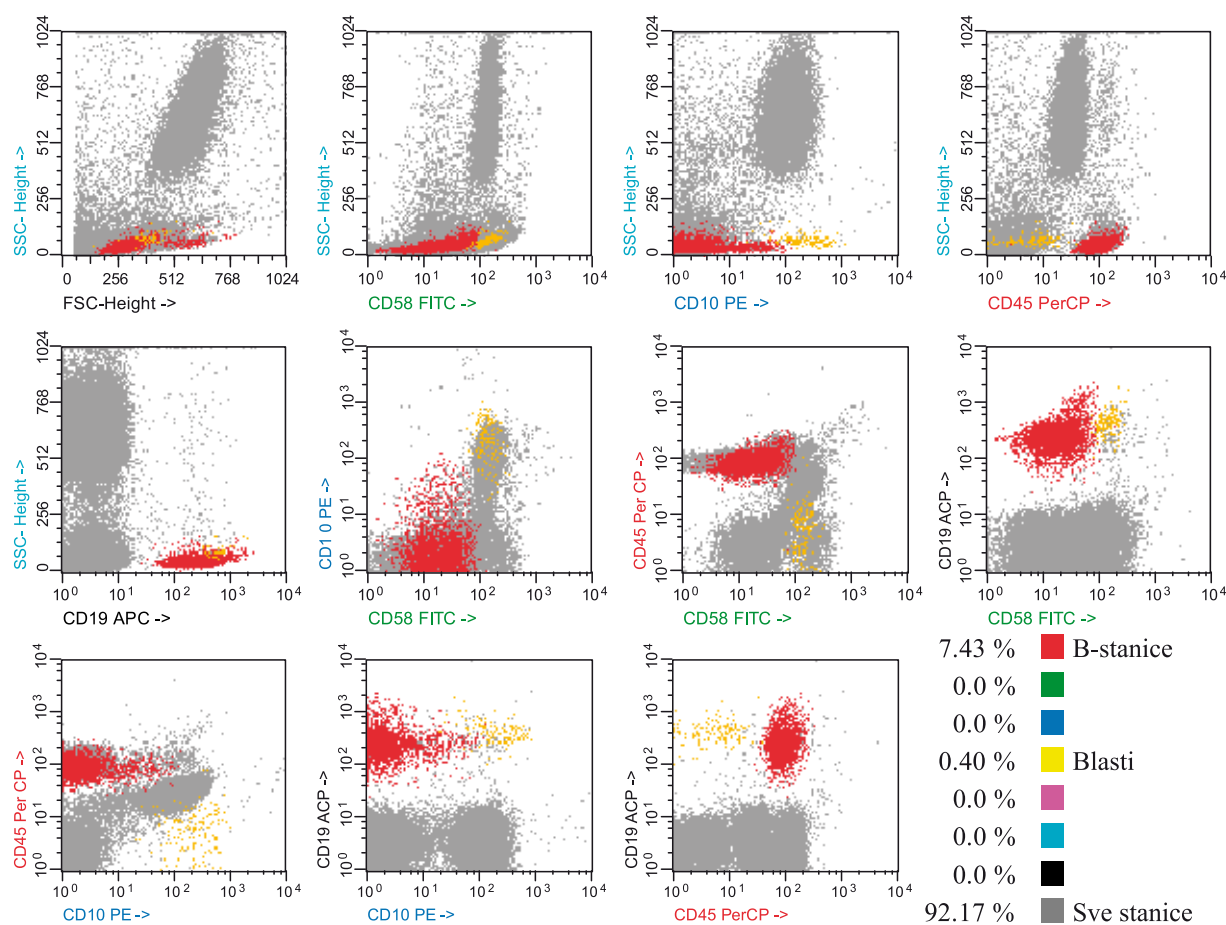


Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem



Volumen 2., Broj 1.

Krohema

Impresum

Bilten Krohema
Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem
Volumen 2., Broj 1., Svibanj 2010.

Nakladnik:

Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti Krohem

Za nakladnika:

Boris Labar

Glavni urednik:

Dražen Pulanić

Tajnica Krohema:

Dijana Perčin

Autori tekstova:

Emina Babarović	Ika Kardum-Skelin
Sandra Bašić-Kinda	Petra Korać
Josip Batinić	Boris Labar
Ana Boban	Ksenija Lučin
Mara Dominis	Vlatko Pejša
Snježana Dotlić	Irena Seili-Bekafigo
Antica Duletić-Načinović	Dubravka Sertić
Slavko Gašparov	Christophe Štemberger
Ivana Ilić	Sanja Štifter
Branimir Jakšić	Toni Valković
Ozren Jakšić	Radovan Vrhovac
Nives Jonjić	

Uputa suradnicima:

Materijali se šalju na adresu uredništva "Bilten Krohema", Trg hrvatskih velikana 2, 10 000 Zagreb, u elektronskom i tiskanom obliku, te obvezno i na adresu E-pošte urednika dpulanic@yahoo.com

Objavljeni tekstovi predstavljaju stav autora i uredništvo se ne mora slagati s iznešenim mišljenjima.

Opis slike na naslovnici:

Analiza minimalne ostatne bolesti u koštanoj srži djeteta s B-prekursorskom akutnom limfoblastičnom leukemijom tipa "common" 15. dana liječenja. Analiza prikazuje normalne B-stanice fenotipa CD10-CD19+CD45+CD58+ (označene crvenom bojom) te rezidualnu leukemijsku populaciju B-limfoblasta (0,4%) aberantnog imunofenotipa CD10+CD19+CD45-CD58++ (označeno žutom bojom). Analiza je učinjena pomoću protočnog citometra FACSCalibur (BD-Biosciences) i računalnog programa Paint-A-Gate (BD-Biosciences).

Autori: dipl. ing. Klara Dubravčić i prof. dr. Drago Batinić, Zavod za imunologiju i Referentni centar Ministarstva zdravstva RH za imunodijagnostiku imunoloških i hematoloških bolesti, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb.

Sadržaj

B. Labar:	
Uvodnik	2
T. Valković:	
Liječenje sekundarne hemosideroze u hematoloških bolesnika	4
A. Duletić-Načinović:	
IRIS klinička studija: 7 godina praćenja bolesnika u ranoj kroničnoj fazi KML	6
D. Sertić:	
Preporuke ELN za dijagnostiku, terapiju i praćenje KML-2009	8
A. Boban:	
Anagrelid u liječenju mijeloproliferativnih bolesti – iskustva KBC Zagreb	10
J. Batinić:	
Registar oboljelih od multiplog mijeloma	11
A. Duletić-Načinović:	
Uloga rituksimaba u liječenju indolentnih limfoma u relapsu	12
B. Jakšić, V. Pejša, I. Kardum-Skelin, S. Bašić-Kinda, P. Korać, R. Vrhovac, O. Jakšić:	
Kronična limfocitna leukemija	15
S. Dotlić, I. Ilić:	
Molekularne metode u dijagnostici limfoproliferativnih bolesti prema klasifikaciji SZO 2008.	24
P. Korać, M. M. Kardum Paro, M. Dominis:	
Procjena klonalnosti NHL-a	26
S. Štifter, E. Babarović, T. Valković, I. Seili-Bekafigo, C. Štemberger,	
A. Duletić-Načinović, K. Lučin, N. Jonjić:	
Morfološke metode utvrđivanja zahvaćenosti koštane srži plazma stanicama u multiplom mijelomu	28
S. Gašparov:	
FOXP3 pozitivne stanice u MALT-tipu limfoma želuca	30
M. Dominis, P. Korać:	
FOXP3 pozitivne stanice u folikularnom limfomu i limfomu malih limfocita	31
Obavijest	
Sporazum o suradnji između Republike Hrvatske i glasovitog američkog Nacionalnog instituta za rak	33

UVODNIK

KROHEM postaje naša hematološka zbilja. Iako još uvijek čekamo na prvo prospektivno kliničko istraživanje mnogo se toga pokrenulo, ponajprije u pristupu standardizaciji i dijagnostičko terapijskim smjernicama u hematologiji. Na zadnjem KROHEM-u u Osijeku usvojene su smjernice za dijagnostiku i liječenje esencijalne trombocitemije. Smjernice su u postupku za publikaciju u Liječničkom Vjesniku pa je to razlog zašto ih nema u najnovijem Biltenu. Uskoro ćemo ih prikazati u konačnoj verziji na našoj web stranici. U izradi su smjernice za kroničnu mijeloičnu leukemiju, multipli mijelom i kroničnu limfocitnu leukemiju, a u pripremi su smjernice za dijagnostiku i liječenje akutnih leukemija. Kada se zna da već postoji Hrvatski konsenzus dijagnostike i liječenja limfoma, a na području hemostaze i tromboze već dugi niz godina postoji također konsenzus dijagnostike i liječenja nasljednih hemofilija čini se da smo na dobrom putu u potpunosti zaokružiti program preporuka i standardizacije u dijagnostici i liječenju većine hematoloških bolesti. Mislim da je ovo i jedan od temeljnih preduvjeta za klinička istraživanja.

Registar KROHEM-a polagano napreduje. Kako smo se odlučili na pristup registar-bolest postoji gotovo većina izrađenih registara ali je njihova razina pripremljenosti za unos podataka i ponajprije unos podataka bitno različita. Većina njih (limfomi, mijelomi, kronična granulocitna leukemija, akutne leukemije) su u konačnoj verziji i mogli bi se popunjavati. No još uvijek većina centara za pojedine bolesti nije dobila zaporke i praktički ne unosi podatke svojih bolesnika u Registar. Smatram ovo jednim od prioritarnih zadataka KROHEM-a koji mora iznaći rješenje unosa podataka. To će biti jedna od točaka rasprave sastanka KROHEM-a u Splitu.

Voditelji radnih skupina sastali su se tijekom veljače i raspravili aktivnosti tijekom ove godine. Procjena je i naglasak upravo na četiri aktivnosti: izrada smjernica, rad na Registru, retrospektivne studije i prospektivne studije. Svaka će od radnih skupina na sljedećem sastanku u Splitu naglasiti svoje prioritete, ukazati na probleme i prikazati trenutno stanje aktivnosti. Treba naglasiti da smo tijekom sastanka dogovorili i prihvatili da doc. dr. Radovan Vrhovac koordinira aktivnosti radne skupine za potpurnu terapiju u hematologiji. U Splitu će se pokrenuti djelovanje ove grupe ponajprije procjenom prioriteta u

radu. Za te potrebe dr. Vrhovac je izradio upitnik koji bi trebao ukazati koje aktivnosti većina centara KROHEM-a smatra važnim. Istodobno će doc. Valković predložiti za raspravu smjernice liječenja hematoloških bolesnika kelatorima željeza.

KROHEM se značajno okreće dijagnostičkim istraživanjima, od standardizacije do translacijskih istraživanja. Ovo je jedna od važnih aktivnosti, pa ćemo osnovati i radnu skupinu za dijagnostiku u hematologiji. Rasprava je u tijeku i za očekivati je konačan prijedlog ove radne skupine u Splitu.

Predstavnici KROHEM-a aktivni su i na međunarodnom planu. U jesen 2009. osnovana je kooperativna skupina za liječenje leukemija srednje i istočne Europe (CELG – Central and Eastern Leukemia Cooperative Group). Cilj grupe je provoditi prospektivna klinička ispitivanja na području akutnih leukemija. Očekuje se sudjelovanje centara iz 12 zemalja. I KROHEM će sudjelovati u ovoj međunarodnoj grupi.

Financiranje KROHEM-a u vrijeme recesije čini se nije bitnije smanjeno. Za sada je većina farmaceutskih tvrtki produljila ugovor s KROHEM-om pa je za očekivati nesmetani rad i tijekom 2010. godine.

Na kraju dozvolite da u uvodniku navedemo dvije aktivnosti koje imaju poseban značaj za KROHEM. To je prvi rad koji će biti objavljen u Liječničkom vjesniku (Slika 1.), te prvi „poster“ KROHEM-a (Effective stem cell mobilization with plerixafor + G-CSF followed by large volume leukapheresis in poor mobilizers: the experience of the Croatian cooperative group for hematological diseases (KROHEM), autori O. Jakšić, S. Bašić-Kinda, I. Maričić, I. Bojanić, D. Nemet, V. Pejša, B. Labar) na sastanku Europske grupe za liječenje transplantacijom krvotvornih matičnih stanica u Beču 21.-24. ožujka 2010. (Slika 2.).

Prof. dr. sc. Boris Labar, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: boris.labar@inet.hr

Slika 1. Naslovnica rada koji će biti objavljen u Liječničkom Vjesniku.

