



RĪGAS
STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Alla Rivkina

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

Promocijas darba kopsavilkums

Specialitāte – iekšējīgās slimības

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med. profesore Sandra Lejniece

Rīga, 2012

Promocijas darbs izstrādāts: Rīgas Stradiņa universitātes, Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas (RAKUS), Valsts Hematoloģijas centrā (šobrīd Ķīmijterapijas un hematoloģijas klīnika, SIA Rīgas Hematoloģijas Centrs.

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. med., profesore **Sandra Lejniece**

Oficiālie recenzenti:

Dr.habil.med., profesore, Latvijas Zinātņu akadēmijas korespondētājlocekle
Ludmila Vīksna, RSU

Dr.habil.med., profesore, Latvijas Zinātņu akadēmijas korespondētājlocekle
Aija Žileviča, LU

Dr.med., profesore **Jekaterna Zujeva**, Sanktpēterburgas I.P.Pavlova Valsts medicīns unversitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2012.gada „5” novembrī plkst.15.00 Rīgas Stradiņa universitātes Internās medicīnas promocijas padomes atklātajā sēdē Rīgas Stradiņa universitātes Hipokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16, Rīgā.

Ar promocijas darbu var iepazīties Rīgas Stradiņa universitātes bibliotēkā.

Promocijas padomes sekretārs: **Līga Aberberga-Augškalne**

Pētnieciskā darba finansējums un atbalsts



1. ESF Nacionālās programmas „Atbalsts doktorantūras programmu īstenošanai un pēcdoktorantūras pētījumiem” projekta „Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē”. Projekta vienošanās Nr.2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009.

2. IMZ projekts „Zinātniskās darbības attīstība augstākās izglītības iestādē” apakšprojekts „Ļaundabīgo audzēju klīnisko un molekulāro īpatnību izpēte agrīnas diagnostikas un stratēģijas uzlabošanā”, sadaļa „Dažādu bioķīmisko, šūnu, ģenētisko un klīnisko faktoru izpēte hronisku leikožu progresēšanas un rezistences pret ķīmijterapiju apstākļos” (RSU-ZPO7-5/1).

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.

SATURS

Darbā lietotie saīsinājumi	7
1. Ievads	8
2. Darba mērķis	9
3. Darba uzdevumi	9
4. Darba teorētiskais un praktiskais nozīmīgums	10
5. Darba hipotēzes	11
6. Darba novitāte	12
7. Darba struktūra un apjoms	12
8. Materiāli un metodes	13
8.1. Pacienti, klīniskais raksturojums.....	13
8.2. Pacientu dalījums atkarībā no slimības stadijas.....	13
8.3. Pacientu dalījums grupās atkarībā no varianta.....	14
8.4. Hroniskas limfocitozes (HLL) diagnostika.....	14
8.5. Kopējais diagnostiskais apjoms.....	15
8.6. Pacientu klīniskā stāvokļa novērtējums.....	16
8.7. Analīzes.....	16
8.7.1. Asins analīze.....	16
8.7.2. β_2 mikroglobulīna noteikšana.....	17
8.7.3. Laktātdehidrogenāzes (LDH) noteikšana	17
8.7.4. Imūnfenotipēšana	17
8.7.5. ZAP-70 ekspresijas noteikšana.....	18
8.7.6. Timidīnkināzes (TK) līmeņa noteikšana asins serumā.....	18
8.8. Rezultātu statistiskās analīzes metodes.....	19
9. Rezultāti	20
9.1. Asins analīžu rezultāti	20
9.1.1. Leikocītu skaits.....	20

9.1.2.	Limfocītu skaits.....	20
9.1.3.	CD38 daudzums.....	21
9.1.4.	TK daudzums.....	21
9.1.5.	β_2 mikroglobulīna daudzums.....	21
9.1.6.	Laktātdehidrogenāzes daudzums.....	22
9.2.	ZAP-70 daudzums.....	22
9.2.1.	ZAP-70 ekspresijas un citu prognozes faktoru analīze HLL gadījumā	23
9.2.2.	ZAP-70 līmeņa ekspresija ar CD19+/CD5+ šūnām HLL slimniekiem ar dažādiem slimības norises variantiem	23
9.2.3.	HLL standarta prognozes faktoru analīze ar atšķirīgu ZAP- 70 ekspresiju.....	25
9.2.4.	Imūnfenotipisko marķieru ekspresijas vērtējums HLL slimniekiem ar dažādu ZAP-70 ekspresiju.....	26
9.2.5.	CD25 un CD38 aktivācijas marķieru ekspresija dažādās HLL slimnieku grupās ar dažādu ZAP-70 ekspresiju	26
9.2.6.	Korelācija starp ZAP-70 un LDH.....	27
9.2.7.	Korelācija starp ZAP-70 un β_2 MG.....	28
9.2.8.	Korelācija starp ZAP-70 un CD38.....	28
9.2.9.	Korelācija starp ZAP-70 un slimības stadiju.....	29
9.2.10.	Korelācija starp ZAP un TK.....	30
10.	Prognostisko marķieru dinamika terapijas laikā.....	31
10.1.	Terapijas varianti.....	31
10.2.	Leikocītu skaita izmaiņas terapijas laikā.....	33
10.3.	Limfocītu skaita izmaiņas terapijas laikā.....	34
10.4.	β_2 mikroglobulīna līmeņa izmaiņa terapijas laikā.....	34
10.5.	LDH līmeņa izmaiņa terapijas laikā.....	35
10.6.	ZAP-70 līmeņa izmaiņas terapijas laikā.....	35

