pirms ārstēšanas uzsākšanas. Atklāta ticama statistiska saikne starp TK un Raja stadiju. Mūsu pētījumā slimnieku izmeklēšanas laikā veikta TK līmeņa analīze 120 pacientiem, konstatēta sakarība un pozitīva korelācija starp TK līmeni un Raja stadiju ($r = + 0,36$; $p < 0,0001$). Mūsu pētījumā atklāta saikne starp TK līmeni un audzēja masas lielumu. Slimnieku izmeklēšanas laikā atklāta sakarība starp TK līmeni un liesas izmēru ($r = + 0,23$; $p = 0,015$) un starp TK līmeni un limfmezglu diametru ($r = +0,30$; $p = 0,03$).

TK loma leikozes procesa progresēšanā minēta vairākos darbos. Pēc M. Halleka (*M. Hallek*) (1999) viedokļa [76], TK līmeņa noteikšanu var izmantot kā neatkarīgu prognostisko faktoru lēni un ātri progresējošu HLL variantu noteikšanā. C. Magnaks (*C. Magnac*) (2000) [119] analizēja divus prognostiskos faktorus un nonāca pie secinājuma, ka TK līmenis var sniegt informāciju par mutatīvo statusu. Praksē mutatīvā statusa noteikšana ir ilgstošs un dārgs process, tomēr mūsdienu piedāvātā ZAP-70 noteikšanas metodika ir vieglāka. Pētījumā tika analizēti abi rādītāji dinamikā. Dati liecina, ka ZAP-70– apakšgrupā ir statistiska ticamība ($p = 0,01$), salīdzinot TK sakumā un TK pēc 12 mēnešiem, ZAP-70+ apakšgrupā sakarību starp TK līmeni dinamikā nenovēro. Par

analīzes veikšanu starp TK līmeņiem ZAP-70+ un ZAP-70– apakšgrupās datu no citiem zinātniskiem darbiem nav.

Pēc M. Halleka (*M. Hallek*) (1999) domām, ķīmijterapija palēnina audzēja klonu šūnu aktīvu dalīšanās procesu, un attiecīgi samazinās TK līmenis [76]. Līdzīgs rezultāts ir iegūts arī mūsu pētījumā. TK līmeņa analīze dinamikā parādīja pētāmā marķiera samazinājumu. Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu mēnešu ķīmijterapija samazina TK līmeni hroniskas limfoleikozes pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $1557,0 \pm 213,70$ ng/l pret $2821,0 \pm 374,70$ ng/l ($p = 0,0001$). Savukārt 12 mēnešu terapija arī ticami samazina TK līmeni, taču ar mazāku ticamību nekā 6 mēnešu terapija – $1775,0 \pm 312,40$ ng/l pret $2821,0 \pm 374,70$ ng/l ($p = 0,02$).

Iegūtie rezultāti liecina, ka pēc 12 mēnešiem TK līmenis paaugstinās, salīdzinot ar 6 mēnešu kontroli. Izmantojot dažādus terapijas variantus un vērtējot TK līmeņa izmaiņas, iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfoleikozi bez terapijas, ar leikerāna terapiju, fludarabīnu saturošai 6 un 12 mēnešu terapijai ir tendence samazināt TK koncentrāciju, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem.

Tomēr, 6 mēnešu fludarabīnu saturoša terapija, bet ar lielāku ticamību 12 mēnešu terapija, ticami samazina TK koncentrāciju, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem, respektīvi, $843,3 \pm 249,7$ ng/l pret $4861,0 \pm 1815,0$ ng/l ($p = 0,049$) un $597,0 \pm 267,4$ ng/l pret $4861,0 \pm 1815,0$ ng/l ($p = 0,045$).

Fludarabīnu nesaturošai 6 un 12 mēnešu terapijai ir tendence palielināt TK koncentrāciju, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem. Pēc B. Simonsona (*B. Simonsson*) (1985) [160], kurš viens no pirmajiem aprakstīja TK līmeņa izmaiņas, domām, un pēc tādu autoru kā M. Halleks (*M. Hallek*) (1996) [77] viedokļa, turpmākajos darbos, TK līmeņa izmaiņas var būt svarīga informācija ārstēšanas rezultātu vērtēšanā. Pie šāda secinājuma autors nonāca, izanalizējot 113 pacientus dažādās slimības stadijās.

9. SECINĀJUMI

1. ZAP-70 līmeni hroniskas limfoleikozes diagnosticēšanas brīdī var lietot ļaundabīga audzēja izplatības noteikšanai, jo ZAP-70 līmenis korelē ar stadiju ($p < 0,05$) un ZAP-70– pozitīvajiem slimniekiem ar lielāku diferencēšanās marķieru CD19 un CD20 ($p < 0,05$), CD5 ($p < 0,01$), CD23 ($p < 0,05$), CD25 ($p < 0,05$) un CD38 ($p < 0,05$) ekspresijas pakāpi un ZAP-70–negatīviem slimniekiem ar mazāku absolūto limfocītu skaitu ($p < 0,05$).

2. ZAP-70– negatīviem slimniekiem ZAP-70 var lietot kā terapijas sākšanas prognozēšanas marķieri, jo šajā grupā ir ilgāks limfocītu dubultošanās laiks ($p < 0,05$), bet nevar lietot kontrolei dinamiskā terapijas laikā.

3. Timidīnkināzi hroniskas limfoleikozes diagnosticēšanas brīdī var lietot ļaundabīgā audzēja izplatības noteikšanai, jo TK līmenis ir lielāks, jo lielāka slimības stadija ($p < 0,0001$), lielāks liesas USG izmērs ($p < 0,015$) un lielāks maksimālā limfmezgla diametrs ($p < 0,02$).

4. Timidīnkināzes kontroli dinamiskā var lietot hroniskas limfoleikozes terapijas monitorēšanai ZAP-70– negatīviem slimniekiem pēc 6 mēnešu ($p < 0,02$) un 12 mēnešu ($p < 0,01$) terapijas un slimniekiem, kas saņem ķīmijterapiju ar fludarabīnu saturošām shēmām – gan pēc 6 mēnešu ($p < 0,049$), gan 12 mēnešu ($p < 0,045$) terapijas.

5. CD38 % skaitu hroniskas limfoleikozes diagnosticēšanas brīdī var lietot ļaundabīgā audzēja izplatības noteikšanai, jo CD38 % līmenis korelē ar slimības stadiju, tas palielinās, CD 38% sastāvs pieaug.

6. CD38 % skaitu var lietot terapijas kontrolei, jo tas palielinās gan pēc 6 mēnešu ($p < 0,03$), gan 12 mēnešu ($p < 0,0001$) terapijas, īpaši tas izteikts terapijas gadījumā ar fludarabīnu nesaturošām shēmām.