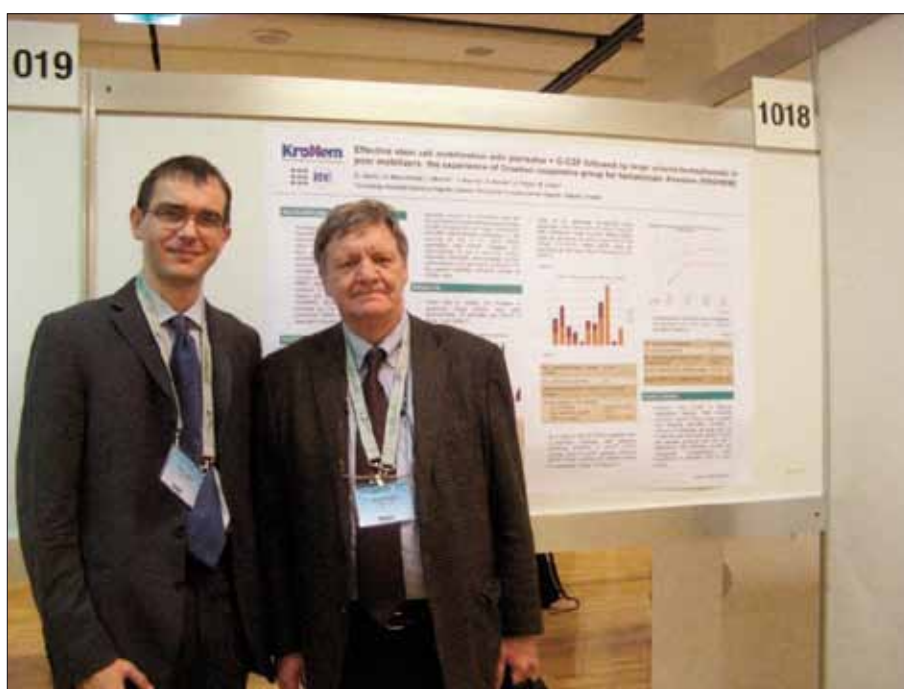
Dijagnostičko terapijski pristup u bolesnika s esencijalnom trombocitemijom Smjernice Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti –KROHEM

**Boris Labar¹, Rajko Kušec², Branimir Jakšić³, Ljubica Škare-Librenjak⁴, Antica Duletić-Načinović⁵,
Jasminka Petričević-Sinčić⁶, Dubravka Čaržavec⁷, Božena Coha⁸, Velka Gverić-Krečak⁹,
Elizabeta Čorović¹⁰, Nada Lang¹¹, Zlata Lojen-Nemet¹², Renata Babok-Flegarić¹³**

Diagnosis and Therapy for Patients with Essential Thrombocythaemia Guidelines of Croatian Cooperative Group for hematologic disorders – KROHEM

- 1 – Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb
- 2 – Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Dubrava, Zagreb
- 3 – Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Merkur, Zagreb
- 4 – Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, KBC Split
- 5 – Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, KBC Rijeka
- 6 – Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku, KBC Osijek
- 7 – Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Sestre Milosrdnice, Zagreb
- 8 – Internistički odjel, OB Josip Benčević Sl. Brod
- 9 – Internistički odjel, OB Šibenik
- 10 – Internistički odjel OB Dubrovnik
- 11 – Klinika za unutrašnje bolesti, KB Sv. Duh Zagreb
- 12 – Internistički odjel OB Koprivnica
- 13 – Internistički odjel OB Varaždin

Slika 2. Prvi KROHEM-ov poster.



Liječenje sekundarne hemosideroze u hematoloških bolesnika

Doc. dr. sc. Toni Valković, dr. med.

Zavod za hematologiju, reumatologiju
i kliničku imunologiju, Klinički bolnički centar Rijeka
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
E-pošta: toni_val@net.hr

Jedna jedina transfuzijska jedinica deplazmatiziranih eritrocita kojom se naši bolesnici svakodnevno liječe sadrži čak oko 200 mg željeza što je tek 20-25 puta manje od ukupne količine željeza u tijelu. Budući da ljudsko tijelo ne posjeduje učinkovite mehanizme za uklanjanje suviška željeza, jasno je da će višekratne transfuzije krvi, ukoliko nisu istovremeno praćene gubitkom krvi, dovesti do viška željeza u tijelu, tj. preopterećenja ovim metalom. Štetan utjecaj u organizmu ostvaruje se nagomilavanjem željeza koje je vezano u proteinske spojeve kao što su feritin i hemosiderin, ali isto tako putem nevezanog (slobodnog) plazmatskog željeza koje nije vezano za transferin i koje dovodi do stvaranja vrlo toksičnih slobodnih radikala štetnih za stanice i tkiva.

Vezano željezo najprije se nagomilava u sustavu tkivnih makrofaga slezene, jetre, koštane srži i drugih organa, a kada se ovaj sustav zasiti viškom željeza, ono se počinje odlagati u parenhimske stanice organa, kao što su jetra, srčani mišić, gušterača i druge žlijezde s unutrašnjim izlučivanjem dovodeći do njihova oštećenja, disfunkcije te pojave bolesti.

Hematološke bolesti u kojih najčešće dolazi do preopterećenja željezom uslijed opetovanih transfuzija krvi i s tim u vezi oštećenja organa su sindrom mijelodisplazije, aplastična anemija, izolirana aplazija crvene loze, primarna ili sekundarna mijelofibroza i neke druge rijetke vrste anemija, kao i talasemija major te bolest srpastih stanica koje su, na sreću, rijetke u nas.

Za utvrđivanje preopterećenosti željezom služimo se sljedećim metodama:

- serumski feritin- zbog svoje dostupnosti i jeftinoće najčešće se rutinski koristi. Međutim, njegova korelacija s količinom željeza u tijelu nije suviše precizna, bolje korelira s količinom željeza u sustavu tkivnih makrofaga, nego li u parenhimskim organima, a sustavne upale, oštećenje jetre, izraziti oksidativni stres i propadanje stanica dodatno kompromitiraju njegovu korelaciju s količinom željeza u tijelu
- zasićenost transferina, također, je veoma

dostupan i jeftin indirektni pokazatelj količine željeza u tijelu koji se često koristi u rutinskom radu

- direktna metoda kojom se iz biopsijskog materijala (najčešće jetre, a rijeđe drugih tkiva npr. miokarda) ekstrahira i kvantificira željezo kemijskim putem. Ovo je veoma egzaktna i precizna, ali invazivna metoda, a rezultat donekle ovisi o mjestu s kojeg je uzeta biopsija
- slikovne metode, tj. magnetska rezonanca kojom se, koristeći odgovarajuće radiološke parametre, može indirektno, ali prilično precizno procijeniti količinu željeza u jetri, žlijezdama, koštanoj srži, kao i srcu. Nažalost, metoda je skupa i dostupna samo u većim centrima
- najnovija, veoma složena i precizna indirektna metoda za procjenu količine željeza u jetri je biomagnetska susceptometrija koja koristi paramagnetske karakteristike tkivnog željeza. Dostupna je u svega nekoliko svjetskih centara.

Znanstveni dokazi o štetnosti preopterećenja željezom su nedvojbeni. Srčani poremećaji koji su posljedica nagomilavanja željeza u srcu vodeći su uzrok smrti bolesnika s talasemijom major (*Gabutti V et al. Acta Haematol 1996; 95:26-36; Olivieri NF et al. Blood 1997; 89:739-61*). U sindromu mijelodisplazije pokazano je da bolesnici ovisni o transfuzijama krvi imaju značajno kraće preživljenje te veću učestalost transformacije u akutnu leukemiju u odnosu na one koji nisu ovisni o transfuzijama (*Malcovati L et al. J Clin Oncol 2005; 23:7594-603*). Bolesnici s anemijom srpastih stanica i preopterećenjem željezom imaju značajno višu smrtnost nego li oni bez preopterećenja (*Ballas SK. Semin Hematol 2001; 38:30-6*).

Postavlja se pitanje kada preopterećenje željezom postaje klinički značajno i kada prijeti oštećenje organa dovodeći do potrebe medicinske intervencije tj. liječenja? Tu postoje određena manja razmimoilaženja u stavovima, no većina se slaže da u bolesnika koji su učestalo liječeni transfuzijama krvi klinički značajno preopterećenje željezom i potreba za liječenjem nastaje nakon što bolesnik primi više od 20 transfuzijskih jedinica deplazmatiziranih eritrocita i/ili kada serumski feritin premaši 1000 ug/L (*Olivieri NF et al. Blood 1997; 89:739-61; Bowen D et al. Br J Haematol 2003; 120:187-200; Gattermann N et al. Hematol Oncol Clin North Am 2005; 19:18-25*).

Kelatori željeza su spojevi koji se vežu sa slobodnim i vezanim željezom u neškodljivi spoj koji se može izlučivati iz tijela stolicom ili mokraćom. Time se najprije sprječava daljnje nagomilavanje željeza, a zatim i postupno snižavanje njegove ukupne količine u tijelu.

Istraživanja Kerstena, Gattermanna, Jansena i njihovih suradnika utvrdila su da uporaba kelatora željeza u višestruko transfundiranih bolesnika s netalasemičnim kroničnim anemijama dovodi do sniženja preopterećenosti željezom (Kersten MJ et al. *Ann Hematol* 1996; 73:247-52; Jensen PD et al. *Blood* 2003; 101:4632-9; Gattermann N et al. *Leuk Res* 2005; 29 /suppl.1/:S67). Nekoliko kliničkih studija ukazuje na dulje preživljenje bolesnika sa sindromom mijelodisplazije koji su liječeni kelatorima željeza (odnosno višim dozama ovih lijekova), u usporedbi s onima koji nisu liječeni (ili su liječeni s nižim dozama) (Leitch HA et al. *Blood* 2006; 108 /Abstract 249; Rose C et al. *Blood* 2007; 110 /abstract 249; Jensen PD et al. *Br J Haematol* 1996; 94:288-99).

Danas se koristi nekoliko kelatora željeza, uglavnom u monoterapiji.

Deferoksamin se koristi od 70-ih godina prošlog stoljeća. Radi se o velikoj molekuli s vremenom poluživota od svega 20-ak minuta što zahtijeva dugotrajnu primjenu lijeka tijekom 8-12 sati na dan tijekom 5-7 dana u tjednu u dozi od 20-60 mg/kg/dan u vidu kontinuirane potkožne infuzije. Za ovo su potrebni posebni supkutani aplikatori što primjenu lijeka čini kompliciranom, a suradljivost bolesnika značajno je smanjena. Ipak radi se o učinkovitom kelatoru željeza (donekle je upitan njegov učinak na srčanu siderozu) s dosta dobrim sigurnosnim profilom. Najčešći neželjeni učinci liječenja u odraslih su lokalne i sustavne alergijske reakcije, oštećenje oka te uha, povećana sklonost k infekcijama s Yersinijom.

Deferipron se u svijetu upotrebljava od posljednjeg desetljeća 20. stoljeća. Ovo je učinkovit kelator željeza koji se uzima peroralno u dozi od 75-100 mg/kg/dan. Na žalost, jedan od njegovih neželjenih učinaka je neutropenija tj. agranulocitoza i zbog toga povišen rizik od infekcije, kao i oštećenje jetre, artralgijske, probavne smetnje i nedostatak cinka.

Deferasiroks (Exjade, Novartis[®]) je "najmlađi" kelator željeza namjenjen peroralnoj primjeni u dozi od 20-30 mg/kg/dan. Ovo je mala molekula s dugim poluvremenom života (8-16 sati) što omogućava primjenu lijeka samo jednom na dan uz postizanje 24-satne kelacije slobodnog i vezanog željeza. Više

kliničkih studija faze I, II i III prethodilo je registraciji lijeka u SAD i Europi. Sve su one dokazale dobru učinkovitost, neinferiornost u odnosu na deferoksamin te zadovoljavajući sigurnosni profil lijeka (Cappellini MD et al. *Clin Ther* 2007; 29:909-17; Piga A et al. *Blood* 2006; 108 /Abstract 1781; Piga A et al. *Haematologica* 2006; 91:873-80). Do sada najveća klinička studija s nekim kelatorom metala je upravo "EPIC" studija koja je trebala utvrditi učinkovitost i sigurnost fiksne startne doze deferasiroksa ovisno o broju prethodnih transfuzija. Ovo prospektivno multicentrično istraživanje obuhvatilo je preko 1700 bolesnika s kroničnim anemijama i preopterećenjem željezom. Studija je utvrdila sniženje količine željeza u tijelu ovisno o dozi lijeka, smanjenje slobodnog plazmatskog željeza, smanjenje željeza u srcu bolesnika s talasemijom te zadovoljavajući sigurnosni profil, potvrdivši opravdanost fiksne početne doze ovisno o broju prethodnih transfuzija krvi (Cappellini MD et al. *Haematologica*; u tisku).

Deferasiroks je indiciran u liječenju preopterećenja željezom izazvanim čestim transfuzijama krvi (≥ 7 ml/kg/mjesec koncentrata eritrocita) u bolesnika s beta-talasemijom major u dobi od 6 godina ili starijih. Također je indiciran u preopterećenju željezom zbog višestrukih transfuzija krvi kada je primjena deferoksamina kontraindicirana ili neodgovarajuća u bolesnika s ostalim vrstama kroničnih anemija, bolesnika u dobi od 2 do 5 godina, kao i bolesnika s beta-talasemijom major i preopterećenjem željezom izazvanim rijetkim transfuzijama krvi (< 7 ml/kg/mjesec koncentrata eritrocita).

Na tržištu postoje tablete za oralnu suspenziju od 125, 200 i 500 mg, a dozu treba izračunati i zaokružiti do najbliže doze cijele tablete.

Preporučena početna doza iznosi 20 mg/kg, a može se povećati na 30 mg/kg u bolesnika s preopterećenjem željezom koji primaju više od 14 ml/kg/mjesec koncentrata eritrocita (to je otprilike više od 4 jedinice deplazmatiziranih eritrocita na mjesec). Doza od 10 mg/kg može se razmotriti u bolesnika kojima ne treba snižavati razinu željeza u organizmu, već samo spriječiti njegovo daljnje nagomilavanje, a koji primaju manje od 7 ml/kg/mjesec koncentrata eritrocita (to je otprilike manje od 2 jedinice deplazmatiziranih eritrocita na mjesec). Doza veća od 30 mg/kg se ne preporučuje, a ako su vrijednosti feritina u serumu dosljedno ispod 500 ug/L potrebno je razmotriti prestanak liječenja. Primjena deferasiroksa je kontraindicirana u preosjetljivosti na djelatnu ili pomoćne tvari u lijeku ili ako je klirens kreatinina procjenjen na manje od 60 ml/minuti.