10.7.	CD38 līmeņa izmaiņas terapijas laikā.....	35
10.8.	TK līmeņa izmaiņas terapijas laikā.....	36
11.	Iegūto rezultātu apspriešana.....	36
12.	Secinājumi	46
13.	Praktiskās rekomendācijas.....	47
14.	Pateicības	48
15.	Ar tēmu saistītās publikācijas	49

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

β_2 MG	-	β_2 mikroglobulīns
CD	-	šūnu virsmas receptors
EDTA	-	etilēnamīdtetraacetātskābe
EGL	-	E.Gulbja laboratorija
ELISA	-	imūnfermentatīvā reakcija
FITC	-	fluoresceīna izotiocināts
HLA	-	cilvēka leikocītu antigēns
HLL	-	hroniska limfoleikoze
LDH	-	laktātdehidrogenāze
NCI	-	Nacionālais vēža institūts
NHL	-	Ne Hodžkina limfoma
NK	-	naturālās galējājšūnas
p	-	varbūtība, būtiskuma līmenis, p vērtība
PBS	-	fosfāta fizioloģiskais buferšķīdrums
PE	-	fikoeritrīns
RAKUS	-	Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca
RSU	-	Rīgas Stradiņa universitāte
T HLL	-	T šūnu hroniska limfoleikoze
TK	-	timidīnkināze
WHO	-	Pasaules Veselības organizācija
ZAP-70	-	zeta asociētā olbaltumviela

1. IEVADS

Hroniskai limfoleikozei (HLL) kā vienai no izplatītākajiem leikozes variantiem mūsdienu hematoloģijā ir veltīta liela uzmanība. Tiek veikti vairāki pētījumi jaunu prognostisko marķieru – tādu kā ZAP-70 un CD154 – atklāšanā. 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. Izmantojamie diagnostiskie kritēriji ir limfocītu daudzums, atipisku šūnu skaits un kaulu smadzeņu infiltrācija. HLL pacientu diagnostikai un kontrolei ārstēšanas procesā izmanto dažādus laboratorijas rādītājus. Plaši izmantojamie no tiem ir laktātdehidrogenāze (LDH), beta 2 mikroglobulīns (β_2 MG), CD19, CD5, CD23 fenotipiskie marķieri. 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.

Ievērojot mūsdienu atklājumu iespējas un laika nosacījumus, HLL problēmas izpētei Latvijā mēs izvēlējamies tādus diagnostiskos parametrus 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 pacientam. Šajā pētījuma Latvijā, pirmo reizi pasaulē ir apskatīti ZAP-70 un TK kopā.

Pēdējo gadu darbos parādīts, 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 vēlinākajās stadijās. 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. Pieejami dati, ka audzēja kлона aktivitātes pieaugšana saistīta ar CD38 marķiera līmeņa paaugstināšanos šūnu virsmā un šo slimības variantu metastazēšanās procesu paātrināšanos.

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 leikocītu 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. 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. 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. 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.

5. DARBA HIPOTĒZES

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

2. Slimniekiem ar II, III un IV stadiju un progresējošo norises variantu TK līmenis ir paaugstinātāks, 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 izskatīts kā nelabvēlīgās prognozes papildkritērijs: ZAP-70 pozitīvas ekspresijas, augsta TK un CD38 līmeņa slimības norises prognoze ir nelabvēlīga.

6. DARBA NOVITĀTE

Uz pētījumos iegūto rezultātu vispārējās 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 pētījuma Latvijā, pirmo reizi pasaulē ir apskatīti ZAP-70 un TK kopā.

7. DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā. Pētījums sastāv no 15 sadaļām: anotācijas, darbā lietotajiem saīsinājumiem, darba aktualitātes, darba mērķa, darba uzdevumiem, izvirzītajām idejām, literatūras apskata, materiāliem un metodēm, diskusijas, secinājumiem, klīniskajām rekomendācijām, slimnieku ārstēšanas un uzraudzības algoritma, darba praktiskās vērtības, zinātniskās novitātes, darba perspektīviem virzieniem, ar promocijas darbu saistītās uzstāšanās, pateicības, literatūras saraksta un pielikumiem. Kopējais darba apjoms ir 133 lappuses, tajā skaitā 53 tabulas un 42 attēli. Pētījumā ietverti 199 literatūras avoti.