7. LDH hroniskas limfoleikozes diagnosticēšanas brīdī var lietot ļaundabīgā audzēja izplatības noteikšanai, jo LDH līmenis ir lielāks lielākas slimības stadijas ($p < 0,006$), lielāka liesas USG izmēra ($p < 0,014$) un lielāka maksimālā limfmezgla diametra gadījumā ($p < 0,056$).

8. LDH dinamiku hroniskas limfoleikozes terapijas laikā nevar lietot kā kontroles rādītāju.

9. β_2 mikroglobulīna līmeni hroniskas limfoleikozes diagnosticēšanas brīdī var lietot ļaundabīga audzēja izplatības noteikšanai, jo β_2 MG ir lielāks lielākas stadijas

gadījumā ($p < 0,009$), lielāka liesas USG izmēra ($p < 0,05$) un lielāka maksimālā limfmezglu diametra ($p < 0,0035$) gadījumā.

10. Hroniskas limfoleikozes slimnieku ārstēšanas ar fludarabīnu saturošām shēmām laikā β_2 MG var lietot terapijas efektivitātes kontrolei, jo tas pārliecinoši mazinās pēc 12 mēnešu ārstēšanas ($p < 0,02$) – gan ZAP-70– pozitīvā, gan ZAP-70– negatīvā apakšgrupā.

10. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Hroniskas limfoleikozes diagnostikas brīdī jānosaka ZAP-70, TK, CD38, LDH un β_2 MG, jo šie rādītāji korelē ar audzēja izplatību un stadiju.

2. Hroniskas limfoleikozes terapijas kontrolei dinamikā var lietot TK un β_2 MG samazināšanos, CD38 % palielināšanos, kā arī ZAP-70– negatīviem slimniekiem fludarabīnu saturošas terapijas kontroles dinamikai.

11. AR TĒMU SAISTĪTĀS PUBLIKĀCIJAS

11.1. Publikācijas zinātnisko rakstu krājumā

1. **Rivkina A.**, Vitols G., Murovska M., Lejniece S. Identifying the stage of new CLL patients using TK, ZAP-70, CD38 levels. *Exp Oncol.* 2011 Jun; 33(2):99-103.PMID 21716207.
2. Vidmane-Ozola I., Boka V., Tsunskis E., Leynietse S., **Rivkina A.**, Kalnihnsh I. Experience of laparoscopy application in the treatment of the patients, suffering hematological diseases in Latvia. *Клінічна хірургія.* 2012. № 3 (29): УДК 616.15:616-072.1-089.819.
3. **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Udre I. ZAP-70, CD38 and Beta-2-microglobulin in CLL patients, first diagnosed in 2007. Riga Stradins University, Collection of Scientific Papers 2008, Riga, Latvia, 2008; 83-87.
4. **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Vitols G., Udre I. Levels of Thymidin Kinase in blood of primery patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia diagnosed in 2007. Riga Stradins University, Collection of Scientific Papers 2008, Riga, Latvia, 2008; 80-82.
5. **Rivkina A.**, Murovska M., Vitols G., Lejniece S. The Thymidine Kinase's Level Correlation with Different Clinical Parametrs of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. Riga Stradins University, Collection of Scientific Papers 2010, Riga, Latvia, 2010; 29-34.
6. Holodnuka I., Kozireva S., **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Imreh S. Transcription of B-cell Surfece Chemokine Receptors CCR1 and CCR2 in EBV-negative Malignant and EBV-positive Non-malignant B-cell Lines. Riga Stradins University, Collection of Scientific Papers 2010, Latvia, 2010; 122-127.
7. Spaks A., Birkenfelde R., Spaka I., **Rivkina A.**, Upmane M., Sasoveca I., Lejniece S., Kalnina V., Holodnuka I. Presence of HHV-6A, HHV-6B and EBV DNA in pereferal blood of primary Chronic lymphocytic leukemia patients and its influence on B-cell subpopulation profile. Riga Stradins University, August Kirchenstein institute of microbiology and virology, workshop. Immunomodulating human herpesviruses and their role in human pathologies, Collection of Scientific Papers 2011, Riga, Latvia, October 13-14, 2011; 30-35.

8. Kholodnyuk I., Kozireva S., **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Imreh S. Transcription of C-CLL, surface chemokine receptors CCR1 and CCR2 in EBV-positive non-malignant B-CLL lines. Riga Stradins University, 2010 Collection of Scientific Papers, Riga, Latvia, 2010; 122-127.

11.2. Patents

„Hroniskas limfoleikozes variantu prognozēšanas paņēmieni” **Alla Rivkina** (LV), Sandra Lejniece (LV), Aivars Lejnieks (LV). Patenta Nr. 14164, spēkā no 15.02.2010.

11.3. Ziņojumi par darba rezultātiem

1. **Rivkina A.** Diferenciācijas klasteru izmaiņas hroniskas limfoleikozes ārstēšanas gaitā. Latvijas Hematologu asociācijas sēde, Rīga, Latvija, 2008. gada 31. oktobris.

2. **Rivkina A.** ZAP-70 un CD38 – prognostiskie rādītāji hroniskas limfoleikozes gadījumā. Latvijas Hematologu asociācijas sēde, Rīga, Latvija, 2010. gada 26. februāris.

3. **Rivkina A.** Diagnostika ar plūsmas citometrijas palīdzību B šūnu limfoproliferācijas gadījumā. Latvijas Hematologu asociācijas sēde, Rīga, Latvija, 2011. gada 28. oktobris.

11.4. Uztāšanās starptautiskās zinātniskās konferencēs ar mutisku referātu

Rivkina A. Prognostic factors for CLL. 6th Baltic States Haematologist's Congress, Vilnius, Lithuania, May 8-10, 2008.

11.5. Uztāšanās starptautiskās zinātniskās konferencēs ar stenda referātu

1. Kholodnyuk I., Kalnina V., Kozereva S., Piskura I., **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Imrech S., Kashuba E. Expression of chemokine receptors CCR1 and CCR2 in B-cell lymphoma cell lines and on CD10-positive B-cells in peripheral blood of patients with B-cell lymphoproliferative disorders. 16th Congress of the European hematology association London, United Kindom, June 9-12. 2011; 0360.
2. **Rivkina A.**, Murovska M., Vitols G., Lejniece S. Dynamic change of serum Thymidin kinase levels in patients with CLL. 15th Congress of the European hematology association Spain, Barcelona, June 10-13. 2010; 1275.
3. **Rivkina A.**, Vitols G., Murovska M., Lejniece S. Determination levels of TK, ZAP 70, CD38 in new cases of CLL. Type I hematology tutorial diagnostic work-up Focus on Acute Malignancies. Cascais, Portugal, November 5–7, 2010; 34.
4. **Rivkina A.**, Murovska M., Vitols G., Lejniece S. Level of timidinkinase in blood of primary patients with chronic lymphocytic leukemia. 6th Baltic States Haematologist's Congres, Vilnius, Lithuania, May 8-10, 2008; 26.
5. **Rivkina A.**, Murovska M., Vitols G., Lejniece S. Levels of thymidin kinase in blood of primary patients with chronic lymphocytic leukaemia diagnosed in 2007. International conference Chronic lymphocytic leukaemia, Barcelona, Spain, 7-9 November, 2008; poster 11.