Kombinacije deferasiroksa i drugih kelatora željeza su neispitane i ne preporučuju se.

Neželjene pojave liječenja deferasiroksom ovisne su o dozi, uglavnom blage ili umjerene, prolazne te većinom nestaju u nastavku liječenja. Najčešće su:

- probavni poremećaji (mučnina, povraćanje, proljev, bol u trbuhu) koji se javljaju u oko 26% liječenih
 - kožni osipi se javljaju u oko 7% liječenih bolesnika
 - u otprilike trećine liječenih uočen je porast serumskog kreatinina koji je obično blag i neprogresivan
 - rjeđe se javlja povišenje jetrenih aminotransferaza te žučni kamenci.
- Tijekom liječenja potrebno je jednom mjesečno

odrediti serumski feritin, kreatinin (i njegov klirens i/ili vrijednost cisteina), aminotransferaze, proteinuriju, a jednom godišnje provjeriti vid i sluh. Zbog načina primjene i relativno dobrog sigurnosnog profila suradljivost bolesnika pri liječenju deferasiroksom je veća nego li drugim kelatorima željeza, npr. deferoksaminom.

Valja zaključiti da je liječenje preopterećenja željezom nužna medicinska intervencija u bolesnika s kroničnim anemijama koji opetovano primaju transfuzije deplazmatiziranih eritrocita (a istovremeno ne gube krv) koja smanjuje mortalitet, komorbiditet te poboljšava kvalitetu života. U našoj zemlji registriran je deferasiroks (Exjade) kao učinkovit kelator željeza zadovoljavajućeg sigurnosnog profila i dobrog “compliance-a”.

IRIS klinička studija: 7 godina praćenja bolesnika u ranoj kroničnoj fazi KML

Doc. dr. sc. Antica Duletić-Načinović, dr. med.

Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju

Klinički bolnički centar Rijeka

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta:antica.duletic-nacinovic@ri.t-com.hr

International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) je dizajnirana tako da su u jednu skupinu uključeni bolesnici liječeni imatinibom, a u drugu oni liječeni u to vrijeme standardnom terapijom (interferon-alfa (IFN-alfa) + citarabin (Ara-C)). U studiju je uključeno 1106 novodijagnosticiranih bolesnika s KML u kroničnoj fazi bolesti. Bolesnici liječeni imatinibom primali su lijek u dozi od 400 mg na dan.

Nakon 7 godina praćenja bolesnika, IRIS studija želi dati podatke o ishodu liječenja svih uključenih bolesnika (o prekidu terapije studijskim lijekom, preživljenju), o događajima kasne progresije, o trajanju kompletnog citogenetskog odgovora (CCR), o molekularnom odgovoru, o nuspojavama liječenja i konačno dati zaključke.

Nakon sedam godina praćenja bolesnika još je njih 554 od ukupno 1106 (50%) uključeno u studiju. Od 554 bolesnika koji su još u ispitivanju 545 (98.4%) ih je na terapiji imatinibom. Od ukupno 545 bolesnika koji se liječe imatinibom, na terapiji prve linije liječenja imatinibom je 332 bolesnika (60% bolesnika randomizirano je na prvu liniju liječenja imatinibom), dok je 213 bolesnika prešlo sa terapije

IFN/Ara-C (39% bolesnika randomizirano na IFN/Ara-C). Samo 9 bolesnika (1.6%) ostalo je na IFN/Ara-C. S obzirom da je samo 1.6% bolesnika ostalo na terapiji IFN/Ara-C, ovaj izvještaj se bazira samo na podacima dugoročnog ishoda i sigurnosti liječenja bolesnika na terapiji imatinibom.

Nakon sedam godina praćenja sveukupno preživljenje bolesnika liječenih imatinibom iznosi 86% (odnosno 94% računajući samo smrti vezane uz KML). Rezultate ukupnog preživljenja prikazuje Slika 1. Preživljenje bez događaja (*engl. event-free survival-EFS*) nakon sedam godina iznosi 81%, dok je stopa preživljenja bez faze ubrzanja/blastične krize 93%. Progresija bolesti u fazu ubrzanja ili u blastičnu krizu potvrđena je u 15 (3%) od 456 bolesnika koji su postigli kompletan citogenetski odgovor (CCR). Od tih 456 koji su postigli CCR, 10 (2%) je umrlo od KML.

U studiji je veliki naglasak dat citogenetskom i molekularnom odgovoru. Kompletni citogenetski odgovor je potvrđen u 456 bolesnika od njih 553 (82%) koji su bili na prvoj liniji liječenja imatinibom, dok je 317 (57%) randomiziranih na imatinibu i zadržalo CCR. Trajnost citogenetskog odgovora prikazan je na Slici 2.

Prema IRIS protokolu rađene su procjene molekularnog odgovora jednom kada je bolesnik postigao CC. Dodatni uzorci uzimani su u ponekim ispitivačkim centrima neovisno o statusu citogenetskog odgovora. Na 7 godina više od 85% bolesnika imalo je barem jedno mjerenje PCR-om s većim brojem

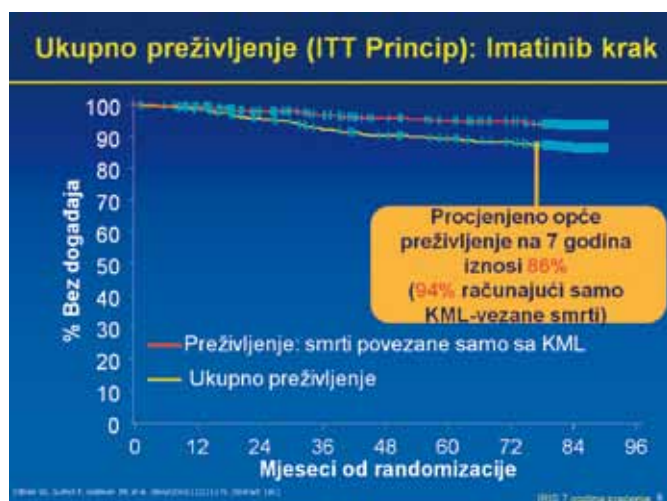
uzoraka na početku i svakom sljedećem terminu praćenja. Potvrđeno je da se veliki molekularni odgovor (MMR) i dubina („veličina“) molekularnog odgovora povećavaju tijekom vremena. Stopu molekularnog odgovora u bolesnika liječenih imatinibom prikazuje Slika 3.

Kroz to razdoblje praćene su i nuspojave liječenja imatinibom. Nakon 2005. g. prikupljani su samo podaci za teške nuspojave. Incidencija nuspojava stupnja 3 i 4 pala je nakon prve i druge godine praćenja. U posljednje dvije godine nije prijavljena niti jedna neuobičajena, predhodno nespomenuta nuspojava na imatinib. U šestoj i sedmoj godini prijavljeno je 13 ozbiljnih ili teških nuspojava (SAE) vezanih za imatinib. Najučestalije nuspojave registrirane u bolesnika liječenih imatinibom prikazuje Slika 4.

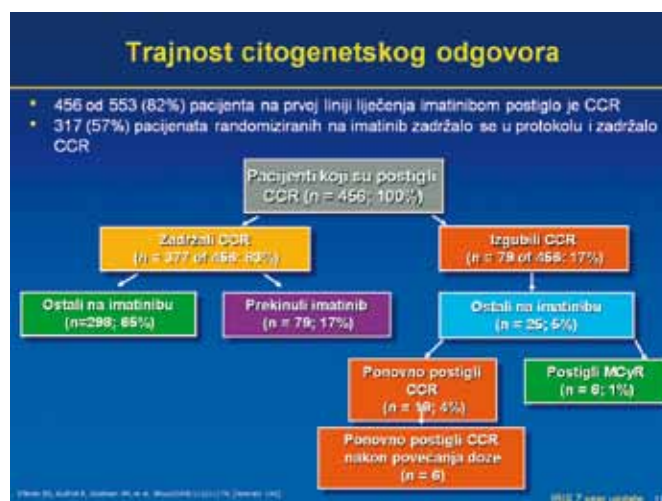
I konačno zaključci IRIS studije-nakon 7 godina praćenja bolesnika:

- Ukupno preživljenje bolesnika liječenih imatinibom je 86%

- Preživljenje bez događaja (EFS) bolesnika liječenih imatinibom iznosi 81% uz 7% progresije u AP/BC
- 40% bolesnika je prekinulo studijski imatinib
- CCR je postiglo 456 od 553 (82%) bolesnika
 - 17% onih koji su postigli CCR naknadno su ga izgubili
 - 3% onih koji su postigli CCR progrediralo je u AP/BC
 - od 456 bolesnika koji su postigli CCR, 10 (2%) je umrlo od KML
 - vrijeme potrebno za postizanje CCR nije korelirao sa stopama progresije u AP/BC
- Stope MMR i veličina molekularnog odgovora se povećavaju tijekom vremena
- Nisu zabilježeni novi problemi sa sigurnošću imatiniba
- Imatinib u dozi od 400 mg dnevno - potvrđeni je standard prve linije liječenja kronične faze KML.



Slika 1. Ukupno preživljenje bolesnika nakon 7 godina IRIS studije



Slika 2. Trajanje citogenetskog odgovora u bolesnika IRIS studije



Slika 3. Stopa molekularnog odgovora u bolesnika IRIS studije



Slika 4. Najučestalije prijavljene nuspojave imatiniba u bolesnika IRIS studije

Preporuke ELN za dijagnostiku, terapiju i praćenje KML-2009

Dubravka Sertić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: dsertic@net.hr

Grupa eksperata za kroničnu mijeloičnu leukemiju (KML) u sklopu European Leukemia Net (ELN) donijela je u 2009. godini nove preporuke liječenja KML. Preporuke su prvi puta prikazane u rujnu na sastanku u Barceloni, a objavljene u Journal of Clinical Oncology krajem 2009. Namjera ekspertnog tima je bila objaviti preporuke za liječenje KML imatinibom i lijekovima druge generacije inhibitora trozin kinaze (TKI), te alogeničnom transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica u KML. Potrebno za promjenom preporuka iz 2006. godine nastala je zbog dugotrajnijeg iskustva u liječenju KML imatinibom (7-godišnje praćenje IRIS studije, mnogo više bolesnika do sada liječeno imatinibom uz duže praćenje), mnogo više iskustva s nilotinibom i dasatinibom koji su u međuvremenu registrirani kao druga linija liječenja, te zbog napretka u liječenju alogeničnom transplantacijom hematopoetskih matičnih stanica.

Definicija terapijskog odgovora

Definicija hematološkog, citogenetskog i molekularnog odgovora je ostala ista kao 2006. godine (Tablica 1.) dok je procjena terapijskog odgovora imatiniba u KML u prvoj kroničnoj fazi (Tablica 2.) nešto izmijenjena. Prvi puta se definira optimalni odgovor na terapiju.

Praćenje terapijskog odgovora

Prema preporukama ELN kompletnu krvnu sliku s analizom krvnog razmaza potrebno je učiniti pri dijagnozi, potom svaka 2 tjedna dok se ne postigne kompletan hematološki odgovor, te kasnije najmanje svaka 3 mjeseca. Klasičnu citogenetsku analizu treba raditi nakon 3 i 6 mjeseci, te svakih 6 mjeseci dok se ne postigne i potvrdi kompletna citogenetska remisija, te uvijek u slučaju neuspjeha liječenja ili sumnje na MDS. U slučaju da se ne može osigurati praćenje terapijskog odgovora kvantitativnim PCR treba učiniti FISH. Kvantitativni PCR predstavlja osnovu praćenja terapijskog učinka i trebalo bi ga raditi svaka tri mjeseca dok se ne postigne i potvrdi veliki molekularni odgovor, te potom najmanje svakih 6 mjeseci. Mutacije na bcr-abl domeni treba ra-

čiti u slučaju suboptimalnog odgovora ili neuspjeha liječenja a uvijek prije promjene TKI.

Preporuke liječenja KML

U prvoj kroničnoj fazi preporuča se sve bolesnike liječiti u prvoj liniji imatinibom a u slučaju nepodnošenja imatiniba nilotinibom ili dasatinibom. Nakon neuspjeha ili suboptimalnog odgovora na imatinib definirane su preporuke liječenja (Tablica 3.). Također su definirane i preporuke liječenja u uznapredovaloj fazi liječenja – akceleriranoj fazi ili blastičnoj transformaciji (Tablica 4.). U tih bolesnika potrebno je nakon predtretmana inhibitorima tirozin kinaze uvijek kada je moguće provesti alogeničnu transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica od srodnog ili nesrodnog davatelja. Dane su preporuke kada izvršiti pretraživanje srodnog ili nesrodnog davatelja (Tablice 5. i 6.) te indikacije za alogeničnu transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica (Tablica 7.).

DEFINICIJA HEMATOLOŠKOG, CITOGENETSKOG I MOLEKULARNOG ODGOVORA

HEMATOLOŠKI	Kompletan hematološki odgovor CHR Leukociti < 10x10 ⁹ /l Bazofili < 5% Bez mijelocita, promijelocita mijeloblasta u DKS trombociti < 450x10 ⁹ /l slezena se ne palpira
CITOGENETSKI	Kompletni CCgR nema Ph+metafaza Djelomični PCgR 1-35% Ph+metafaza Mali mCgR 36-65% Ph+metafaza Minimalni minCgR 66-95% Ph+metafaza Bez citog. odgovora noCgR >86% Ph+ metafaza
MOLEKULARNI	Potpuni CMoR nedetektabilni RQ-ili RT-PCR u dva uzastopna uzorka Veliki MMoR bcr-abl/abl (IS) <0,1%

ELN, Blood 2006; 108: 1809-1820
ELN panel June 6, 2009; J.Clin.Oncol. 2009

Tablica 1.