8. MATERIĀLI UN METODES

8.1. 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).

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 pacients, 3 pacienti pētījuma laikā nomira – nāves cēlonis progresējoša HLL, 20 pacienti izstājās – cēlonis nav zināms.

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 limfocītu elementu imūnofenotipēšanu.

8.2. Pacientu dalījums atkarībā no slimības stadijas

Pētījumā visi slimnieki tika sadalīti pēc Raja klasifikācijas stadijas. Stadija konstatēta diagnozes noteikšanas laikā. Vislielākais slimnieku skaits bija I un II stadijā, attiecīgi 38 un 40 slimnieki. 0 stadijā – 7 slimnieki; III stadija – 19 slimnieki; IV stadijā – 16 slimnieki.

8.3. 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). Sadalījums pēc slimības norises variantiem šajā pētījumā tika veikts, ņemot vērā klīniskās īpatnības. Atkarībā no klīniskās norises īpatnībām pētījumā HLL pacienti bija sadalīti 3 grupās. Pirmajā grupā tika iekļauti 7 slimnieki ar 0 stadiju, otrajā grupā apvienoti 78 slimnieki ar I un II stadiju, no tiem 38 slimniekiem tika noteikta I stadija, bet 40 cilvēkiem – II stadija. Trešajā grupā tika apvienoti 35 slimnieki ar III un IV stadiju. No tiem 19 cilvēkiem noteikta III stadija, bet 16 slimniekiem – IV stadija.

8.4. Hroniskas limfocitāzes 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).

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

Trepanbiopsijas un limfmezgla biopsijas izvērtējums tika veikts Rīgas hematoloģijas centrā.

8.5. 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. 8.1. un 8.2. tabulā atspoguļoti dati par veikto pētījumu kopējo apjomu diagnosticēšanas brīdī. Dati par veikto pētījumu apjomu pēc 6 mēnešiem: pacientu daudzums ir 109. Sešu mēnešu laikā no pētījuma izstājās 11 pacienti. 2 pacientu nāves iemesls bija progresējusi slimība, 9 – nezināms iemesls. Dati par veikto pētījumu apjomu pēc 12 mēnešiem: pacientu daudzums ir 97. 12 mēnešu laikā no pētījuma izstājās 12 pacienti, salīdzinot ar pēc 6 mēnešiem izmeklēto pacientu skaitu. 1 pacienta nāves iemesls bija progresējusi slimība, 11 – nezināms iemesls.

8.1. tabula

Standartizmeklējumu apjoms

Nr.	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu skaits diagnosticēšanas brīdī	Veikto pētījumu skaits pēc 6 mēnešiem	Veikto pētījumu skaits pēc 12 mēnešiem
1.	Klīniskā apskate	120	109	97
2.	Vispārējā asins analīze	120	109	97
3.	LDH	120	109	97
4.	β_2 mikroglobulīns	120	109	97
5.	Mielogramma	120	109	97
6.	USG	120	109	97

Kopējais noteikto parametru apjoms

Nr	Pētāmais parametrs	Veikto pētījumu skaits diagnosticešanas brīdī	Veikto pētījumu skaits pēc 6 mēnešiem	Veikto pētījumu skaits pēc 12 mēnešiem
1.	Perifēro asins šūnu imūnfēnotipēšana	120	109	97
2.	ZAP-70 ekspresijas līmenis	120	109	97
3.	CD38 ekspresijas līmenis	120	109	97
4.	TK saturs asins serumā	120	109	97

8.6. Pacientu klīniskā stāvokļa novērtējums

Primāro apskati veica sertificēti ārsti hematologi RAKUS Ķīmijterapijas un hematoloģijas klīnikā. 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.

8.7. Analīzes**8.7.1. 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.

8.7.2. β_2 mikroglobulīna noteikšana

EGL izmanto standartmetodi β_2 mikroglobulīna noteikšanai – imūnķīmisko luminescenci. Referentās vērtības ir 1,01–1,73 mg/L.

8.7.3. Laktātdehidrogenāzes noteikšana

EGL izmanto standartmetodi LDH noteikšanai – kinētiskā reakcija ar piruvātu-laktātu. Referentās vērtības ir 200–480 U/L.

8.7.4. 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. Pēc tam šūnas divkārt atmazgāja, suspendēja 500 μ l buferētā fizioloģiskā šķīdumā, veica paraugu analīzi uz plūsmas citofluorimetra Epics XL, *Beckman Coulter*.