11.6. Uztāšanās Latvijas mēroga zinātniskās konferencēs ar mutisku referātu

1. **Rivkina A.**, Lejniece S., Ūdre I., Vītols G., Murovska M. Timidīnkināzes koncentrācijas izmaiņas hroniskas limfoleikozes ārstēšanas gaitā. Rīgas Stradiņa universitāte, 2011. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2011. gada 14.–15. aprīlī; 278.
2. **Rivkina A.**, Murovska M., Ūdre I., Lejniece S. ZAP-70 kā nemainīgs prognostiskais rādītājs hroniskas limfoleikozes gadījumā. Rīgas Stradiņa universitāte, 2011. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2011. gada 14.–15. aprīlī; 279.

11.7. Uzstāšanās Latvijas mēroga zinātniskās konferencēs ar stenda referātu

1. **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Vītols G., Ūdre I. Timidīnkināzes daudzums asinīs pirmreizējiem hroniskas limfoleikozes slimniekiem. Rīgas Stradiņa universitāte, 2008. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2008. gada, 13.–14. martā; 180.

2. **Rivkina A.**, Murovska M., Ūdre I., Lejniece S. ZAP-70, CD38, B-2 mikroglobulīns kā prognostiskie marķieri pirmreizējiem hroniskas limfoleikozes slimniekiem. Rīgas Stradiņa universitāte, 2008. gada Zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2008. gada, 13.–14. martā; 173.

3. **Rivkina A.**, Murovska M., Ūdre I., Vītols G., Lejniece S. Timidīnkināzes daudzuma izmaiņas dinamikā hroniskas limfoleikozes slimniekiem. Rīgas Stradiņa universitāte 9. zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2010. gada 18.–19. martā; 285.

4. Holodnuka I., Kozireva S., **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Imreh S. Transcription of C-CLL, surface chemokine receptors CCR1 and CCR2 in EBV-negative B-CLL lines. Rīgas Stradiņa universitāte 9. zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2010. gada 18.–19. martā; 288.

5. Piskura I., **Rivkina A.**, Spaks A., Birkenfelde R., Lejniece S., Murovska M., Saulite V., Holodnuka I. Expression of cell surface chemokine receptors CCR1 and CCR2 in B-cell sub-populations of chronic lymphocytic leukemia patients. Rīga Stradins University, 2011 publications of medical research papers, Rīga, Latvia, 2011; 317.

6. **Rivkina A.**, Lejniece S., Murovska M., Vītols G., Ūdre I. Timidīnkināzes daudzums asinīs pirmreizējiem hroniskas limfoleikozes slimniekiem. Rīgas Stradiņa universitāte, 2008. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2008. gada 13.– 14. martā; 180.

7. Upmane M., Spaks A., Birkenfelde R., Spaka I., **Rivkina A.**, Sasoveca I., Kalnina V., Kholodnyuk I., Lijniece S. Changes in Circulating B-cell Subset Profile Associated with the Presence of Human Herpes Virus 6 (HHV-6) DNA in Blood of Primary Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Patients. Rīgas Stradiņa universitāte, 2012. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2012. gada 29.– 30. martā; 289.

12. PATIECĪBAS

Autore izsaka pateicību: savai ģimenei par iejūtību, sapratni, mīlestību un neatsveramo milzīgo palīdzību. Promocijas darba vadītājai profesorei Sandrai Lejniecei par neizsīkstošo enerģiju, padomiem un idejām promocijas darba tapšanā. Profesoram Uldim Teibem par konsultācijām un atbalstu pētījuma rezultātu izstrādē. RSU zinātņu prorektorei profesorei Ivetai Ozolantai un zinātniskajai sekretārei Ingrīdai Kreilei par sniegto atbalstu un padomiem. Recenzentiem – profesorei Ludmilai Vīksnai, profesorei Aijai Žilevičai un profesorei Jekaterinai Zujevai. Ingunai Mīlgrāvei par literārās valodas labskanību. Hematoloģijas centra kolēģiem – maniem skolotājiem par izpratni un atbalstu.

13. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Anastasi J., Le Beau M. M., Vardiman J. W. et al. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cell: a simple and sensitive method. *Blood* 1992; 79: 1796–1801.
2. Anether G., Tinhofer I., Senfter M. et al. Tetrocarcin-A-induced ER stress mediates apoptosis in B-CLL cells via a Bcl-2--independent pathway. *Blood* 2003; 101(11): 4561–4568.
3. Aman P., Mellstedt H. The leukemic B-cell population of patients with monoclonal lymphocytosis of undetermined significance (MLUS) are functionally distinct from the chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) derived cell population. *Leuk. Res* 1991; 15: 715–719.
4. d'Arena G., di Renzo N., Brugiattelli M. et al. Biological and clinical heterogeneity of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 223–228.
5. Arif M., Tanaka K., Asou H. et al. Independent clones of trisomy 12 and retinoblastoma gene deletion in Japanese B cell chronic lymphocytic leukemia, detected by fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* 1995; 9: 1822–1827.
6. Arp E. W. Jr., Wolf P. H., Checkoway H. Lymphocytic leukemia and exposure to benzene and other solvents in the rubber industry. *J. Occup. Med* 1983; 25: 598–602.
7. Bakke A. C., Purtzer Z., Leis J., Huang J. A robust ratio metric method for analysis of Zap-70 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL) *Cytometry B Clin Cytom.* 2006; 70: 227–234.
8. O'Brian S. Clinical challenges in chronic lymphocytic leukemia *Semin. Hematol.* 1998; 35 (3): 22–26.
9. Binet J.L., Auquier A., Dighicco G. et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198–206.
10. Bizzozero O. J. Jr, Johnson K. G, Ciocco A. et al. Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-1964. *Ann. Intern. Med* 1967; 55: 522-530.
11. Van Bockstaele F., Verhasselt B., Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev.* 2009; 23: 25–47.