ELN-KML-1. kronična faza, procjena terapijskog odgovora na imatinib 2009

	OPTIMALNI ODGOVOR	SUBOPTIMALNI ODGOVOR	NEUSPJEH	OPREZI
Pri dg.	NA	NA	NA	Visoki rizik - CCA/Ph+
3 mj.	-CHR, i najmanje minor CgR (Ph+≤65%)	-bez CgR (Ph+95%)	-manje od CHR	NA
6 mj.	najmanje PCgR (Ph+≤35%)	-manje od PCgR (Ph+>35%)	-bez CgR (Ph+95%)	NA
12 mj.	-CCgR	-PCgR (Ph+≤35%)	-manje od PCgR (Ph+>35%)	-manje od MMoR
18 mj.	-MMoR	-manje od MMoR	-manje od CCgR	NA
Bilo kad	-stabilan ili poboljšani MMoR	-gubitak MMoR -mutacije*	-gubitak CHR -gubitak CCgR -mutacije** CCA/Ph+	-svaki porast bcr-abl transkripta CCA/Ph-

ELN, Blood 2006; 108: 1809-1820
ELN panel June 6, 2009; J.Clin.Oncol. 2009

Tablica 2.

KML- PREPORUKE LIJEČENJA, KRONIČNA FAZA

	2006	2009
1.LINIJA	-Imatinib -Allo HSCT u odabраних bolesnika	-Imatinib 400 mg dnevno
2.LINIJA IMATINIB-NEPODNOŠENJE	IFN α +LD AraC Allo HSCT	Dasatinib ili nilotinib
2.LINIJA IMATINIB- NEUSPJEH	Imatinib povećanje doze Allo HSCT	Dasatinib ili nilotinib Allo HSCT u odabраних bolesnika Allo HSCT u bolesnika nakon neuspjeha dasatinibom ili nilotinibom
2.LINIJA IMATINIB- SUBOPTIMALNI ODGOVOR	Imatinib-povećanje doze Allo HSCT u odabраних bolesnika	Imatinib povećanje doze Imatinib ista doza Nilotinib ili dasatinib (istraživački protokoli)

ELN, Blood 2006; 108: 1809-1820
ELN panel June 6, 2009; J.Clin.Oncol. 2009

Tablica 3.

PREPORUKE ZA HLA PRETRAŽIVANJE NESRODNIH
DAVATELJA HEMATOPOETSKIH MATIČNIH STANICA

2009	Traženje HLA identičnog nesrodnog davatelja ako nije nađen srodni
Pri dijagnozi	•Kod bolesnika koji su pri dg u AP/BP,
Nakon neuspjeha liječenja imatinibom	•Kod progresije u AP/BP, •Mutacije T315I •Hematološke rezistencije na imatinib
Tijekom ili nakon liječenja drugom generacijom TKI	•Kod svih bolesnika nakon neuspjeha s TKI •Kod bolesnika s suboptimalnim odgovorom na TKI i EBMT rizikom 0-2

ELN panel June 6, 2009; J.Clin.Oncol. 2009

Tablica 6.

KML- PREPORUKE LIJEČENJA, UZNAPREDOVALE FAZE (AP,BP)

	2006	2009
1.LINIJA, BOLESNICI KOJI NISU UZIMALI IMATINIB	-Imatinib ili drugi TKI potom Allo HSCT	• Allo HSCT, predtretman s imatinibom 600- 800mg ili drugim TKI (ako su prisutne mutacije rezist. na imatinib)
2.LINIJA IMATINIB REZISTENTNI		• Allo HSCT, predtretman s nilotinibom ili dasatinibom

ELN, Blood 2006; 108: 1809-1820
ELN panel, 2009; J.Clin.Oncol. 2009

Tablica 4.

PREPORUKE ZA ALOGENIČNU HSCT

	2009
PRI DIJAGNOZI	Kod bolesnika koji su pri dijagnozi u AP/BP, preporuča se predtretman s TKI
NEUSPJEH IMATINIBOM	Kod bolesnika koji su razvili AP/BP, preporuča se predtretman s 2. gen.TKI -mutacija T315I
NEUSPJEH 2.GENERACIJE TKI	Kod svih podobnih bolesnika

ELN panel June 6, 2009; J.Clin.Oncol. 2009

Tablica 7.

PREPORUKE ZA HLA PRETRAŽIVANJE SRODNIH
DAVATELJA HEMATOPOETSKIH MATIČNIH STANICA

2009	Traženje HLA identičnog srodnog davatelja
Pri dijagnozi	•Kod bolesnika koji su pri dg u AP/BP, •djeci i adolescentima do 20 god, • bolesnicima čija KML pri dijagnozi zahtjeva oprez
Neuspjeh liječenja imatinibom	Kod svih podobnih bolesnika

ELN panel June 6, 2009; J.Clin.Oncol. 2009

Tablica 5.

Anagrelid u liječenju mijeloproliferativnih bolesti – iskustva KBC Zagreb

Ana Boban, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: bobanana@gmail.com

Anagrelid je derivat imidazokinazolina, a smanjuje broj trombocita djelujući inhibitorno na proliferaciju i sazrijevanje megakariocita. Budući da ne djeluje citostatski već selektivno pogađa trombocitnu lozu, hematološke nuspojave poput anemije i leukopenije se viđaju vrlo rijetko. Zbog ovih je obilježja pogodan u liječenju kroničnih mijeloproliferativnih bolesti u kojima dominira trombocitemija. Ovdje ćemo prikazati naša iskustva u liječenju anagrelidom.

U razdoblju od 2002. do 2009. godine u Zavodu za hematologiju KBC-a Zagreb anagrelidom je ukupno liječeno 34 bolesnika. Zbog nedostatka svih podataka, o ovom ćemo osvrtno analizirati 29 bolesnika. Karakteristike bolesnika pokazuje Tablica 1. Dijagnoza esencijalne trombocitemije (ET) i kronične mijeloične leukemije (KML) je postavljena na temelju standardnih dijagnostičkih kriterija. Većina bolesnika (28) je ranije bila liječena hidroksiurejom, u monoterapiji ili u kombinaciji s interferonom ili imatinibom. Svi bolesnici s KML-om su primili imatinib. Samo je jedan bolesnik u prvoj liniji bio liječen monoterapijom interferonom. Terapiju anagrelidom smo započeli dozom od 1,0 mg/dan kroz 5-7 dana, nakon čega je liječenje nastavljeno onom dozom koja je pokazala željenu djelotvornost uz prihvatljivu toksičnost. Maksimalna primijenjena doza bila je 2,0 mg/dan. Devet bolesnika je zbog slabog odgovora na terapiju uz anagrelid dobivalo i hidroksiureju. Bolesnici koji su prije uključivanja anagrelida uzimali acetilsalicilnu kiselinu nastavili su s antiagregacijskom terapijom. Anagrelid je primijenjen u peroralnom obliku, podijeljen u dvije do tri dnevne doze, uz redovne ambulantne kontrole jednom mjesečno kroz tri mjeseca, a potom jednom svaka tri mjeseca. Odgovor na liječenje procijenjen je u onih bolesnika koji su primali terapiju kroz barem 3 mjeseca. Smanjenje broja trombocita na vrijednosti manje od $450 \times 10^9/L$ ocijenili smo kao povoljan odgovor, a smanjenje broja trombocita na vrijednosti manje od $700 \times 10^9/L$ kao djelomično povoljan odgovor. Broj trombocita veći od $700 \times 10^9/L$, te svaku pojavu tromboze ili epizodu krvarenja shvatili smo kao nepovoljan odgovor na liječenje.

Rezultate liječenja prikazuje Tablica 2. Trajanje liječenja je bilo 1-72 mjeseca, medijan je bio 12 mjeseci.

Prosječna doza lijeka je bila $3 \times 0,5$ mg. Za postizanje terapijskog odgovora bilo je potrebno između mjesec dana i 7,5 mjeseci, medijan 4 mjeseca. Tijekom praćenja bolesnika nije bila zabilježena niti jedna arterijska niti venska tromboza. Terapiju je prekinulo ukupno 8 bolesnika. Razlog prekida uzimanja anagrelida je bila pojava nuspojava u 5 bolesnika, transformacija bolesti i pojava druge maligne bolesti u po jednog bolesnika, dok je jedna bolesnica prekinula uzimanje anagrelida zbog planiranja trudnoće. Najčešće su bile nuspojave gastrointestinalnog trakta, zatim one središnjeg živčanog sustava, te pojava anemije u 2 bolesnika (Tablica 3.). Ozbiljna nuspojava je zabilježena u samo jednog bolesnika koji je razvio akutni pankreatitis.

Pokazali smo da je anagrelid učinkovit lijek u liječenju ET u bolesnika koji ne reagiraju na hidroksiureju. Lijek se pokazao sigurnim, uz rijetku pojavu ozbiljnih nuspojave, te je dobro prihvaćen od strane bolesnika. Temeljem navedenih rezultata možemo zaključiti da je anagrelid djelotvoran lijek u drugoj odnosno trećoj liniji terapije trombocitoza u mijeloproliferativnim bolestima, posebice ET.

Bolesnici		29
Spol	M	27
	Ž	2
Dob (godine) raspon (medijan)		22-75 (54)
Dijagnoza	ET	26
	KML	3

Tablica 1.

Odgovor	Broj bolesnika, %
Povoljan odgovor	10/24, 42%
Djelomično povoljan odgovor	7/24, 29%
Nepovoljan odgovor	7/24, 29%

Tablica 2.

Nuspojava	Broj bolesnika	Prekid liječenja
Hematološke	anemija	2
	leukopenija	0
Gastrointestinalne	mučnina	2
	bolovi u žličici	2
	pankreatitis	1
Središnji živčani sustav	glavobolja	2
		da/ne
Kardiovaskularne	lupanje srca	1
		da
Neuromuskularni sustav	žarenje ruku	1
		da

Tablica 3.

Literatura:

1. Boban A, Sertić D, Radman I, Zupančić-Šalek S, Zadro R, Labar B. Anagrelide u liječenju bolesnika s esencijalnom trombocitemijom. Liječ Vjesn. 2008;130(5-6):141-5.

Registar oboljelih od multiplog mijeloma

Josip Batinić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: batinic.josip@gmail.com

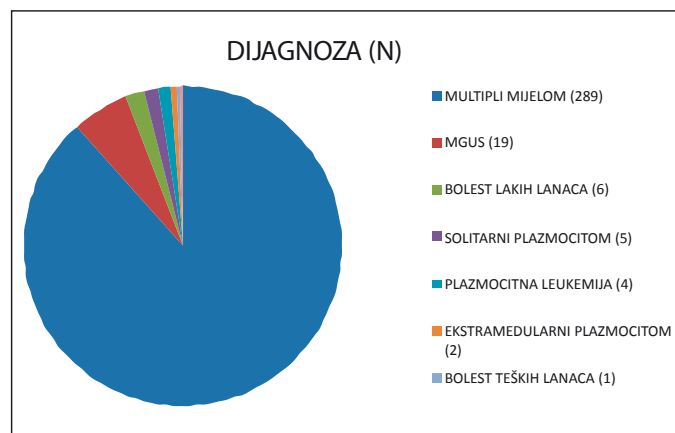
Registar oboljelih od multiplog mijeloma i drugih poremećaja plazma stanica započeo je s aktivnim radom u listopadu 2008. godine, te je, uzevši u obzir početne, tehničke nedostatke, početak rada registra bio poprilično dobar i obećavajući i u prvih mjesec dana u registar su upisani podaci za 71 bolesnika iz sedam centara. Od tada, registar je više puta bio predstavljan na različitim sastancima, uključujući i sastancima Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (Krohem), na kojima se izvještavalo o stanju u registru, raspravljalo se o eventualnim nedostacima i načinima kako unaprijediti registar, a ujedno i motiviralo sudionike na aktivno sudjelovanje u izradi i popunjavanju registra.

Sada, godinu i pol dana nakon početka rada, u registar su uneseni podaci za ukupno 327 bolesnika, iz jedanaest centara od ukupno dvadeset, kako je prikazano u tablici.

CENTAR	BROJ UPISANIH BOLESNIKA
KBC Zagreb	105
OB Koprivnica	37
KB Dubrava	35
KBC Split	31
KBC Osijek	22
OB Šibenik	22
OB Varaždin	21
KB Merkur	20
KBC Rijeka	17
KB "Sestre milosrdnice"	9
OB Slavonski Brod	8
UKUPNO	327

Obzirom da je broj od 327 bolesnika reprezentativan, odlučili smo učiniti osnovnu, deskriptivnu, statističku analizu, s ciljem dobivanja detaljnijeg uvida u bazu podataka i uočavanja eventualnih nedostataka, uzimajući u obzir činjenicu da je podatke upisala samo polovica centara zbog čega rezultati analize ne mogu predstavljati i epidemiološke podatke za cijelu Hrvatsku. Analizom smo dobili sljedeće podatke: u najvećeg broja bolesnika postavljena je dijagnoza multiplog mijeloma (289), slijedi dijagnoza mono-

klonalne gamapatije neutvrđenog značenja - MGUS (19) te bolest lakih lanaca (6), dok su ostale dijagnoze iz skupine poremećaja plazma stanica zastupljene sporadično ili s malim brojem slučajeva (Slika 1.).



Slika 1.