8.7.5. ZAP-70 ekspresijas noteikšana

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 un inkubēja tumsā, istabas temperatūrā 20 minūtes,. 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 ar plūsmas citofluorimetra.

8.7.6. TK līmeņa noteikšana asins serumā

Timidīnkināze (TK) ir viens no svarīgākajiem fermentiem, kas parāda šūnu aktivitāti. Dalīšanās procesā paaugstināts šūnu daudzums saistīts ar ļaundabīgu slimību un aktīvu audzēja procesu. Līdzīgs process ir HLL. Timidīnkināzes līmenis asins serumā ir zems un atbilst ļaundabīgo šūnu dalīšanās skaitam. Darbā tika izmantota ELISA metode, kas ietver šādas darbības. TK līmenim vesela cilvēka asins serumā jābūt ne mazāk kā 50 ng/l, bet šī TK minimālās atklāšanas metode (jutīgums) bija 100 ng/l.

8.8. 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–Vītnija (*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 standartklūdas veidā ($M \pm t$). Tādejādi 120 HLL slimniekiem veikti asins limfocītu šūnu un kaulu smadzeņu kompleksi morfoloģiskie, imunoloģiskie un imūnhistoķīmiskie pētījumi ar iegūto datu statistisku apstrādi.

9. REZULTĀTI

9.1. Asins analīžu rezultāti

9.1.1. Leikocītu skaits

Pētījumā rezultāti liecina, ka 6 un 12 mēnešu terapija samazina leikocītu skaitu asinīs HLL pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $20 \times 10^9/l \pm 3 \times 10^9/l$ pret $43 \times 10^9/l \pm 7 \times 10^9/l$, ($p = 0,001$) pēc 6 mēnešiem, $21 \times 10^9/l \pm 3 \times 10^9/l$ pret $43 \times 10^9/l \pm 7 \times 10^9/l$, ($p = 0,001$) pēc 12 mēnešiem. Ieguvām statistiski ticamu pozitīvu korelāciju starp leikocītu skaitu (WBC) un stadiju ($r = +0,33$; $p = 0,0002$) un starp leikocītu skaitu un liesas garenizmēru ($r = +0,19$; $p = 0,045$).

9.1.2. Limfocītu skaits

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka 6 mēnešu terapija samazina limfocītu absolūto skaitu asinīs HLL pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $15,44 \pm 1,88$ pret $25,68 \pm 2,16 \times 10^9/l$, ($p = 0,01$). Savukārt 12 mēnešu terapija ar vēl lielāku statistisko ticamību samazina limfocītu skaitu $14,08 \pm 2,29$ pret $25,68 \pm 1,88 \times 10^9/l$, ($p = 0,001$). Ieguvām statistiski ticamu pozitīvu korelāciju starp stadiju un limfocītu skaitu ($r = +0,32$; $p = 0,0003$). Arī konstatējām pozitīvu korelāciju starp limfocītu absolūto skaitu un liesas garenizmēru ($r = +0,20$; $p = 0,03$).

9.1.3. CD38 daudzums

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka sešu mēnešu terapija palielina CD38 % skaitu HLL pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $16,01\% \pm 1,474\%$ pret $13,66\% \pm 1,526\%$ ($p = 0,01$). Savukārt 12 mēnešu terapija vēl ar lielāku 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 $16,01\% \pm 1,474\%$ ($p = 0,03$). Netika konstatēta statistiski ticama korelācija starp CD38 un stadiju, liesas izmēru un limfmezglu diametru.

9.1.4. TK daudzums

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka 6 mēnešu terapija samazina TK daudzumu HLL pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $1557,0 \text{ ng/l} \pm 213,70$ pret $2821,0 \text{ ng/l} \pm 374,70 \text{ ng/l}$ ($p = 0,0001$). Savukārt 12 mēnešu terapija arī ticami samazina TK daudzumu $1775,0 \text{ ng/l} \pm 312,40 \text{ ng/l}$ pret $2821,0 \text{ ng/l} \pm 374,70 \text{ ng/l}$ ($p = 0,02$). Konstatējām pozitīvu korelāciju starp TK daudzumu un stadiju ($r = +0,36$; $p = 0,0001$), starp TK daudzumu un liesas izmēru ($r = +0,23$; $p = 0,015$) un starp TK daudzumu un maksimālo limfmezglu diametru ($r = +0,30$; $p = 0,03$).