12. Buhl A. M., Jurlander J., Geisler C. H., Pedersen L. B., Andersen M. K. et al. CLLU1 expression levels predict time to initiation of therapy and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol.* 2006; 76: 455–464.
13. Byrd J. C., Gribben J. G., Peterson B. L., Grever M. R., Lozanski G., Lucas D. M. et al. Select high-risk genetic features predict earlier progression after chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk-adapted therapy. *J Clin Oncol.* 2006; 24(3): 437–43.
14. Byrd J. C., Kanti R., Sausville E. A. et al. Old and new therapies in chronic lymphatic leukemia: now is the time for a reassessment of therapeutic goals. *Semin. Oncol.* 1998; 25: 65–74.
15. Byrd J. C., Lucas D. M., Mone A. P. et al. KRN5500: a novel therapeutic agent with in vitro activity against human B-cell chronic lymphocytic leukemia cells mediates cytotoxicity via the intrinsic pathway of apoptosis. *Blood* 2003; 101 (11): 4547–4550.
16. Caligaris-Cappio F., Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J. Clin. Oncol.* 2008; 26 (27): 4497–4503.
17. Calissano C., Damle R. N., Hayes G. et al. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 4832–4842.
18. Callea V., Morabito F., Oliva B. M. et al. Surface CD14 positivity in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to clinical outcome. *Br. J. Haematol.* 1999; 107: 347–352.
19. Cartron G., Dacheux L., Salles G. et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc RIIIa gene. *Blood* 2002; 99: 754–758.
20. 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.
21. Catovsky D., Yuille M., Houlston R. The search for genetic clues. *Hematol. Cell. Ther.* 1997; 39: 53–102.
22. Catovsky D., Matutes E., Dearden C., Osuji N., Brito-Babapulle V. The WHO classification of mature T-cell leukemias. *Blood.* 2004 Nov 1; 104 (9): 2989-90; author reply 2990.

23. Catovsky D. The changing face of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2007 Dec; 48 (12): 2283–4.
24. Chang C. C., Liu C. Z., Cleveland R. P. Relative importance of CD38 expression over myeloid-associated markers expression in predicting the clinical course of B-CLL patients. *Leuk. Lymphoma* 2003; 44 (6): 977–82.
25. Chen L., Widhopf G., Huynh L. et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 4609–4614.
26. Cheson B. D. Hematologic malignancies: new developments and future treatments. *Semin. Hematol* 2002; 4 (13): 33–45.
27. Cheson B. D. Infectious and immunosuppressive complications of PA therapy. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13: 2431–2448.
28. Cheson B. D. Perspectives on purine analogues. *Hematol. Cell. Ther* 1996; 38 (3): 109–116.
29. Cheson B. D. Abeloff M. D., Armitage J. O., Lichter A. S. et al., eds. *Clinical Oncology, Chronic lymphoid leukemias* 1st ed, NY: Churchill Livingstone Inc. 1995; 1999–2022.
30. Cheson B. D., Bennett J. M., Kay N. et al. National Cancer Institute-Sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 12: 4990–4997.
31. Chevallier P., Penther D., Avet-Loiseau H. et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* 2002; 116: 142–150.
32. Clendenin N. J., Nethersell A., Scott J. E. et al. Phase I/II trials of CAMPATH-1 H, a humanized anti-lymphocytic monoclonal antibody in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1992; 80 (1): 158.
33. Conley C. L., Misiti J., Laster A. J. Genetic factors predisposing to chronic lymphocytic leukemia and to autoimmune disease. *Medicine* 1980; 5: 323–334.
34. Cordingley F. T., Bianchi A., Hoffbrand A. V. et al. Tumor necrosis factor as an autocrine tumor growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1988; 1: 969–971.
35. Cuttner J. Increased incidence of hematological malignancies in first-degree relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer. Invest.* 1992; 10: 103–109.

36. Crespo M., Bosch F., Villamor N. et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1764–1775.
37. Cuneo A., Roberti M. G., Bigoni R. et al. Four novel non-random chromosome rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: 6p 24-25 and 12p 12-13 translocations, 4q21 anomalies and monosomy 21. *Br. J. Haematol.* 2000; 108: 559–564.
38. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia- an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood.* 1967; 29 (suppl.): 566–584.
39. Damle R. N., Temburni S., Calissano C., Yancopoulos S., Banapour T., Sison C. et al. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood.* 2007; 110 (9): 3352–3359.
40. Damle R. N., Wasil T., Fais F. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840–1847.
41. Deaglio S., Vaisitti T., Aydin S., Bergui L., D'Arena G., Bonello L. et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007; 110 (12): 4012–4021.
42. Delgado J., Pratt G., Phillips N., Briones J., Fegan C., Nomdedeu J. et al. Beta 2 microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia if adjusted according to glomerular filtration rate. *Br J Haematol.* 2009; 145 (6): 801–805.
43. Desablens B., Capiod J. C., Gouilleaux V. Are sCD23, sCD25, LDH and beta-2 microglobulin effecient to evaluate prognosis of B-CLL? *Br J Haematol* 1998; 102 (suppl 1): 194a.
44. Diehl L. F., Ketchum L. H. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin. Oncol.* 1998; 25: 80–97.
45. Dighiero G. Is chronic lymphocytic leukemia one disease? *Haematologica* 2002; 87: 31–33.
46. Dighiero G. Biology of the neoplastic lymphocyte in B-CLL. *Bailleres Clin. Haematol.* 1993; 6: 807–820.
47. Dighiero G., Maloum K., Desablens B. et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic

Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 1506–1514.

48. Dighiero G., Chevret S., Piquet H. et al. Deferred versus early therapy with chlorambucil in stages A CLL patients. Long-term results from two randomized trials of the French Cooperative Group on CLL. Proceedings of the 38 Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 5-8 1997. San Diego, California, Abstract 2572.

49. Dohner H., Fischer K., Bentz M. et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-responders to therapy with PAs in chronic B-ccll leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580–1589.

50. Dohner H., Stilgenbauer S., James M. R. et al. Ilq deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89: 2516–2522.

51. Dohner H., Stilgenbauer S. Risk classification of chronic lymphocytic leukaemia based on genetics. *EHA-6 Educational Book* 2001: 107–109.

52. Efstathiou S., Tsioulos D., Zacharos I. et al. The prognostic role of CD5 negativity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a case-control study. *Haematologia (Budap.)* 2002; 32: 209–218.

53. Ellims P. H., Gan T. E., Medley G., Van der Weyden M. B. Prognostic relevance of thymidine kinase isozymes in adult non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1981; 58: 926–930.

54. Ellims P. H., Gan T. E., Van der Weyden M. B. Thymidine kinase isoenzymes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1981; 49: 479–481.

55. Ertault-Daneshpouy M., Noguera M. E., Gisselbrecht C. et al. ZAP-70 protein expression and CD38 positivity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2008; 6(1): 55–63.

56. Inskip P. D., Kleinerman R. A., Stovall M. et al. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma after pelvic radiotherapy for benign disease. *Radiat. Res.* 1993; 135: 108–124.

57. Ivanov D. V., Tyazhelova T. V., Lemonniyer L. A new human gene KCNRG encoding potassium channel regulating protein is a cancerosuppressor gene candidate located in 13q14.3. *FEBS Lett.* 2003; 539: 156–160.

58. Fais F., Ghiotto F., Hashimoto S. et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J. Clin. Invest.* 1998; 102: 1515–1525.