U registar je upisano više bolesnika (178) nego bolesnika (149). Raspon dobi bolesnika iznosio je od 38 godina do 89 godina, s medijanom dobi od 64,8 godina. Prema dobi bolesnike smo svrstali u dvije velike skupine; na mlađe od 65 godina kojih je upisano 147, i na starije od 65 godina, kojih je upisano 174; što se odražava i na podatak o terapijskom pristupu tj. jesu li ili nisu kandidati za liječenje transplantacijom. Bolesnika koji su ocijenjeni kao kandidati za transplantaciju upisano je 139, a onih koji to nisu 188. Od ukupnog broja upisanih, preminulo je 59, i u većine njih uzrok smrti bila je infekcija (48). Pomnije analizirajući i uspoređujući podatke, osobito one o dobi i podatke o liječenju transplantacijom, uočili smo neke nelogičnosti i/ili greške, kao što su: neki preminuli bolesnici su označeni kao kandidati za transplantaciju, pojedini bolesnici mlađi od 65 godina nisu kandidati za transplantaciju (možda zbog komorbiditeta?), dok neki stariji jesu i slično.

Nadamo se da će ovaj tekst doprinijeti kako točnijem i uspješnijem upisivanju podataka u registar, tako i zajedničkom rješavanju postojećih i budućih nedostataka, i motivirati centre koji još ne sudjeluju aktivno u registru da to i učine, odnosno centre koji već upisuju podatke da to nastave činiti. Na kraju podsjećamo Vas još jednom na internetsku stranicu na kojoj se nalazi registar, www.mijelom.net, i na adresu elektroničke pošte na koji možete slati svoje prijedloge i pitanja vezane uz registar (podrska@mijelom.hr).

Uloga rituksimaba u liječenju indolentnih limfoma u relapsu

Doc. dr. sc. Antica Duletić-Načinović, dr. med.

Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju

Klinički bolnički centar Rijeka

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: antica.duletic-nacinovic@ri.t-com.hr

Jedan od najčešćih indolentnih limfoma je folikularni limfom (FL) stoga ga često uzimaju kao primjer za indolentne limfome. Češći je u starijih osoba, medijan dobi je 60 godina. Karakterizira ga spori rast, i početno visoka stopa odgovora na terapiju, ali se obično nakon nekog vremena potvrdi relaps bolesti i bolest progredira. Ima naizmjenični relaps/remisija tijekom bolesti. Pokazuje trend smanjenja trajanja odgovora nakon svake sljedeće linije liječenja. Medijan preživljenja je relativno dug, često oko 10 godina. Cilj liječenja je održavati bolesnike u remisiji što je moguće duže i održavati kvalitetu života. Većina folikularnih limfoma je CD20+.

Modaliteti liječenja

Folikularni limfom je neizlječiv uz standardnu terapiju. Početno liječenje omogućuje vrlo dobar terapijski odgovor s parcijalnom ili kompletnom remisijom. Vrlo agresivno liječenje, kao i mijeloablativna terapija s transplantacijom koštane srži može izliječiti samo neke bolesnike, ali ovakvo liječenje najčešće je nemoguće primijeniti kod većine bolesnika.

Standardna prva linija liječenja simptomatskih folikularnih limfoma je kemoterapija (COP, CHOP, fludarabin, klorambucil). Uključivanjem anti-CD20 protutijela (rituksimaba) gore navedenoj kemoterapiji potvrđen je značajno bolji terapijski odgovor, trajanje odgovora, preživljenje bez progresije i ukupno preživljenje, što je potvrđeno u više randomiziranih studija (1-3). Nažalost, bolesnici su i nakon imunokemoterapije skloni relapsu, iako su potvrđeni kasniji relapsi u odnosu na ranije liječenje samo kemoterapijom.

Liječenje prvog relapsa

Kod kasnog relapsa folikularnog limfoma moguće je primijeniti više modaliteta liječenja: ponovno ponavljanje primarnog liječenja, primjena samog rituksimaba kao pojedinačnog lijeka (monoterapije), kombinacija rituksimaba i kemoterapije. U randomiziranoj studiji EORTC 20981 (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) bolesnici s relapsom/refraktornim folikularnim NHL su

randomizirani u grupu onih koji su primali CHOP kemoterapiju s ili bez rituksimaba. Bolesnici koji su odgovorili na indukcijsko liječenje ponovno su randomizirani u grupu onih koji su samo opservirani i one na održavanju rituksimabom svaka tri mjeseca kroz dvije godine. Ova posljednja grupa je imala medijan preživljenja bez progresije (PFS, *engl. progression-free survival*) 51.9 mjeseci u odnosu na one koji su samo opservirani čiji je median iznosio 23.1 mjeseci ($p < 0.0001$) (4). Druga studija GSLG (*German Low-grade Lymphoma Study Group*) liječila je bolesnike FCM kemoterapijom (fludarabin, ciklofosfamid, mitoksantron). Bolesnici koji su odgovorili na terapiju se potom randomiziraju u grupu bolesnika koji se samo opserviraju i grupu koji jednom kroz četiri tjedna u trećem i devetom mjesecu primaju rituksimab. Rezultati potvrđuju da medijan trajanja odgovora nije postignut za bolesnike koji su bili na održavanju rituksimabom, dok je oko 26 mjeseci za one koji su samo opservirani ($p = 0.035$) (5).

Liječenje drugog relapsa

Coiffier i suradnici potvrđuju da su bolesnici u drugom relapsu indolentnog limfoma u kojih je provedeno liječenje ili samo rituksimabom ili rituksimabom plus kemoterapija odgovorili na liječenje s 42% kompletnih i 51% parcijalnih remisija. Potvrđen je duži medijan vremena do ponovne progresije (TTP, *engl., time to progression*) u odnosu na predhodni relaps (6). Slične rezultate potvrđuju i Lemaux i suradnici.

Terapija održavanja rituksimabom u indolentnih limfoma i terapija održavanja nakon relapsa

Ciljevi terapije održavanja su:

- održati remisiju – jer produžena remisija predviđa i bolje ukupno preživljenje (OS, *engl., overall survival*) (7)
- unaprijediti kvalitetu odgovora (PR-CR)
- eradicirati minimalnu rezidualnu bolest (MRD) i tako potencijalno povećati OS

Pretpostavlja se da se opravdanost terapije održavanja rituksimabom bazira na: kontroli preostalih malignih stanica i poboljšanju preživljenja (izlječenje se smatra nemogućim u indolentnom NHL; odgoditi sljedeću kemoterapiju što je moguće više), minimalnom remećenju svakodnevnog života (dobra dugoročna sigurnost, minimalne akutne nuspojave, prikladnosti primjene). Tablica 1. prikazuje

ključne studije u kojima je potvrđena svrsishodnost terapije održavanja rituksimabom.

Više studija je potvrdilo važnost terapije održavanja rituksimabom kod bolesnika s indolentnim limfomom u relapsu. Studija EORTC 20981 potvrđuje da je kod 465 bolesnika s folikularnim limfomom u relapsu indukcijska terapija R-CHOP-om superiorna prema CHOP-u i u stopi odgovora i u PFS. Terapija održavanja je superiorna prema opservaciji u PFS-u (kod svih bolesnika, i u svim podskupinama bolesnika bilo da su postigli CR, PR, ili su liječeni R-CHOP-om ili samo CHOP-om). Terapija održavanja poboljšava OS (i kod onih koji su postigli CR ili onih sa PR, nakon R-CHOP ili samo CHOP) (4).

Također i studija grupe GSLG potvrđuje da terapija održavanja rituksimabom rezultira značajnim poboljšanjem PFS-a u usporedbi s opservacijom ($p=0.001$) uz trend poboljšanja ukupnog preživljenja (OS) (3-god stopa 82% vs 55%; $p=0.056$) i da je stopa ozbiljnih infekcija slična u obje grupe (5).

Terapija održavanja rituksimabom versus ponovno liječenje

Tablica 2. prikazuje modalitete terapije održavanja. Terapija održavanja rituksimabom u bolesnika s FL u relapsu značajno poboljšava PFS i OS u usporedbi s opservacijom. Korist je postignuta bez obzira jesu li bolesnici u indukcijskom liječenju primali rituksimab kao monoterapiju, samo kemoterapiju ili rituksimab+ kemoterapiju. Pozitivni učinak terapije održavanja R-om na PFS i OS je također potvrđen i u prvoj liniji nakon indukcije rituksimabom kao monoterapije ili kemoterapijom. Terapija održavanja rituksimabom se dobro podnosi bez kumulativne toksičnosti tijekom vremena.

Sažetak: Rituksimab monoterapija je učinkovita i dobro podnošljiva u liječenju relapsa indolentnog (folikularnog) limfoma. Rituksimab + kemoterapija poboljšava PFS i OS u odnosu na samu kemoterapiju. Ponovno liječenje rituksimabom ili rituksimabom + kemoterapijom donosi daljnju korist bolesnicima. Rituksimab može imati ulogu u ASCT kod nekih bolesnika s FL u poboljšanju CR. Terapija održavanja rezultira značajnim produljenjem PFS i OS u usporedbi s opservacijom.

Na tablicama 3-5. prikazani su naši bolesnici s indolentnim NHL-om liječeni R+kemoterapija od 2005. do 2008.

I na kraju možemo zaključiti da su razlozi liječenja relapsa indolentnog NHL-a rituksimabom + kemoterapijom sljedeći:

- benefit prikazan u predhodnim studijama
- Hrvatski konsenzus
- indikacija odobrena od HZZO-a (Osnovna lista lijekova).

Terapija održavanja rituksimabom u FL: ključne studije			
Study/group	Trial design	Setting (line)	Study induction
Minnie Pearl ^{1*}	Phase II	1st	Rituximab
SAKK 35/98 ²	Phase III	1st/2nd	Rituximab
Minnie Pearl ^{2†}	Phase II	2nd	Rituximab
ECOG 1496 ⁴	Phase III	1st	CVP
EORTC 20981 ⁵	Phase III	2nd	CHOP ± rituximab
GLSG ^{6,7‡}	Phase III	2nd	FCM ± rituximab

*Included patients with small lymphocytic lymphoma; †Randomized – maintenance versus retreatment; ‡Included patients with mantle cell lymphoma (MCL)

¹Hairerworth JD, et al. J Clin Oncol 2002;20:4261-7; ²Chhikara M, et al. Blood 2004;103:4418-23
³Hairerworth JD, et al. J Clin Oncol 2005;23:1885-95; ⁴Wochner HS, et al. Proc Am Soc Clin Oncol 2004;22:154 (Abstract 4502); ⁵Van Gorp M, et al. Blood 2004;104:1816a (Abstract 1881)
⁶Hodgson W, et al. Proc Am Soc Clin Oncol 2005;23:566a (Abstract 4527)
⁷Dreyling M, et al. Proc Am Soc Clin Oncol 2006 (Abstract 7502)

Tablica 1. Terapija održavanja rituksimabom u FL: ključne studije

Tipovi terapije održavanja: svi pokazuju značajno poboljšani ishod		
Studija	Raspored	Ishod
Th održavanja nakon indukcije: rituksimab kao monoterapija		
SAKK 35/98	1 doza svaka 2 mjeseca x 4	EFS (medijan) 23.2 vs 11.8 mjeseci
Minnie Pearl	4 doze svakih 6 mjeseci 2 godine	PFS (medijan) 31.3 vs 7.4 mjeseca
Th održavanja nakon indukcije: kemoterapija		
E1496	4 doze svakih 6 mjeseci 2 godine	PFS (medijan) 61 vs 15 mjeseci
Th održavanja nakon indukcije: rituksimab + kemoterapija		
EORTC 20981	1 doza svaka 3 mjeseca 2 godine	PFS (medijan) 51.6 vs 15 mjeseci
GLSG	4 doze na 3 i 9 mjeseci	DR (medijan) NR vs 17 mjeseci

Tablica 2. Tipovi terapije održavanja u indolentnih limfoma

Karakteristike bolesnika sa indolentnim NHL-om liječenih (R+kemoterapija) od 2005. do 2008.	
Broj bolesnika	83
Doz (god.)	
Raspon	29-89
Medijan	61
Spol	
M : Ž	42:41
Histološki podtipovi	
Folikularni	20
Marginalne zone	13
Limfoplazmocitoidni	16
Malić limfocita	15
MALT	8
Neklasificirani	11
II simptomi	
Da	39 (47%)
Ne	44 (53%)
LDH	
>	37 (45%)
Norm	46 (55%)
IP	
0-2	40 (48%)
3-5	43 (52%)
ECOG	
≤ 2	51 (61%)
≥ 2	32 (39%)

Tablica 3. Karakteristike bolesnika s indolentnim NHL-om liječenih u KBC Rijeka

Liječenje bolesnika sa indolentnim NHL (praćenje max. 43 mj.)	
1. Terapija kod 83 bolesnika:	
R-CVP (59 bolesnika, 71%)	
R-CHOP (24 bolesnika, 29%)	
2. Prva terapija rituksimabom:	
12 bolesnika (14,5%) je prvi R dobilo u relapsu bolesti	
71 bolesnik (85,5%) prvi R primio pri postavljanju dijagnoze	
3. Odgovor na terapiju:	
CR + PR = 69 bolesnika (83% bolesnika)	
Umrlo tijekom terapije 7 bolesnika (8,4%)	
SD + progresija: 7 bolesnika (8,4%)	

Tablica 4. Liječenje bolesnika s indolentnim NHL-om u KBC Rijeka

Liječenje bolesnika sa indolentnim NHL (praćenje max. 43 mj.)	
4. Relaps bolesti potvrđen u:	
24 bolesnika (29%): II relaps 20 bolesnika + III relaps 4 bolesnika	
Umrlo tijekom praćenja 14 bolesnika (16,9%)	
5. Terapija održavanja:	
3 bolesnika završila terapiju održavanja nakon CR - sada bez znakova bolesti	
4 bolesnika su u tijeku terapije održavanja nakon prve CR	
2 bolesnika su u tijeku terapije održavanja nakon CR inače liječenja relapsa bolesti	

Tablica 5. Liječenje bolesnika s indolentnim NHL-om u KBC Rijeka

Literatura:

1. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 2005;105: 1417–1423.
2. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Front-line therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome of patients with advanced stage follicular lymphomas as compared to CHOP alone - results of a prospective randomized study of the German low grade lymphoma study group (GLSG). *Blood*. 2005;106: 3725–3732.
3. Herold M, Pasold R, Srock S, et al. Results of a prospective randomised open label phase III study comparing rituximab plus mitoxantrone, chlorambucil, prednisolone chemotherapy (R-MCP) versus MCP alone in untreated advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and mantle-cell-lymphoma (MCL). *Blood*. 2004;104 (Suppl 11): 169a, Abstract 584a.
4. Van Oers MHJ, Van Glabbeke M, Teodorovic I, et al. Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab; Mabthera) in remission induction and maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma: final analysis of a phase III randomised intergroup clinical trial. *Blood*. 2006;108:3295-3301.
5. Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, et al. Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (R-FCM) in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas – Results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood*. 2006;108(13): 4003–4008.
6. Coiffier B, et al. *Blood* 2002;100:359a (Abstract 1390)
7. Vidal L, Gafter-Gvili A, Leibovici L, et al. Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(4):248-55.