9.1.5. β_2 mikroglobulīna daudzums

Pētījumā rezultāti liecina, ka sešu mēnešu terapija samazina β_2 MG daudzumu HLL pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $2,84 \text{ mg/ml} \pm$

0,22 mg/ml pret 3,55 mg/ml \pm 0,32 mg/ml ($p = 0,0018$). Arī 12 mēnešu terapija samazina β_2 MG daudzumu, taču ar mazāku ticamību nekā 6 mēnešu ilga terapija 3,055 mg/ml \pm 0,27mg/ml pret 3,55mg/ml \pm 0,32 mg/ml ($p = 0,02$). Nav statistiski ticamu atšķirību starp 6 un 12 mēnešu terapiju un β_2 MG daudzumu, lai gan 6 mēnešu ilgai terapijai ir tendence vairāk samazināt β_2 MG daudzumu, salīdzinot ar 12 mēnešu ilgu terapiju. Konstatējām pozitīvu korelāciju starp β_2 MG daudzumu un stadiju ($r = +0,23$; $p = 0,009$), starp β_2 MG daudzumu un maksimālo limfmezglu diametru ($r = +0,39$; $p = 0,0035$) un korelāciju starp β_2 MG daudzumu un liesas garenizmēru ($r = +0,17$; $p = 0,05$).

9.1.6. Laktātdehidrogenāzes daudzums

Analizējot LDH, iegūti dati, ka 6 un 12 mēnešu terapija neietekmē LDH līmeni HLL pacientiem. Konstatējām statistiski ticamu pozitīvu korelāciju starp LDH līmeni un stadiju ($r = +0,25$; $p = 0,006$), LDH līmeni un liesas garenizmēru ($r = +0,22$; $p = 0,014$) un korelāciju starp limfmezglu diametru un LDH ($r = +0,27$; $p = 0,056$) diagnostikas brīdī.

9.2. ZAP-70 daudzums

Pētījumā netika atrastas statistiski ticamas atšķirības ZAP-70 rādītājos pirms terapijas, 6 un 12 mēnešus pēc terapijas.

Darbā konstatējām pozitīvu korelāciju starp stadiju un ZAP-70 ($r = +0,18$, $p = 0,05$). Pētījumā netika atrasta korelācija starp liesas garenizmēru, limfmezglu diametru un ZAP-70.

9.2.1. 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*. 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.

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

Šajā pētījumā ZAP-70 noteicām audzēja klona šūnās CD19+/CD5+. Atkarībā no slimības norises varianta un stadijas slimniekus dalīja divās grupās: ZAP-70- un ZAP-70+. Pirmajā grupā iekļauti 7 slimnieki ar labdabīgu HLL norises variantu (L). Otrajā grupā apvienoti 78 slimnieki ar lēni progresējošu slimības norises variantu (LP). Grupā ar ātri progresējošu variantu iekļauti 35 slimnieki (ĀP). 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. Šī olbaltuma līmeņa pētīšanā atklātas šādas likumsakarības (skat. 9.1. tabulu).

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 atlasē kopējā pacientu skaita. Lēni progresējošā varianta grupā 67% raksturīga ZAP70+ ekspresija un 33% pacientu negatīvi pēc pētāmā marķiera (ZAP-70-).

9.1. 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

9.2. tabula

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 grupā slimnieku skaits pēc ZAP-70+ marķiera bija 67%, no šīs atlasē kopējā pacientu skaita un ZAP-70- apakšgrupā bija 33%. Lēni progresējošā varianta grupā 69% raksturīga ZAP-70+ ekspresija un 31% pacientu negatīvi pēc pētāmā marķiera (ZAP-70-). Dati apkopoti 9.2. 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 grupā pēc ZAP-70+ marķiera nebija neviena pacienta un ZAP-70– apakšgrupā bija 2 pacienti, kas atbilst 100%. Lēni progresējošā varianta grupā 72% raksturīga ZAP-70+ ekspresija un 28% pacientu negatīvi pēc pētāmā marķiera (ZAP-70–). Dati atspoguļoti 9.3. tabulā.

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

Analizējot tādus tradicionālus HLL prognostiskos parametrus kā dzimums, limfocītu absolūtais skaits un limfocītu divkāršošanās laiks, mēs secinām, 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 $9,1 \pm 1,1$ mēneši, $p < 0,05$. Tajā pašā laikā netika atklāta korelācija starp pacientu dzimumu un apakšgrupām ZAP-70– un ZAP-70+, $p > 0,05$.

9.2.4. 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. B HLL noteicošie marķieri ir CD5, CD23.

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.

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 $p < 0,05$.

9.2.5. 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. 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.

Iegūtie rezultāti liecina, ka ZAP-70– grupā vairumam pacientu abi marķieri ir 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%.

9.2.6. Korelācija starp ZAP-70 un LDH

Pētījumā sniegtie dati atspoguļo saikni starp LDH līmeni un dažādiem ZAP-70 līmeņiem. LDH līmeņa palielināšanās var raksturot limfoproliferatīvā procesa aktivitāti.

9.4. tabula

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).