59. Fegan C. Molecular abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Clin. Lab Haematol.* 2001; 23: 139–148.
60. Fegan C., Robinson H., Thompson P. et al. Karyotypic evolution in CLL. Identification of a new sub-group of patients with deletion of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995; 9: 2003–2008.
61. Ferrant A., Michaux J. L., Sokal G. Splenectomy in advanced chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1986; 58: 2130–2135.
62. Finch S. C., Linet M. S. Chronic leukaemias. *Baillieres Clin. Haematol.* 1992; 5: 27–56.
63. Foa R., Giovarelli M., Fierro M. T. et al. Autocrine or paracrine models of cytokine production and utilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 1988; 30: 339–341.
64. Foa R., Massaia M., Cardona S. et al. Production of tumor necrosis factor- α (TNF-6) by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: a possible regulatory role of TNF-6 in the progression of the disease. *Blood* 1990; 76: 393–400.
65. Fourcar M. K. B-cell chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia Knowles D. M. *Neoplastic Hematopathology*, 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2001; 1505–1529.
66. French Cooperative Group on chronic lymphocytic leukemia. Effects on CLB and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (stage A). *Blood* 1990; 1414–1421.
67. Gaidano G., Newcomb E. W., Gong J. Z. et al. Analysis of alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Pathol.* 1994; 144: 1312–1319.
68. Gandhi V., Plunkett W., Rodriguez C. O. et al. Compound GW506U78 in refractory hematologic malignancies: relationship between cellular pharmacokinetics and clinical response. *J Clin Oncol.* 1998; 16 (11): 3607–3615.
69. Del Giudice I., Morilla A., Osuji N., Matutes E., Morilla R., Burford A. et al. Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 2005; 104 (10): 2124–2132.
70. Grever M. R., Lucas D. M., Dewald G. W., Neuberg D. S., Reed J. C., Kitada S. et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup

Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol*. 2007; 25 (7): 799–804.

71. Gibbs G., Bromidge T., Howe D., Hopkins J., Johnson S. Comparison of flow cytometric methods for the measurement of ZAP-70 expression in a routine diagnostic laboratory. *Clin Lab Haematol*. 2005; 27: 258–266.

72. Green M. H., Dalager N. A., Lamberg S. I., Argyropoulos C. E., Jr Fraumeni J. F. Mycosis fungoides. Epidemiologic observations. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 597-606.

73. Gronowitz J. S., Hagberg H., Kallander C. F., Simonsson B. The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Cancer* 1983; 47: 487–495

74. Gronowitz J. S., Kallander F. R., Diberholm H., Hagberg H., Pettersson U. Application of an in vitro assay for serum thymidine kinase: results on viral disease and malignancies in humans. *Int J. Cancer* 1984; 33: 5–12.

75. Hallek M., Cheson B. D., Catovsky D. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 Guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446–5456.

76. Hallek M., Langenmayer I., Nerl C. et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93: 1732–1737.

77. Hallek M., Wanders L., Ostwald M., Busch R., Senekowitsch R., Stern S., Schick H. D., Kuhn-Hallek I., Emmerich B. Serum beta (2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996; 22: 439–447.

78. Hallek M., Wanders L., Strohmeyer S., Emmerich B. Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol*. 1992; 65: 1–5.

79. Hamblin T. J., Davis Z., Gardiner A. et al. Unmutated immunoglobulin VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848–1854.

80. Hamblin T. J., Davis Z., Oscier D. G. et al. In chronic lymphocytic leukemias germline configuration of immunoglobulin heavy chain genes is associated with a more aggressive form of the disease. *Blood* 1998; 92 (1): 515a.

81. Hamblin T. J., Orchard J. A., Ibbotson R. E. et al. CD38 expression and

immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99: 1023–1029.

82. Hamblin T. J., Orchard J. A., Gardiner A., Oscier D. G., Davis Z., Stevenson F. K. Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL. *Blood* 2000; 95: 2455–2456.

83. Han T., Ezdinli E. Z., Shiimaoka K. et al. CLB versus combined CLB-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1973; 31: 502–508.

84. Hannigan B. M., Barnett Y. A., Armstrong D. B., McKelvey-Martin V. J., McKenna P. G. Thymidine kinases: the enzymes and their clinical usefulness. *Cancer Biother.* 1993; 8: 189–197.

85. Haslinger C., Schweifer N., Stilgenbauer S. et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22 (19): 3937–3949.

86. He Q., Fornander T., Johansson H., Johansson U., Hu G. Z., Rutqvist L. E., Skog S. Thymidine kinase 1: a proliferation marker for determining prognosis and monitoring the surgical outcome of primary bladder carcinoma patients. *Anticancer Res.* 2006 Nov-Dec; 26 (6C): 4753–4759.

87. Hein T., Schering A. G. CLL epidemiological data. European key countries. Berlin 2001: 38.

88. Henry I. B. Clinical Diagnosis and Managment by Laboratory Methods, 1996.

89. Horwitz M., Goode E. L., Jarvik G. P. Anticipation in familial leukemia. *Am. J. Hum.Genet.* 1996; 59: 990–998.

90. Hus I., Podhorecka M., Bojarska-Junak A., Rolinski J., Schmitt M., Sieklucka M., Wasik-Szczepanek E., Dmoszynska A. The clinical significance of ZAP-70 and CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Annals of Oncology* 17: 2006; 683–690.

91. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M. J. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J. Clin.* 2009; 59: 225–249.

92. Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M. Cancer statistics 2002; *CA. Cancer J. Clin.* 2002; 52: 23–47.

93. Jetinek D. F., Tschumper R. C., Geyer S. M. et al. Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical

outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 854–861.

94. Jewell A. P. Role of apoptosis in the pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Biomed. Sci.* 2002; 59 (4): 235–238.

95. Johansson M., Brismar S., Karlsson A. Human deoxycytidine kinase is located in the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11941–11945.

96. Kater A. P., van Oers M. H. Chronic lymphocytic leukemia: high time for a risk-adapted approach. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 2003; 147: 104–109.

97. Kay N. E., Hamblin T. J., Jelinek D. F. et al. Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*. 2002: 193–213.

98. Kalil N., Cheson B. D. Chronic lymphocytic leukaemia. *The oncologist*. 1999; 4: 352–369.

99. Kalil N., Cheson B. D. Management of chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs Aging*. 2000; 16: 9–27.

100. Kallander C. F., Simonsson B., Hagberg H. et al. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984; 54: 2450–2455.

101. Keating M. J., Lerner S., Kantarjian H., Freireich E. J., O'Brien S. The serum B2-microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 86 (suppl 1): 606a.

102. Keating M. J., Flinn I., Jain V., Binet J. L. et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 2002; 99 (10): 3554–3561.

103. Keating M. J., Chiorazzi N., Messmer B. et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program Review* 2003: 153–175.