Kronična limfocitna leukemija

**Branimir Jakšić¹, Vlatko Pejša²,
Ika Kardum-Skelin³, Sandra Bašić-Kinda⁴,
Petra Korać⁵, Radovan Vrhovac¹, Ozren Jakšić²**

*1-Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
Klinička bolnica Merkur, Zagreb*

*2-Odjel hematologije, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička
bolnica Dubrava, Zagreb*

*3-Laboratorij za citologiju i hematologiju,
Klinička bolnica Merkur, Zagreb*

*4-Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb*

*5-Zavod za patologiju i citologiju,
Klinička bolnica Merkur, Zagreb*

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Branimir Jakšić, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,

Klinička bolnica Merkur i Medicinski fakultet Sveučilišta u
Zagrebu

E-pošta: bjaksic@mef.hr

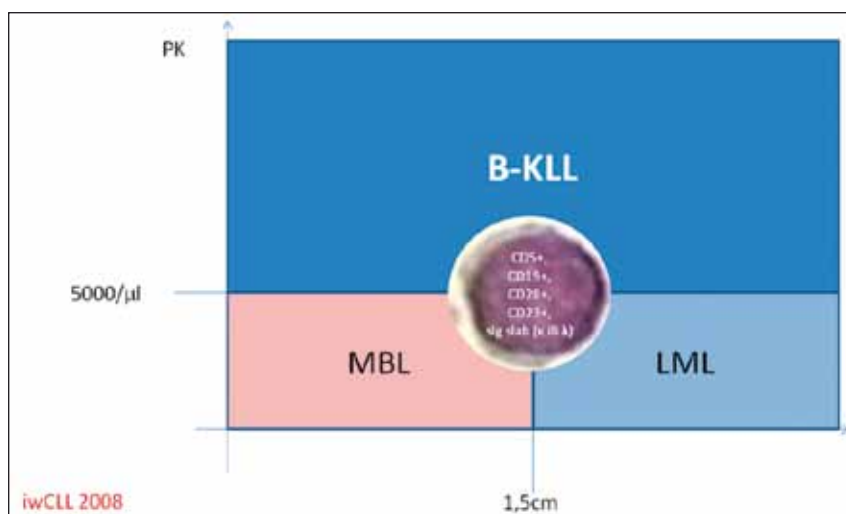
Ovaj tekst je sinopsis izlaganja članova pododborna za KLL na redovitom sastanku u Osijeku 06.11.2009. Prikazi su dijelom temeljeni na tekstu koji je tiskan u prošlom broju Biltena, s ciljem da se istaknu dileme oko mogućih prijedornih točaka i aktualnih kontroverzi s jedne strane, a s druge strane da se prikažu i velike mogućnosti zajedničkog djelovanja u okviru Krohema kako u standardnoj dijagnostici i liječenju tako i u istraživačkim pristupima. Izvjestitelji pojedinih dionica u ime grupe navedeni su u zgradama, tekstove su za ovaj Bilten priredili izvjestitelji, a određene uredničke zahvate u tekstu izvršio je B. Jakšić. Struktura prikaza na plenarnom sastanku obuhvaćala je:

1. Uvodne napomene i Registar KLL (B. Jakšić)
2. Priprema hrvatskog konsenzusa
 - 2.1. Dijagnostika
 - 2.1.1. Dijagnostika i klasifikacija tipa bolesti (minimalna, optimalna, istraživačka)
 - 2.1.1.1. Protočna citometrija (O. Jakšić)
 - 2.1.1.2. Molekularna dijagnostika (P. Korać)
 - 2.1.1.3. Morfologija i kinetika (I. Kardum-Skelin)
 - 2.1.2. Ostala dijagnostika (B. Jakšić)
 - 2.2. Terapijski pristup
 - 2.2.1. Ciljevi terapije i kada liječiti (B. Jakšić)
 - 2.2.2. Terapije za prvu liniju i terapija relapsa/progresije (V. Pejša)
 - 2.2.3. Istraživačke terapije (O. Jakšić)
 - 2.2.4. Profilaksa i liječenje infekcija (R. Vrhovac)
3. Prijedlozi istraživanja
 - 3.1. Obrazloženje i razrada projekta „Istraživanje progresije/ Evolucije B-KLL-a - KROHEM-KLL01“ (O. Jakšić)
4. Rasprava

UVODNE NAPOMENE I REGISTAR KLL

Branimir Jakšić

Tekst u Biltenu broj 2 prikazuje definiciju nozoloških cjelina koje obuhvaća rad pododbora te evoluciju od tradicionalnih prema suvremenim klasifikacijama KLL. Današnja klasifikacija temelji se na tipičnom imunofenotipu te na osnovu kombinacije imunološkog fenotipa i raspodjele tumorske mase raspoznaje tri entiteta tipičnog fenotipa (MBL, KLL i LML), shematski prikazano na Slici 1.



Slika 1. Razvrstavanje u nozološke entitete. B-KLL: B kronična limfocitna leukemija; MBL: monoklonalna B limfocitoza; LML: limfom malih limfocita; na ordinati je razdjelnica apsolutnog broja klonalnih limfocita tipičnog fenotipa koji je prikazan na slici limfocita; na apscisi je razdjelnica na temelju veličine limfnog čvora.

Registar

Smatramo da bi za sve grupe bolesti bilo potrebno u okviru Krohema zadržati: (1) Osnovni zajednički ulaz u kojem bi bili osnovni demografski podaci te liječnik (ustanova) koji prijavljuje u registar. (2) Pridruživanje u registar KLL temeljit će se na temelju prisutnosti (a) minimalnih kriterija za klasifikaciju, a uz to (b) predviđena je proširena obrada s ciljem prikupljanja čim više podataka (uključujući banku uzoraka). (3) Za longitudinalno praćenje bit će odabrani jednostavni, pouzdani pokazatelji te definirane fiksne vremenske točke za praćenje evolucije prethodno definiranim kriterijima ocjenjene točke moguće kvalitativne statusne promjene.

Priprema hrvatskog konsenzusa – Dijagnostika PROTOČNA CITOMETRIJA

Ozren Jakšić

B-KLL imunofenotip

B-stanična kronična limfocitna leukemija (B-KLL) je prema iwCLL i SZO definirana tipičnim imunofenotipom:

- B-stanični (CD19+CD20+CD23+sIg^{slab}) klonalni poremećaj (restrikcija kappa ili lambda)
- uz koekspresiju CD5 (T-biljeg)
- ekspresija CD23 (LPZ CD23-)
- slab CD20, CD79b, negativan CD10

Monoklonalnu B-limfocitozu (MBL) i limfom malih limfocita (LML) obilježava isti imunofenotip (te su prema SZO dio istog nozološkog entiteta), no različiti je stupanj zahvaćanja pojedinih odjeljaka, odnosno razina i tip limfocitoze (limfocitoza, B-limfocitoza, klonalni B-limfociti) te veličina i zahvaćenost limfnih čvorova (Slika 1.).

DIJAGNOZA

Obzirom da se dijagnoza temelji na imunofenotipu, metode za njegovo određivanje imaju središnje mjesto u dijagnostici B-KLL-a. Najčešće primjenjivane su metode protočne citometrije te imunohistokemije (imunocitokemije). Metoda protočne citometrije osobito je prikladna zbog brzine, osjetljivosti, analize velikog broja stanica te istovremenog određivanja više biljega na istim stanicama, no zbog relativno skupe opreme dostupna je samo u većim centrima. Protočna citometrija uzorka periferne krvi dostatna je za dijagnozu, no mogu se analizirati i uzorci koštane srži ili drugih tkiva. Preporučeni dijagnostički panel za protočnu citometriju je kappa/lambda, CD19, CD20, CD5, CD23 i CD10. Također

je važno odrediti i apsolutni broj B-limfocita što je kriterij za dijagnozu prema iwCLL te za distinkciju prema MBL i LML. Metoda koja također omogućuje određivanje imunofenotipa je metoda imunohistokemije odnosno imunocitokemije koja je dostupna većem broju centara. Preporučeni dijagnostički panel za ove metode je CD3, CD5, CD10, CD20, CD23 i ciklin D1.

PROGNOZA

Velik broj staničnih biljega pokazao je svoju vrijednost u prognozi B-KLL-a među kojima se ističu kao osobito važni CD38 i/ili ZAP-70 zbog svoje važnosti u biologiji B-KLL-a i zbog određene povezanosti s mutacijskim statusom varijabilnih regija imunoglobulinskih gena. Stupanj standardizacije određivanja metodama protočne citometrije te određivanja razina pozitivnosti zaslužuje preporuku za njihovo rutinsko određivanje, no uz napomenu o postojanju određenih problema (prije svega pri određivanju unutarstaničnog biljega ZAP-70).

ISTRAŽIVAČKI

Veliki broj površinskih i unutarstaničnih molekula koje imaju važnu ulogu u biologiji B-KLL-a moguće je odrediti metodama protočne citometrije poput već spomenutih CD38 i ZAP-70, adhezijskih molekula (CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD31, CD49c, CD49d, CD50, CD56, CD61, CD62L, CD102), kemokinskih receptora (CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7), biljega proliferacije i apoptoze (Ki-67, bcl-2, p53, akt-1, survivin, p27) terapijskih meta (CD20, CD52, CD40, CD40L). Istraživanje njihove ekspresije (intraklonalne i interklonalne varijabilnosti) uloge u patogenetskom mehanizmu te njihove povezanosti s kliničkim tijekom omogućit će daljnje unapređivanje dijagnostičkog i terapijskog procesa u B-KLL-u.

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA B-KLL

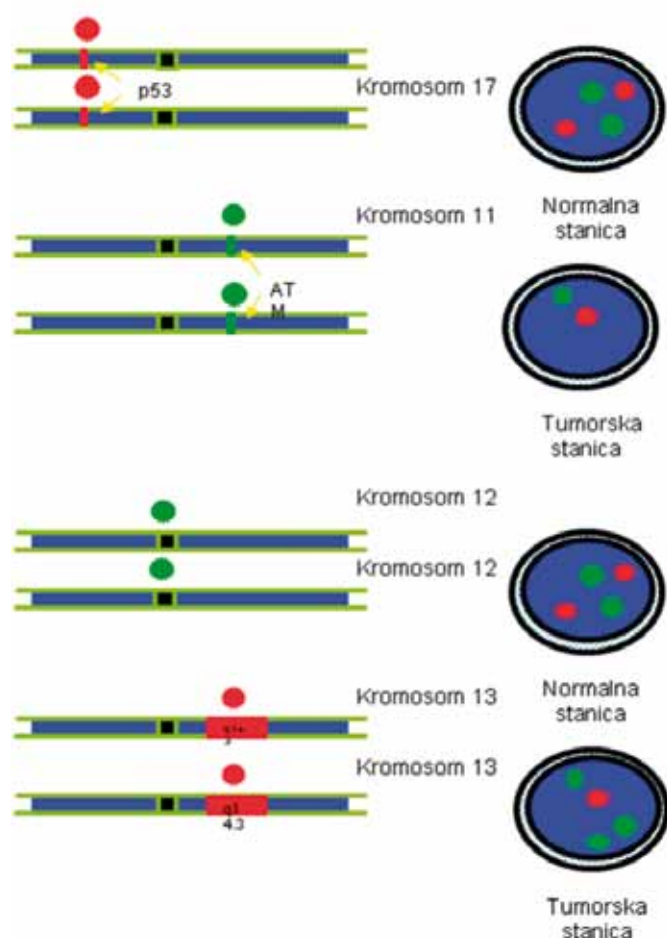
Petra Korać

U radu Döhner *et al.*, 2000. opisane su najčešće citogenetske aberacije u kroničnoj limfocitnoj leukemiji (KLL-u). Dokazano je da se promjene mogu pronaći u 82% slučajeva. Najčešće su: delecija regije 13q (55%), delecija regije 11q (18%), trisomija kromosoma 12 (16%), delecija regije 17p (7%) i delecija regije 6q (6%). Delecija 17p vezana je za lošu prognozu, a negativan prognostički značaj imaju i delecija 11q i trisomija 12. Pokazatelj bolje prognoze je delecija 13q.