9.4.tabulā dati liecina, ka ZAP-70– apakšgrupā korelācijas starp LDH pirms ārstēšanas uzsākšanas, tā arī pielietot terapijas procesā netika atklātas. ZAP70+ apakšgrupai pēc 6 ārstēšanas mēnešiem atklāta LDH parametra samazināšanās, ar ticamību $p = 0,05$.

9.2.7. 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 un pēc 12 terapijas mēnešiem.

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

9.5. tabula

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).

9.2.8. Korelācija starp ZAP-70 un CD38

Saistība starp ZAP-70 līmeni ar dažādu CD38 daudzumu un dažādos visos novērošanas periodos. ZAP-70– apakšgrupā 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 ir $p = 0,006$. ZAP-70+ apakšgrupā 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 9.6. tabulā.

9.6. tabula

Korelācija starp ZAP-70 un CD38

ZAP-70, %	CD-38	CD-38 pēc 6mēn	CD38 pēc 12 mēn
ZAP-70- <20	9,86 ± 13,87	10,87 ± 9,41	15,15 ± 14,40
ZAP-70+ >20	13,83 ± 3,18	12,32 ± 0,63	22,65 ± 0,88

Dati izteikti kā vidējais ± standarta deviācija (SD).

9.2.9. Korelācija starp ZAP-70 un slimības stadiju

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

9.7. 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 ± 3,46	3,98 ± 2,02	4,30 ± 3,43
I	12,37 ± 12,14	11,79 ± 13,15	10,33 ± 10,36
II	18,98 ± 18,74	19,11 ± 17,18	20,81 ± 19,82
III	17,06 ± 18,36	18,27 ± 17,57	20,31 ± 20,98
IV	28,38 ± 29,55	27,30 ± 27,62	19,67 ± 21,12

Dati izteikti kā vidējais ± standarta deviācija (SD).

9.2.10. Korelācija starp ZAP un TK

9.8. tabulā atspoguļoti TK līmeņu dati un dažādi novērošanas periodi dažādu ZAP-70 līmeņu gadījumā. ZAP-70- apakšgrupā 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+ apakšgrupā netiek novērota TK līmeņa samazināšanās tendence pēc 6 mēnešiem, bet, salīdzinot TK līmeņus pēc 6 mēnešiem un pēc 12 mēnešiem.

9.8. 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).

No sniegtajiem datiem redzams, ka pirms ārstēšanas TK līmenis visās ZAP-70 apakšgrupās ir augstāks. Visaugstākais analizējamā marķiera rādītājs ir vērojams ZAP-70+ apakšgrupā. 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 ZAP-70- apakšgrupā. ZAP-70+ apakšgrupā TK līmenis, salīdzinot ar kontroli pirms ārstēšanas, pazeminājās un paaugstinājās, salīdzinot ar TK līmeni pēc 6 mēnešiem.

10. PROGNOTISTISKO MARĶIERU DINAMIKA TERAPIJAS LAIKĀ

10.1. 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.), pēc principa „novēro un gaidi” un pacientu grupa, kas saņēma ķīmijterapijas kursu variantus, kas iekļauj fludarabīnu (F, FC), pacientu grupa, kas saņēma poliķīmijterapiju bez fludarabīna (COP, CHOP). Liela grupa slimnieku tika ārstēta ar preparātu *Chlorambucil* (leikerānu) (L). Dati par slimnieku skaitu un terapijas veidiem parādīti 10.1. tabulā.

10.1. tabula

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

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 10.2. tabulā.

Terapiju nozīmēja ārstējošais ārsts hematologs. Tas, ka pacients ir iekļauts šajā pētījumā, neietekmēja terapijas izvēli.

10.2. tabula

Izvēlētās ārstēšanas varianti atkarībā no apakšgrupas

Stadijas apakšgrupas	Bez terapijas	Leikerān u saturoša terapija	Fludarabīn u saturoša terapija	Fludarabīn u 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

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

10.3. tabula

Ārstēšanas varianti apakšgrupās pēc 6 mēnešiem

Stadijas apakšgrupas	Bez terapijas	Leikerān u saturoša terapija	Fludarabīn u saturoša terapija	Fludarabīn u 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

Pēc 12 mēnešiem grupu veidoja 97 pacienti. Terapeitisku ārstēšanu saņēma 79 pacienti, 17 pacienti tika tikai novēroti. Dati par terapijas variantiem apakšgrupās parādīti 10.4. 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

10.2. Leikocītu skaita izmaiņas terapijas laikā

Visizteiktāk leikocītu skaitu samazināja pēc 12 mēnešiem fludarabīnu saturoša terapija. 6 vai 12 mēnešu leikerāna terapija statistiski ticami neietekmē leikocītu skaitu asinīs HLL 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 $5,35 \times 10^9/l \pm 1,43 \times 10^9/l$ ($p = 0,035$ 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 $12,1 \times 10^9/l \pm 4,60 \times 10^9/l$ ($p = 0,1$). 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 $8,6 \times 10^9/l \pm 4,40 \times 10^9/l$ ($p = 0,04$). Leikocītu skaits apakšgrupās bez terapijas paliek bez īpašām izmaiņām.