104. Khouri I. F., Przepiorka D., Van B. K. et al. Allogenic blood or marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia: timing of transplantation and potential effect of fludarabine on acute graft-versus-host disease. *Br. J. Haematol.* 1997; 97: 466.

105. Kimby E., Mellstedt H., Bjorkholm M., Holm G. Clonal cell surface structures related to differentiation, activation and homing in B-cell chronic lymphocytic leukemia and monoclonal lymphocytosis of undetermined significance. *Eur. J. Haematol.* 1989; 43: 452–459.

106. Kipps T. J., Cantwell M., Sharma S. et al. Gene therapy of chronic

lymphocytic leukemia. *Hematol. Cell. Ther.* 1997; 39: 62-63.

107. Klein U., Tu Y., Stolovitzky G. A. et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194 (11): 1625–1638.

108. Knauf W. U., Langenmayer I., Ehlers B., Mohr B., Adorf D., Nerl C. H., Hallek M., Zwingers T. H., Emmerich B., Thiel E. Serum levels of soluble CD23, but not soluble CD25, predict disease progression in early stage B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1997 Nov; 27 (5–6): 523–532.

109. Konoplev S. N., Fritsche H. A., O'Brien S., Wierda W.G., Keating M. J., Gornet T.G., St Romain S., Wang X., Inamdar K., Johnson M. R., Medeiros L. J., Bueso-Ramos C. E. High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J. Clin Pathol.* 2010; 134 (3): 472–477.

110. Krober A., Bloehdorn J., Hafner S. et al. Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3–21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin Oncol.* 2006; 24: 969–975.

111. Kryachok I. A., Bebeshko V. G. Contemporary approaches to chronic lymphocytic leukemia treatment: possibilities and perspectives. *Ukr. Med. J.* 2003; 4 (36): 5–20.

112. McLaughlin P., Grillo-Lopez A., Link B. et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 2825–2833.

113. Letestu R., Lévy V., Eclache V., Baran-Marszak F., Vaur D., Naguib D., Schischmanoff O., Katsahian S., Nguyen-Khac F., Davi F., Merle-Béral H., Troussard X., Ajchenbaum-Cymbalista F. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood* 2010; 116 (22): 4588–4590.

114. Leupin N., Cenni B., Novak T. J. et al. Disparate expression of the PTEN gene: a novel finding in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Br. J. Haematol.* 2003; 121: 97–100.

115. Li H. X., Lei D. S., Wang X. Q., Skog S., He Q. Serum thymidine kinase levels are elevated and exhibit diurnal variations in patients with advanced ovarian cancer. *Oncol. Rep.* 2005 Jan; 13 (1): 145–149.

116. Lichter P., Bentz M., Joos S. Detection of chromosomal aberrations by means of molecular cytogenetics: painting of chromosomes and chromosomal subregions and comparative genomic hybridization. *Methods Enzymol.* 1995; 254: 334-359.
117. Linet M. S., Blattner W. A. The epidemiology of chronic lymphocytic leukemia. In: Pollack A, Catovsky D, eds. *Chronic Lymphocytic Leukemia*. Switzerland: Harwood Academic Publishers. 1988: 11.
118. Liu Y., Corcoran M., Rasool O. et al. Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14 frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene.* 1997; 15: 2463-2473.
119. Magnac C., Porcher R., Davi F., Nataf J., Payelle-Brogard B., Tang R. P., Oppezio P., Levy V., Dighiero G., Ajchenbaum-Cymbalista F. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia.* 2000; 17: 133-137.
120. Mainou-Fowler T., Dignum H., Taylor P. R. et al. Quantification improves the prognostic value of CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2002; 118: 755-761.
121. Malhotra P., Hogan W. J., Litzow M. R. et al. Long-term outcome of allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: analysis after a minimum follow-up of 5 years. *Leuk Lymphoma* 2000; 49 (9): 1724-1730.
122. Malone K. E., Koepsell T. D, Daling J. R. et al. Chronic lymphocytic leukemia in relation to chemical exposures. *Am. J. Epidemiol.* 1989; 130: 1152-1158.
123. Masdehors P., Merle-Aéral H., Magdelénat H. et al. Ubiquitin-proteasome system and increased sensitivity of B-CLL lymphocytes to apoptotic death activation. *Leuk Lymphoma* 2000; 38 (5-6): 499-504.
124. Matthews C., Catherwood M. A., Morris T. C. M., Kettle P. J., Drake M. B., Gilmore W. S., Aleksander H. D. Serum TK levels in CLL identify Binet stage A patients within biologically defined prognostic subgroups most likely to undergo disease progression. *Eur. J. Haematol.* 2006; 77: 309-317.
125. Meuleman N., Stamatopoulos B., Dejenneff M., El Housni H., Lagneaux L. et al. Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia.* 2008; 22: 1882-1890.
126. Molica S., Levato D., Cascavilla N., Levato L., Musto P. Clinico-

prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and B2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999; 62: 117–122.

127. Molica S., Digiesi G., Battaglia C., Cutrona G., Antenucci A., Molica M., Giannarelli D., Sperduti I., Gentile M., Morabito F., Ferrarini M. Baff serum level predicts time to first treatment in early chronic lymphocytic leukemia. *Eur J. Haematol.* 2010; 85 (4): 314–320.

128. Montillo M., Schinkoethe T., Elter T. Eradication of minimal residual disease with alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) patients: the need for a standard method of detection and the potential impact of bone marrow clearance on disease outcome. *Cancer Invest.* 2005; 23: 488–496.

129. Montserrat E., Gomis F., Vallespi T. et al. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in young adults. *Blood.* 1991; 78: 1545-1551.

130. Montserrat E., Sanchez-Bisono J., Vinolas N., Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br. J. Haematol.* 1986; 62 (3): 567–575.

131. Montserrat E., Vinolas N., Reverer J. C. et al. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and prognosis of early stages. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 1988; 30: 359–361.

132. Morabito F., Cutrona G., Gentile M., Matis S., Todoerti K., Colombo M. et al. Definition of progression risk based on combinations of cellular and molecular markers in patients with Binet stage A chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2009; 146 (1): 44–53.

133. Morilla A., Gonzalez de Castro D., Del Giudice I., Osuji N., Else M., Morilla R. et al. Combinations of ZAP-70, CD38 and IGHV mutational status as predictors of time to first treatment in CLL. *Leuk Lymphoma.* 2008; 49 (11): 2108–2115.

134. Mould S., Gardiner A., Corcoran M. et al. Trisomy 12 and structural abnormalities of 13q14 occurring in the same clone in chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* 1996; 92: 389–392.

135. Nikitin E. A., Lorie Y. Y. et al. Negative prognostic factors in CLL-patients: retrospective analysis of 206 cases. *Ter. archive.* 2003; 7: 38–47.

136. Nikitin E. A., Malaho S. G. et al. Moleculo-biologic prognostic factors in

B-cell CLL. *Mod. Oncol.* 2006; 8 (1): 23-26.