Ove se promjene mogu detektirati fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom (FISH-em), koja se na našem Zavodu radi na dvije vrste uzoraka. Koriste se rezovi biopsija koštane srži fiksirane formalinom i uklopljene u parafin te razmazi aspirata koštane srži ili limfnog čvora, odnosno razmazi periferne krvi.

Budući da se histološki preparati dobivaju rezanjem tkiva uklopljenog u parafin, kod utvrđivanja numeričkih aberacija postoji opasnost lažno pozitivnih rezultata zbog odsjecanja dijela jezgara tijekom pripreme uzorka. Zato se u dijagnostici B-KLL-a najčešće koriste razmazi aspirata koštane srži. Sama se metoda izvodi prema standardnom protokolu, komercijalno dostupnom probom za KLL panel kojom je moguće detektirati deleciju regije 13q, deleciju regije 11q, trisomiju kromosoma 12 i deleciju regije 17p, kao i, također komercijalno dostupnom, probom za regiju 6q (Slika 2).

Metoda FISH sastavni je dio dijagnostičkog protokola za svaki uzorak koji na naš Zavod dolazi pod uputnom dijagnozom B-kronične limfocitne leukemije.



Slika 2. Detekcija numeričkih aberacija gena/kromosoma.

MORFOLOGIJA I KINETIKA

Ika Kardum-Skelin

Izuzevši akutnu limfatičnu leukemiju, svi ostali limfocitni leukemijski oblici svrstavaju se u kronične leukemijske limfoproliferativne bolesti (KLLPB) odnosno diseminirane oblike zrelih B ili T-limfocitnih neoplazmi, kao izrazito heterogenu grupu varijabilne kliničke slike. Tipični oblici B-KLL-a pokazuju morfologiju malih zrelih limfocita u perifernoj krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima, ekspresiju CD19, CD5 i CD23 antigena, te nisko proliferativnu aktivnost.

Medijan preživljenja varira od 2-20 godina za različite stadije bolesti. Tako nepredvidiv tijek inspirirao je, preko 30 godina, mnoge kliničke hematologe i onkologe da traže nove pokazatelje koji će predvidjeti preživljenje i progresiju bolesti te objektivizirati korist od ranog terapijskog pristupa, naročito u ranim stadijima. Zadnjih godina, ulažu se naponi kako bi se povećala dijagnostička sigurnost i dobile nove prihvatljive informacije samog procesa uvođenjem sofisticiranih kompjuterskih tehnologija. Među njima su morfometrijske karakteristike limfatičnih stanica, osobine regije nukleolarne organizacije (AgNOR) i određivanje količine DNA statičkom DNA citometrijom (ICM).

Osobine regije nukleolarne organizacije su jednostavan put za razlikovanje stanica u mirovanju od onih koje su uključene u stanični ciklus. Broj i veličina AgNOR-a korelira s razinom rDNA transkripcije, stupnjem stanične proliferacije i frakcijom tumorskog rasta, te se kvantifikacija AgNOR-a uzima kao obilježje i/ili stupnjevanje različitih tipova malignih stanica u citološkim i histološkim preparatima.

Diferenciranje AgNOR-a u tri *inovativna tipa*: homogeni, inhomogeni i prstenasti pokazuju statističku značajnost s osobinama DNA histograma i morfometrijskim karakteristikama stanice i jezgre, kao i ulogu u preživljenju, tipu distribucije tumorske mase, biološkom ponašanju tumorske bolesti te morfološkim karakteristikama limfatičnih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi.

Dugo je poznato kako je tumorska geneza često udružena s kromosomskim abnormalnostima, promjenama genoma, mjerljivim razlikama u količini DNA tzv. ploidiji i varijacijama u staničnom ciklusu neoplastičnih stanica. Količina DNA i varijacije staničnog ciklusa mogu se brzo izmjeriti protočnim citometrom te kompjuterskom, odnosno statičkom DNA citometrijom. Budući je tipična B-KLL nisko maligna neoplazma s diploidnim DNA indeksom i

niskom proliferativnom aktivnosti, u literaturi ima malo podataka o tim vrstama analiza.

U analizi DNA histograma malignih tumora diploidni tipovi histograma su smatrani kao dobri prognostički pokazatelji i kao takvi nisu detaljnije analizirani. Međutim, ako se primijenjeni novi modificirani pristup analize diploidnog tipa histograma: određivanje postotka stanica u vršku DNA histograma; postotka stanica koje sadrže manju i/ili veću količinu DNA od stanica u vršku uz već standardne karakteristike: postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa te postotak stanica s količinom DNA višom od 4N, dobiveni podaci su adekvatni za kinetičku analizu metodom statičke DNA citometrije i imaju utjecaja na preživljenje.

Na osnovu statistički značajne razlike u preživljenju bolesnika s KLLPB i B-KLL+V (Tablica 1.)

može se izdvojiti 9 najreprezentativnijih (od ukupno 41) ICM i AgNOR pokazatelja u svrhu određivanja proliferacijsko-kinetičkog indeksa (PKI) kao neovisnog prognostičkog pokazatelja, posebno za cjelokupnu populaciju KLLPB, a posebno za B-KLL+V. Statistički značajno bolju prognozu imaju bolesnici s KLLPB ($p=0,00118$) i u grupi B-KLL+V ($p=0,03589$) kad je PKI bio manji od 4.

Morfometrijske karakteristike homogenih, inhomogenih i prstenastih AgNOR-a te karakteristike diploidnog tipa histograma (u različitim odjeljcima tumorske mase (koštane srži, periferne krvi i limfnog čvora) potvrđuju hipotezu kako se i unutar relativno nisko malignih neoplazmi kao što je KLLPB i njene podskupine mogu izdvojiti prognostički lošije/bolje podskupine te predvidjeti tijek bolesti.

KOMPJUTERSKA ANALIZA	POKAZATELJI	KS		PK		LČ	
		KLLPB	B-KLL+V	KLLPB	B-KLL+V	KLLPB	B-KLL+V
IAgNOR	AGBHOM	$\leq 0,25$		$> 0,3$	$> 0,3$		
	AGSHOM (μm^2)	$\leq 0,43$		$> 0,3$	$> 0,3$		
	AGHOM/J	$\leq 0,004$	$\leq 0,004$	$> 0,002$	$> 0,002$		
	AGSINH (μm^2)	$\leq 3,5$		≤ 3	$\leq 3,1$	$\leq 3,674$	
	AGSINH/J			$\leq 0,04$	$\leq 0,047$		
	AGBPR			$\leq 0,65$	$\leq 0,65$		
	AGSPR (μm^2)			$\leq 2,3$			
	AGBUKUP	$\leq 1,6$	$\leq 1,65$	$> 1,37$			
	AGSUKUP (μm^2)	$\leq 6,4$	> 4	$\leq 6,5$	≤ 5		
	AGSUK/J	$\leq 0,07$	$> 0,06$	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$	$\leq 0,065$	
ICM	DNA%SPIK	$\leq 47 > 28,2$	$\leq 47 > 33$			> 35	
	DNA%S<PIK	> 20	> 20				
	DNA%S>PIK	≤ 55	≤ 55	≤ 45	≤ 45		
	DNA%S>4N					$\leq 2,5$	
	DNA%SFC	$> 4,1$	$> 4,1$				

Legenda:

AgNOR-srebrnom prikazane regije nukleolarne organizacije; ICM-statička DNA citometrija; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; B-KLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; AGBHOM-broj homogenih AgNOR-a; AGSHOM-površina homogenih AgNOR-a; AgSHOM/J-omjer homogenih AgNOR-a i jezgre; AGSINH-površina inhomogenih AgNOR-a; AGSMINH-najveća površina inhomogenih AgNOR-a; AGSINH/J-omjer inhomogenih AgNOR-a i jezgre; AGBPR-broj prstenastih AgNOR-a; AGSPR-površina prstenastih AgNOR-a; AGSMAPR-najveća površina prstenastih AgNOR-a; AGBUKUP-ukupan broj svih AgNOR-a; AGSUKUP-ukupna površina svih AgNOR-a; AGSUK/J-omjer ukupne površine AgNOR-a i jezgre; DNA%SPIK-postotak stanica u vršku DNA histograma; DNA%S<PIK-postotak stanica koje sadrže manju količinu DNA od stanica u vršku; DNA%S>PIK-postotak stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica u vršku; DNA%S>4N-postotak stanica koje sadrže DNA više od 4N; DNA%SFC-postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa

Tablica 1. Statistički značajni pokazatelji boljeg preživljenja AgNOR-a i statičke DNA citometrije u različitim odjeljcima tumorske mase u bolesnika s KLLPB i B-KLL+V; Kaplan-Meier, razina statističke značajnosti $p < 0,05$

OSTALA DIJAGNOSTIKA

Branimir Jakšić

Osim dijagnostike fenotipa bolesti, potrebno je proširiti dijagnostiku kako bi se odredila proširenost bolesti (klinički stadiji /Rai i Binet/ i TTM skor predstavljaju pouzdane, lako primjenjive i dobro validirane sustave kliničke procjene), a sve više se uz kliničke parametre koriste i metode oslikavanja (UZV, CT i sl.). Sustavno se određuju hematološki parametri te biokemijske pretrage, uz ostale potrebne pretrage neophodne za procjenu općeg stanja i pridruženih bolesti.

PRIPREMA HRVATSKOG KONSENZUSA – TERAPIJA

CILJEVI TERAPIJE I KADA LIJEČITI

Branimir Jakšić

Nema dvojbe da bi osnovni **cilj** svakog liječenja trebao biti izliječenje. Postavljaju se međutim pitanja: je li cilj dohvatljiv? Je li prihvatljiv rizik? Ukoliko je odgovor potvrđan na oba pitanja primjenjuje se učinkovita terapija, danas pretežno kemo-imunoterapija, a ukoliko to nije dovoljno, terapija se pojačava, uključujući metode alotransplantacije. Ukoliko se pak rizik procjenjuje prevelikim, legitimni cilj terapije može biti i postizanje remisije, stabilizacija bolesti ili održanje kvalitete života. U tom slučaju

primjenjuju se manje „agresivne“ terapijske strategije kako bi se postigla željena (ili moguća) razina terapijskog odgovora.

Sve bolesnike nakon postavljanja dijagnoze KLL nije neophodno odmah liječiti. To otvara vrlo važno pitanje postavljanja jasnih **indikacija za terapiju**. Današnje preporuke temelje se na dosadašnjim rezultatima kliničkih pokusa, tako da se radi o području koje se stalno razvija. Danas se smatra da:

- Asimptomatski bolesnici ne zahtijevaju terapiju (ovo međutim predstavlja otvoreno i važno istraživačko pitanje)
- Simptomatski (aktivni/progresivni) predstavljaju indikaciju za terapiju. Indikacija istovremeno formulira neposredne terapijske ciljeve (!) :
 - Značajni B-simptomi (jaki umor, profuzno znojenje, mršavljenje više od 10%/6 mjeseci, povišena temperatura $>38^{\circ}\text{C}$)
 - Prijetnja funkciji organa
 - Velika tumorska masa /TTM više od 9 (ili 15?)/ „Bulky“ bolest (slezena $> 6\text{ cm}$ pod LRL, limfonodi $> 10\text{ cm}$)
 - Vrijeme podvostručenja tumorske mase (TTM) ≤ 12 mjeseci ili broja limfocita ≤ 6 mjeseci
 - Zatajenje koštane srži: hemoglobin $< 100\text{g/L}$ (ili progresivna anemija) i/ili broj trombocita $< 100000/\text{mm}^3$

Ubrzano se dograđuju kriteriji, što je vidljivo u Tablici 2.

iwCLL criteria for active (progressive/symptomatic) disease (Hallek, Blood, 2008)		cat
1.	Evidence of progressive marrow failure manifested by development of, or worsening of anaemia and/or thrombocytopenia.	P
2.	Massive (ie, at least 6 cm below left costal margin) or progressive or symptomatic splenomegaly	M, P Qual
3.	Massive nodes (ie, at least 10 cm in longest diameter) or progressive or symptomatic lymphadenopathy	M, P Qual
4.	Progressive lymphocytosis with an increase of more than 50% over a 2-month period, or lymphocyte doubling time (LDT) of less than 6 months. LDT can be obtained by linear regression extrapolation of 2 week over an observation period of 2-3 months. In patients with initial blood lymphocyte counts of less than $30 \times 10^9/\text{L}$ LDT should not be used as single parameter to define a treatment indication. In addition, factors contributing to lymphocytosis or lymphadenopathy other than CLL (eg, infections) should be excluded.	P
5.	Autoimmune anemia and/or thrombocytopenia that is poorly responsive to corticosteroids or other standard therapy	M Qual
6.	Constitutional symptoms defined as any one or more of the following disease related symptoms and signs: - Unintentional weight loss of 10% within the previous 6 months; - Significant fatigue (ie, ECOG PS 2 or worse; inability to work or perform usual activities); - Fevers $>38^{\circ}\text{C}$ for 2 or more weeks without other evidence of infection; or - Night sweats for more than one month without evidence of infection	M Qual
Hypogammaglobulinemia or monoclonal or oligoclonal paraproteinemia nor absolute lymphocyte count do not by themselves constitute indication for therapy.		