10.3. Limfocītu skaita izmaiņas terapijas laikā

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 $21,40 \times 10^9/l \pm 2,78 \times 10^9/l$ ($p = 0,03$). 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 $28,0 \times 10^9/l \pm 5,63 \times 10^9/l$ ($p = 0,01$). 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 $44,32 \times 10^9/l \pm 0,96 \times 10^9/l$ ($p = 0,048$).

10.4. β_2 mikroglobulīna līmeņa izmaiņas terapijas laikā

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 $3,55 \text{ mg/ml} \pm 0,59 \text{ mg/ml}$ ($p = 0,04$).

10.5. LDH līmeņa izmaiņas terapijas laikā

Pētījumā iegūtie rezultāti parāda, ka gan 6, gan 12 mēnešu leikerāna terapijai bija 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 polikīmijterapijas bez fludarabīnu saturošiem preparātiem LDH līmenis palielinās, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem $449,0 \text{ U/l} \pm 31,00 \text{ U/l}$ pret $361,70 \text{ U/l} \pm 10,87 \text{ U/l}$ ($p = 0,04$).

10.6. ZAP-70 līmeņa izmaiņas terapijas laikā

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar HLL 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.

10.7. CD38 līmeņa izmaiņas terapijas laikā

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar HLL 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.

10.8. TK līmeņa izmaiņas terapijas laikā

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar HLL bez terapijas 6 un 12 mēnešu terapijai ir tendence samazināt TK līmeni. Leikerāna 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 ($p = 0,0768$). Pacientiem ar hronisku limfocitāri leikēmiju fludarabīnu saturoša 6 mēnešu, bet ar lielāku ticamību 12 mēnešu ilgā 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 $4861,0 \pm 1815,0$ ($p = 0,045$).

11. IEGŪTO REZULTĀTU APSPRĒŠANA

Vairāki pētnieki atzīmē, ka HLL 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. 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. Tātad slimības heterogenitāte atkarīga no vairākiem faktoriem. 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.

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).

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. Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka eksistē statistiski ticama saikne un ir pozitīva korelācija starp

leikocītu 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.*) publicētiem datiem. Periodā no 1981. līdz 2004. gadam izanalizēti vairāk nekā 1500 pacienti. Pētnieku grupa publicēja rezultātus, kas liecina par leikocītu 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 leikocītu 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. 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.*) 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. ZAP-70 uzdevums ir aktivizēt tirozīnkināzi un fosforilēt iekššūnu CD3 kompleksa olbaltumu. T limfocītu aktivācija notiek ar T šūnu receptoru savienojumu ar antigēnu saturošu šūnu starpniecību (makrofāgi, dendrītšūnas un B limfocīti). Šis savienojums fosforilē transmembrāno olbaltumu 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 variablajā domēnā un neekspresējas variantā ar mutācijām.

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

pacienti ar VH gēnu mutācijām. 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. 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 konstatējam pozitīvu korelāciju starp stadiju un ZAP-70 ($r = +0,18$, $p = 0,05$). Tomēr, 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-Danešpovs u. c. (M. Ertault-Daneshpouy et al.) 2008. gadā. 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.

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 atlasē 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 tradicionālos 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 diferenciāldiagnosticejošo 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. Autors uzsver, ka šo marķieru noteikšanu var izmantot kā rutīnmetodi HLL diagnostikā.

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka pacientiem ar hronisku limfocitāri leikēmiju 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. Mūsu pētījums apstiprina šos secinājumus. Pastāv autoru viedoklis, piemēram, M. I. Del Principis (*M. I. Del Principe*), 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. Citu liganda CD38 efektu starpā atzīmē kināžu aktivāciju un olbaltumu 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 CD-38 pēc 6 un pēc 12 mēnešu terapijas; $13,83 \pm 3,18$ un $22,65 \pm 0,88$, $p = 0,0001$, salīdzinot CD38 un CD38 pēc 12 mēnešu terapijas) salīdzinājumā ar ZAP-70⁺ apakšgrupu.

M. I. Del Principis (*M. I. Del Principe*) 2006. gadā 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 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) 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, mēs 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) un U. Trumberga (*U. Thrumberg*) (2001) viedokļa, CD38 līmeņa paaugstināšanās asociējas ar slimības progresēšanu. Mūsu dati sakrīt ar iepriekš minēto autoru datiem.