137. Oscier D. G., Thompsett A., Zhu D., Stevenson F. K. Differential rates of somatic hypermutation in V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukemia defined by chromosomal abnormalities. *Blood.* 1997; 89: 4153–4160.

138. Parrens M., Sawan B. et al. Primary digestive Richter's syndrome. *Mod Pathol.* 2001; 14: 452–457.

139. Patten P. E., Buggins A. G., Richards J., Wotherspoon A., Salisbury J., Mufti G. J. et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukaemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood.* 2008; 111 (10): 5173–5181.

140. Pernthaler A., Jpernthaler J., Amann R. et al. Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Appl. and Env. Microbiology.* 2002; 68: 3094–3101.

141. Del Principe M. I., Del Poeta G., Buccisano F. et al. Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 108: 853–861.

142. Rai K. R., Patel D. V. Chronic lymphoid leukemias/Abeloff M. D., Armitage J. O., Lichter A. S. et al., eds. *Clinical Oncology*, 1st ed, NY: Churchill Livingstone Inc., 1995: 1308-1322.

143. Rai K. R., Peterson B. L., Appelbaum F. R. et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343: 1750–1757.

144. Rai K. R., Sawitsky A., Cronkite E. P. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219–234.

145. di Raimondo F., Albitar M., Huh Y. et al. The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer* 2002; 94: 1721–1730.

146. Ramkissoon Y. D., Lee R. W., Malik R. et al. Bilateral infiltrative disease of the extraocular muscles: a rare clinical presentation of early stage chronic lymphocytic leukemia. *Orbit.* 2008; 27 (4): 293–295.

147. Raphael B., Andersen J. W., Silver R. et al. Comparison of CLB and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow up of Eastern Cooperative Oncology Group randomized clinical trial. *J. Clin. Oncology* 1990; 9: 770–776.

148. Rassenti L. Z., Huynh L., Toy T. L. et al. ZAP-70 compared with

immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 893–901.

149. Rassenti L. Z., Jain S., Keating M. J., Wierda W. G., Grever M. R., Byrd J. C. et al. Relative value of ZAP-70, CD38 and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 112 (5): 1923–1930.

150. Reed J. C. Bcl-2 family proteins in deregulation of apoptosis and chemoresistance in B-CLL. *Hematol. Cell. Ther.* 1997; 39: 822–824.

151. Reed J. C. Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.* 1998; 25: 11–18.

152. Robertson L. E., Pugh W., O'Brien S. et al. Richter's syndrome: a report on 39 patients. *J. Clin. Oncol.* 1993; 1: 1985–1989.

153. Rosenwald A., Alizadeh A. A., Widhopf G. et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 1639–1647.

154. Rozman C., Montserrat E. Current concepts: chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. Med.* 1995; 333: 1052–1057.

155. Sah S. P., Matutes E., Wotherspoon A. C. et al. A comparison of flow cytometry, bone marrow biopsy, and bone marrow aspirates in the detection of lymphoid infiltration in B cell disorders. *J. Clin. Pathol.* 2003; 56: 129–132.

156. Seiler T., Dohner H., Stilgenbauer S. Risk stratification in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Sem. Oncol.* 2006; 33: 186–194.

157. Shanafelt T. D., Jenkins G., Call T. G. et al. Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2009; 115: 363–372.

158. Shustik C., Mick R., Siver R. et al. Treatment of early chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 1506–1514.

159. Sieben V. J., Debes-Marun C. S., Pilarski P. M. et al. FISH and chips: chromosomal analysis on microfluidic platforms. *IET Nanobiotechnology* 2007; 1 (3): 27–35.

160. Simonsson B., Kallander C. F., Brenning G., Killader A., Ahre A., Gronowitz J. S. Evaluation of serum deoxythymidine kinase as a marker in multiple myeloma. *Br. J. Haematol* 1985; 61: 215–224.

161. Solomou E. E., Sfrikakis P. P., Kotsi P. et al. 2003 13q deletion in chronic

lymphocytic leukemia: characterization of E4.5, a novel chromosome condensation regulator-like guanine nucleotide exchange factor. *Leuk. Lymphoma* 2003; 44 (9): 1579–1585.

162. Sossey-Alaoui K., Kitamura E., Head K. et al. Characterization of FAM10A4, a member of the ST13 tumor suppressor gene family that maps to the 13q14. 3 region associated with B-cell leukemia, multiple myeloma, and prostate cancer. *Genomics* 2002; 80 (1): 5–7.

163. Spellerberg M. B., Zhu D., Thompsett A. et al. DNA vaccines against B-cell tumours. *Hematol. Cell. Ther.* 1997; 39: 62.

164. Stamatopoulos K., Belessi C., Moreno C., Boudjograh M., Guida G., Smilevska T. et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007; 109 (1): 259–270.

165. Stamatopoulos B., Meuleman N., Haibe-Kains B., Duvillier H, Massy M. et al. Quantification of ZAP70 mRNA in B cells by real-time PCR is a powerful prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chem*. 2007; 53: 1757–1766.

166. Stamatopoulos B., Haibe-Kains B., Equeter C., Meuleman N., Soree A. et al. Gene expression profiling reveals differences in microenvironment interaction between patients with chronic lymphocytic leukemia expressing high versus low ZAP70 mRNA. *Haematologica*. 2009; 94: 790–799.

167. Sthoeger Z. M., Sthoeger D., Shtalrid M. et al. Mechanism of autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* 1993; 43: 259–264.

168. Stilgenbauer S., Dohner K., Bentz M. et al. Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Ann. Hematol.* 1998; 76: 101–110.

169. Stilgenbauer S., Kröber A., Busch R. et al. 17p deletion predicts for inferior overall survival after fludarabine-based first line therapy in chronic lymphocytic leukemia: first analysis of genetics in the CLL4 trial of the GCLLSG. *Blood*. 2005; 106: abstract 715.

170. Svobodova S., Topolcan O., Holubec L., Treska V., Sutnar A., Rupert K., Kormunda S., Rousarova M., Finek J. Prognostic importance of thymidine kinase in colorectal and breast cancer. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug; 27 (4A): 1907–1909.

171. Tallman M. S., Hakimian D. Purine nucleoside analogs: emerging roles in indolent lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995; 86: 2463–2474.

172. Thunberg U., Johnson A., Roos G., Thorn I., Tobin G., Sallstrom J., Sundstrom C., Rosenquist R. CD38 expression is a poor predictor for VH gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 97: 1892–1893.
173. Tobin G., Thunberg U., Johnson A. et al. Somatically mutated IgV_H 3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 99: 2262–2264.
174. de Toter D., Reato G., Mauro F. et al. IL-4 production and increased CD30 expression by a unique CD8⁺ T-cell subset in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1999; 104: 589–599.
175. Tsimberidou A. M., Tam C., Abruzzo L. V., O'Brien S., Wierda W. G., Lerner S. et al. Chemoimmunotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer*. 2009; 115 (2): 373–380.
176. Vallat L., Magdelilnat H., Merle-Biral H. et al. The resistance of B-CLL cells to DNA damage—induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood* 2003; 101: 4598–4606.
177. Vinolas N., Reverter J.C., Urbano-Ispizua A., Montserrat E., Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: an update of its prognostic significance. *Blood Cells* 1987; 12 (2): 457–470.
178. Vorobyev A. I. *Handbook of Haematology*. Vorobyev A. I. 2nd ed., Moscow: Newdiamed, 2003: 280.
179. Vorobyev A. I. *Handbook of Haematology*. Vorobyev A. I. 3rd ed., Moscow: Newdiamed, 2003: 280.
180. Wagner M., Horny M., Damsz H. et al. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*. 2003; 6: 302–309.
181. Wang C., Amato D., Fernandes B. CD5-negative phenotype of monoclonal B-lymphocytosis of undetermined significance (MLUS). *Am. J. Hematol.* 2002; 69: 147–149.
182. Wang C., Amato D., Rabah R. et al. Differentiation of monoclonal B lymphocytosis of undetermined significance (MLUS) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) with weak CD5 expression from CD5(-) CLL. *Leuk. Res.* 2002; 26: 1125–1129.

183. Wierda W. G., Cantwell M. J., Rassenti L. Z. et al. CD154 (CD40-ligand) gene immunization of chronic lymphocytic leukaemia. A phase study. *Blood* 1998; 92: 489a.
184. Wierda W. G., O'Brien S., Wang X., Faderl S., Ferrajoli A. et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007; 109: 4679–4685.
185. Wierda W. G., O'Brien S., Wang X., Faderl S., Ferrajoli A., Do K. A. et al. Characteristics associated with important clinical endpoints in patients with chronic lymphocytic leukaemia at initial treatment. *J.Clin Oncol.* 2009; 27 (10): 1637–1643.
186. Wierda W. G., Kipps T. J., Mayer J. et al. Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 1749–1755.
187. Wiestner A., Rosenwald A., Barry T. S. et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101: 4944–4951.
188. Wood M. E., Bann P. A. *Secrets of Hematology and Oncology*. Tokareva Yu. N., Buhna A. E. eds. Moscow: Binom, 1997: 560.
189. Woods G. S., Weis L. M., Warnke R. A., Sklar J. The immunopathology of cutaneous lymphomas: Immunophenotypic and immunogenotypic characteristics. *Semin. Dermatol.* 1986; 5: 334–345.
190. Xu W., Cao X., Miao K. R., Qiao C., Wu Y. J., Liu Q., Fan L., Li J. Y. Serum thymidine kinase 1 concentration in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia and its correlation with other prognostic factors. *Int J. Hematol.* 2009; 90 (2): 205–211. Epub 2009 Jul 24.
191. Yahnina E. I. et al. Benign form of CLL//Ter. archive. 1997; 69 (7): 11-17.
192. Yavorkovsky L. I., Terebkova Z. F., Nikulshin S. V., Yavorkovsky L. L. B-chronic lymphocytic leukaemia in Latvia: epidemiological aspects. *Eur J. Haematol.* 1993 Oct; 51 (4): 214–217.
193. Zenz T., Fröhling S., Mertens D., Döhner H., Stilgenbauer S. Moving from prognostic to predictive factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2010; 23 (1): 71–84.
194. Zhang J., Jia Q., Zou S., Zhang P., Zhang X., Skog S., Luo P., Zhang W., He Q. Thymidine kinase 1 in serum predict increased risk of distant or loco-regional

recurrence following surgery in patients with early breast cancer. *Oncol. Rep.* 2006 Feb; 15 (2): 455–461.

195. Zinzani P. L., Bendandi M., Magagnoli M. et al. Results of a fludorabine induction and alpha-interferon maintenance protocol in pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Haematol.* 1997; 59: 82–88.

196. Zucchetto A., Bomben R., Dal Bo M., Sonago P., Nanni P. et al. A scoring system based on the expression of six surface molecules allows the identification of three prognostic risk groups in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Cell. Physiol.* 2006; 207: 354–363.

197. Zucker-Franklin D., Pancake B. A. The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I and II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Semin. Dermatol.* 1994; 13: 160–165.

198. Zueva E. E. Immunofenotyping in diagnostics of acute leukemia. *Semin. Oncol.* 1998; 4: 471–478.

199. Zweibel J. A., Cheson B. D. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin. Oncol.* 1998; 25: 42–59.

14. PIELIKUMI

Ētiskie apsvērumi: Pētījuma veikšanai tika saņemta Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauja 2007. gada 22. martā, A-9 (lēmums Nr. 9), un visi slimnieki pētījumam piekrita.

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Rīgā, Baznīcas ielā 25, LV1010

tel. 7043776

fax7043701

22.martā 2007.g. A-9

Lēmums Nr.9

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2007.gada 22. martā izskatīja RAS klīnikas „Linezers” pieteikuma projekta „Hroniskas B-šūnu limfoleikozes prognostiskie faktori” atbilstību bioētikas normām.

Pamatojoties uz Centrālā medicīnas ētikas komitejas 2007. gada 22. marta sēdes protokola Nr. 3 punktu 5, tiek izsniegts atzinums, ka RAS klīnikas „Linezers” pieteikuma projekts „Hroniskas B-šūnu limfoleikozes prognostiskie faktori” atbilst bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas komitejas
priekšsēdētājs



U.Līkops

L.Rudze,7043776

Pacienta informācijas un piekrišanas veidlapa

Pacienta vārds, uzvārds_____

Dzimšanas gads, vieta_____

Adrese_____

Es, apakšā parakstīties/parakstījusies, paziņoju, ka esmu iepazīstināts/iepazīstināta ar pētījuma mērķi un brīvprātīgi piekrītu piedalīties pētījumā „**ZAP-70, TIMIDĪNKINĀZES, CD38, BETA 2 MIKROGLOBULĪNA UN LAKTĀTDEHIDROGENĀZES IZMAIŅAS HRONISKAS LIMFOLEIKOZES SLIMNIEKIEM, TO IETEKME UZ SLIMĪBAS GAITU UN PROGNOZI**” ar asins paraugu nodošanu. Neiebilstu arī pret tālāko manu analīžu kontroli slimības gaitā un izdarīto analīžu un izmeklējumu apkopojumu. Apliecinu, ka esmu ieguvis/ieguvusi pieliekamu informāciju no ārstējošā ārsta un pētnieka par pētījuma mērķi un nozīmi.

Atteikšanās piedalīties pētījumā neietekmēs ārsta attieksmi pret pacientu un viņa ārstēšanu.

Datums

Ārstējošā ārsta uzvārds

Pacienta vārds, uzvārds

Pacienta paraksts

Darba dizains