L. Z. Rasenti (*L. Z. Rassenti*) 2008. gadā 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 Gidisa u. c. (*I. Del Giudice et al.*) 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.

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. 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. Pētījumā slimnieku izmeklēšanas laikā veikta TK līmeņa analīze 120 pacientiem, konstatēta sakarība un pozitīva korelācija starp TK līmeni un Raja stadiju ($r = +0,36$; $p = 0,0001$). 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, TK līmeņa noteikšanu var izmantot kā

neatkarīgu prognostisko faktoru lēni un ātri progresējošu HLL variantu noteikšanā. C. Magnaks (*C. Magnac*) (2000) analizēja divus prognostiskos faktoros 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 zinātniskās literatūrās darbiem nav zināms.

Pēc M. Halleka (*M. Hallek*) (1999) domām, ķīmijterapija palēnina audzēja kлона šūnu aktīvu dalīšanās procesu, un attiecīgi samazinās TK līmenis. Līdzīgs rezultāts ir iegūts arī mūsu pētījumā. TK līmeņa analīze dinamikā parādīja pētāmā marķiera samazinājumu. Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka 6 mēnešu ķīmijterapija samazina TK līmeni hroniskas limfocitomas pacientiem, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem – $1557,0 \pm 213,70$ ng/l pret $2821,0 \pm 374,70$ ng/l ($p = 0,0001$). 12 mēnešu terapija ticami samazina TK līmeni – $1775,0 \pm 312,40$ 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 limfocitomu bez terapijas, ar leikarāna terapiju, fludarabīnu saturošai 6 un 12 mēnešu terapijai ir tendence samazināt TK koncentrāciju, salīdzinot ar pirmsterapijas datiem.

Tomēr 6 mēnešu fludarabīnu saturoša terapija un 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), kurš viens no pirmajiem aprakstīja TK līmeņa izmaiņas, domām, un pēc tādu autoru kā M. Halleks (*M. Hallek*) (1996) viedokļa, turpmākajos darbos, TK līmeņa izmaiņas var būt svarīga informācija ārstēšanas rezultātu vērtēšanā. Pie šāda secinājuma autors nonāca, izanalizējot 113 pacientus dažādās slimības stadijās.

12. SECINĀJUMI

1. ZAP-70 līmeni hroniskas limfocitozes 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. Timidīnkīnāzi hroniskas limfocitozes 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. Timidīnkīnāzes kontroli dinamiskā var lietot hroniskas limfocitozes 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 limfocitomas 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 limfocitomas 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 limfocitomas terapijas laikā nevar lietot kā kontroles rādītāju.

9. β_2 mikroglobulīna līmeni hroniskas limfocitomas 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 limfocitomas 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.

13. PRAKTISKĀS REKOMENDĀCIJAS

1. Hroniskas limfocitomas 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 kontrolei dinamikā.

14. PATIECĪBAS

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

15. AR TĒMU SAISTĪTĀS PUBLIKĀCIJAS

Publikācijas:

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.**, Kalnihsh 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 Parametr of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. Riga Stradins University, 2010 publications of medical research papers, 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, Riga, 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 publications of medical research papers, Riga, Latvia, 2010; 122-127.

Patents:

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

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.

Uzstāšanās starptautiskās zinātniskās konferencēs ar mutisku referātu:

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

Uzstāšanās 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 Kingdom, 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, Barselona, June 10-13. 2010; 1275.

3. **Rivkina A.**, Vītols 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 timidinkināzes 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.

6. **Rivkina A.**, Lejniece S., Ūdre I., Vītols G., Murovska M. Timidīnkināzes koncentrācijas izmaiņas hroniskas limfocitozes ārstēšanas gaitā. Rīgas Stradiņa universitāte, 2011. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2011. gada 14.–15. aprīlī; 278.

7. **Rivkina A.**, Murovska M., Ūdre I., Lejniece S. ZAP-70 kā nemainīgs prognostiskais rādītājs hroniskas limfocitozes gadījumā. Rīgas Stradiņa universitāte, 2011. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2011. gada 14.–15. aprīlī; 279.

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

9. **Rivkina A.**, Murovska M., Ūdre I., Lejniece S. ZAP-70, CD38, B-2 mikroglobulīns kā prognostiskie marķieri pirmreizējiem hroniskas

limfocitāro slimniekiem. Rīgas Stradiņa universitāte, 2008. gada zinātniskā konference, Rīga, Latvija, 2008. gada, 13.–14. martā; 173.

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

11. 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.

12. 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 Stradiņš University, 2011 publications of medical research papers, Rīga, Latvija, 2011; 317.

13. Upmane M., Spaks A., Berkenfelde R., Spaka I., **Rivkina A.**, Sasoveca I., Kalnina V., Holodnuka I., Lejniece 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.