Tablica 2. Kriteriji za aktivnu/progresivnu bolest prihvaćeni od iwCLL 2008. U tablicu je dodana procjena kategorizacije pri čemu „M“ označuje kvantitativnu kategoriju, „P“ označuje kriterije koji procjenjuju progresivnost te „Qual“ označuju kvalitativnu kategorizaciju.

Na temelju rezultata dosadašnjih kliničkih pokusa uobičajena je **stratifikacija za terapiju**:

- Stratifikacija prema FISH nalazu (može poslužiti izbjegavanju neučinkovitih terapija):
 - Bez del 17p
 - del 17p
- Stratifikacija prema dobi i komorbiditetu:
 - (a) znatni komorbiditet (nemogućnost toleriranja purinskih analoga)
 - (b) > 65 (ili 70) god
 - (c) mlađi od gornje grupe (b) ili stariji s dobrim indeksom komorbiditeta

Na temelju dobi i pridruženih bolesti bolesnici se stratificiraju u kategorije vrlo korisne u planiranju osnovne terapijske strategije. Obično se radi o kvalitativnim procjenama koje imaju različite nazive :

- „Go go“ ili „Slow go“;
- „Fit“ ili „frail“;
- „dobro“ ili „loše“ stanje bolesnika

TERAPIJE ZA PRVU LINIJU I TERAPIJA RELAPSA/PROGRESIJE

Vlatko Pejša

Kronična limfocitna leukemija (KLL) je klonska limfoproliferativna bolest obilježena limfocitnom infiltracijom koštane srži i periferne krvi, uz promjenjiv stupanj infiltracije limfnih čvorova, slezene i ostalih organa.

U **1. liniji liječenja** danas se primjenjuje individualni pristup koji razlikuje 3 osnovna tipa: tzv. „go-go“ (R-FC kao standard), „slow-go“ („povratak“ klorambucila) i „no-go“ (opservacija) pristup ovisno o općem stanju bolesnika i komorbiditetima. Po IWCLL smjernicama (Hallek, Barcelona 2009.)

R-FC je standard aktivne terapije u prvoj liniji. Važno je naglasiti da starija dob KLL bolesnika sama po sebi ne treba biti glavni i ograničavajući faktor prilikom odabira terapije, pa se algoritam liječenja ovih bolesnika vodi statusom bolesnika (pomoć pri gerijatrijskoj procjeni su različite skale: Sorrow verzija Charlsonovog indeksa, CIRS-cumulative Illness Rating Scale i Indeks koegzistirajućeg morbiditeta) i njihovim očekivanim trajanjem života (i za to postoje skale za procjenu). Rituksimab je postao standard u liječenju koji ciljeve terapije mijenja iz tradicionalne palijacije na težnju za što duljom remisijom i boljom kvalitetom života. U terapiji je potrebno obratiti pažnju i na značaj minimalne ostatne bolesti (MRD-minimal residual disease- MRD negativnost znači detekciju < 1 KLL stanice u 10⁶ normalnih leukocita, određuje se PCR-om), naime 6-godišnje preživljenje značajno je veće u bolesnika koji su postigli MRD negativnost.

Ciljevi liječenja KLL u **2. liniji** su poboljšanje i kvantitete i kvalitete života. Indikacije za početak liječenja istovjetne su onima za prvu liniju. Preporuka Europskog društva za medicinsku onkologiju (ESMO) je da se 1. linija liječenja može ponoviti ako se relaps ili progresija dogode > 12 mj. nakon inicijalne terapije. Tako je i najpoznatija studija za relapsne KLL – REACH (vidi *Robak T, et al. Blood 2008. 112:Abstract LBA-1*) pokazala da R-FC produljuje PFS za 10 mjeseci u usporedbi s FC. Rezultati su bili značajni i konzistentni u podgrupama uključivši i one s nepovoljnom prognozom. Uslučaju ranog relapsa R-FC je također opcija uz, naravno, alemtuzumab (p53!), sam ili u kombinaciji s fludarabinom, ofatumomabom, bendamustinom... (prikazano na Tablici 3.)

Binet stage	Fitness	First-line treatment	GCLLSG trial
asymptomatic AB	Irrelevant	<u>None</u>	CLL7
symptomatic A B + C	Go Go	<u>FCR</u> (BR, FR, FA) Del(17p): <u>FCR, A, FA</u> à AlloTx	CLL10
	Slow Go	<u>CLB</u> , (reduc. doze F, FC, B, FCR lite, CLB+R ili O ili GA 101, monoth. MoAt)	CLL11
Relapse	Fitness	Second-line treatment	GCLLSG trial
Early (< 1 year) = refractory disease	Go Go	A, FA, FC-R, (flavopiridol) à Allo Tx	CLLX2
	Slow Go	<u>P53 mut.: A</u> , (lenalidomid, Ofatumumab ili R-HD? Bez p53 mut B, FCR lite, F (eksperimentalne th.)	CLL20
Late (> 1 year)	Go Go & Slow Go	Repeat first line	

Tablica 3. Liječenje KLL – zaključak. Prikazuje osnovnu kategorizaciju te prvu i drugu liniju terapije (Hallek, IWCLL, Barcelona, 2009)

B-KLL ISTRAŽIVAČKE TERAPIJE

Ozren Jakšić

Istraživačko i standardno liječenje

Standardi u liječenju bolesti pa tako i B-KLL-a imaju obilježje stalno mijenjajućeg krajolika zbog stalnog kliničkog istraživanja i novih rezultata koje donose. Brojna su pitanja na koja se kliničkim istraživanjima nastoji dobiti odgovor (koga liječiti, čime, kako, kada, koliko, i slično). Danas smo svjedoci preko 400 aktivnih registriranih studija u B-KLL. Istražuju se indikacije za liječenje, lijekovi, kombinacije, metode, održavanje odgovora na liječenje, utvrđivanje odgovora na liječenje, individualna terapija, "pametno" liječenje itd..

Osnovni smjerovi istraživanja (prema najznačajnijim kliničkim istraživanjima koja su u tijeku) mogu se podijeliti na istraživanje strategije liječenja te istraživanje novih lijekova. Za spomenuti su:

- strategija
 - Rano liječenje bolesnika s negativnim prognostičkim čimbenicima – GCLLSG CLL7
 - Održavanje postignutog odgovora – npr. lenalidomid
 - Konsolidacija postignutog odgovora – MRD negativni status – alemtuzumab
 - liječenje prilagođeno dobi, komorbiditetu – GCLLSG CLL11
 - Transplantacija (RIC, allo, auto)
- novi lijekovi
 - Bcl-2 antagonisti – Oblimersen, Obatoclax, ABT-263
 - Protutijela – Ofatumomab (antiCD20), Lumiliximab (antiCD23), Chir 12.12 (antiCD40), GA101 (antiCD20)-(CLL11-RH), HuMaxCD38, ...
 - CDK inhibitori – Flavoperidol, SNS-032
 - PKC inhibitor – Enzastaurin
 - HSP 90/ZAP-70 – CNF 2024
 - IMiD – Lenalidomid (ORIGIN – RH)
 - SRC inhibitor – Dasatinib
 - PI3K inhibitor – CAL -101
 - Alkilirajući citostatici - bendamustin

PROFILAKSA I LIJEČENJE INFEKCIJA

Radovan Vrhovac

Infekcije su značajan klinički problem kod bolesnika s KLL. Ozbiljne se infekcije javljaju kod većine bolesnika, a predstavljaju i jedan od vodećih (i do 60%) uzroka smrti. Brojni čimbenici vezani uz

samu bolest odgovorni su za pojačanu sklonost bolesnika infekcijama, ali i noviji oblici liječenja, iako povisuju stopu odgovora u usporedbi s alkilirajućim lijekovima, dovode do značajne (dodatne) imunosupresije produljenog trajanja, što dovodi ne samo do veće incidencije infekcija, nego i do promjene epidemiologije njihovih uzročnika. Tako se uz uobičajene bakterijske infekcije u tih bolesnika češće javljaju i druge, oportunističke infekcije (*Nocardia*, *Listeria*, mikobakterije, *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis jirovecii*, *Varicella zoster*, *Adenovirus*, *Citomegalovirus*, reaktivacija B-hepatitisa, itd.).

Budući da ne postoje prospektivne randomizirane kliničke studije o antimikrobnoj profilaksi u KLL, o tome nema niti univerzalno prihvaćenih smjernica. Neke od preporuka o profilaksi infekcija i cijepljenju bolesnika s KLL prikazani su u tekstu koji slijedi.

Profilaksa infekcija kod bolesnika s KLL

Ne postoje prospektivne randomizirane kliničke studije o AB profilaksi u KLL

- Profilaksa vjerojatno nepotrebna:
 - u ranijim fazama bolesti
 - kod normalnih ili blago sniženih vrijednosti imunoglobulina te
 - uz liječenje alkilirajućim lijekovima
- Uz terapiju purinskim analogima stavovi su kontroverzni:
 - Najveći rizik prethodno liječeni bolesnici uznapredovalog kliničkog stadija s renalnom insuficijencijom
 - Ako da, TMP/SMX ili amoksicilin-klavulonska kiselina i to sve do 2 mj. nakon završetka terapije
 - Antivirusna profilaksa najviše koristi bolesnicima s $CD4^+ < 50/\mu L$
- Uz terapiju alemtuzumabom:
 - flukonazol, TMP/SMX, aciklovir, monitoriranje CMV-DNA svaka 2 tjedna (ili valganciklovir)

Cijepljenje bolesnika s KLL

Rezultati dvojbeni, osobito kod bolesnika s uznapredovalom bolešću, odnosno slabim imunološkim odgovorom. Najbolji rezultati kod bolesnika s $IgG > 7$ g/L. Neki od prijedloga uključuju:

- Godišnje cijepljenje protiv v. Influenzae
- Pneumokokna (+/- Haemophilus) vakcina svakih 5 g.
- Izbjegavati sve žive vakcine

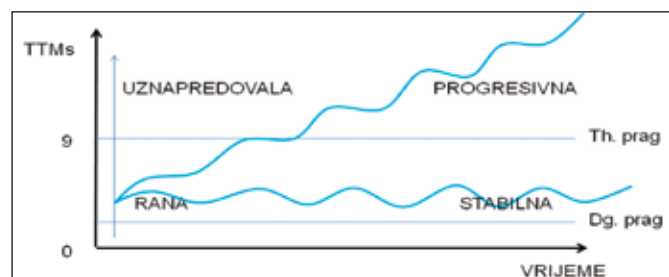
Predložena je mogućnost istraživačkog projekta s područja infekcija i KLL-a, a pod okriljem KROHEM-a. Radilo bi se o neinterventnoj studiji u kojoj bi mogli (s obzirom na incidenciju KLL-a i necentraliziranu distribuciju bolesnika) sudjelovati svi centri članovi KROHEM-a. Cilj bi studije bio ispitati incidenciju, epidemiologiju i mortalitet od infekcija kod bolesnika s KLL te istražiti kako ti podaci koreliraju s nekim osnovnim značajkama bolesti i liječenja.

Prijedlozi istraživanja

KROHEM-KLL01

Ozren Jakšić

Osnovna ideja za istraživanje progresije/evolucije B-KLL prikazana je na prethodnom sastanku KROHEM-a kao i u prethodnom Biltenu. Na sastanku u Osijeku prikazan je sinopsis istraživanja te je dogovoreno pisanje završne verzije protokola (uz osnivanje odbora za pisanje, rješavanje pravne regulative – KLL biobanka kao i ispitivanje izvedivosti uz sudjelovanje istraživača iz raznih dijelova RH).



Slika 3. Terminološke napomene. (a) Rana/uznapredovala bolest – klinički stadij; (b) Stabilna/progresivna – klinički stadij x vrijeme – tip evolucije

U nastavku slijede dijelovi prikazanog sinopsisa. Cijelokupni sinopsis i prijedlog protokola bit će dostupni na <http://www.b-cll.org/krohem/krohem01.html>.

NASLOV

ISTRAŽIVANJE PROGRESIJE/EVOLUCIJE B-KLL-a – KROHEM-KLL01

TIP ISTRAŽIVANJA

multicentrično, opservacijsko, neinterventno, longitudinalno istraživanje

Ciljevi

- Primarni
 - ustanoviti čimbenike pri dijagnozi koji su povezani s tipom progresivnosti bolesti
 - ustanoviti dolazi li u pojedinim tipovima

progresije do mjerljivih promjena u stanicama neoplastičnog klona (evolucija)

- Sekundarni
 - Standardizirana i kvalitetna obrada svih uključenih bolesnika pri dijagnozi i prije početka liječenja te standardizirano praćenje – u svim centrima u RH
 - Stvaranje osnove za registar B-KLL bolesnika
 - Stvaranje biobanke – kao podloge za dodatna istraživanja (tipa progresivnosti, stanične biologije, otkrivanje i validacije biomarkera, predikcije odgovora na liječenje) – održavanje i dostupnost regulirana posebnim pravilnikom

ISPITANICI:

Kriteriji za uključivanje:

- svi neliječeni bolesnici s tipičnim B-KLL imunofenotipom (B-KLL, MBL)
- potpisan informirani pristanak

Ukoliko postoji interes u istraživanje mogu biti uključeni kao posebne grupe:

- KLL s atipičnim fenotipom
- LML s tipičnim fenotipom

PLAN ISTRAŽIVANJA

Registracija

- Demografski podaci
- Klinički podaci (LČ, slezena, ECOG, CIRS)
- Laboratorijska obrada
 - Standardne hematološke, biokemijske pretrage (uk. imunoglobulini, β 2mikroglobulin), koagulacija, imunohematološka ispitivanja (Coombs, anti-trb?)
 - Imunofenotip:
 - dijagnostički (preduvjet za ulaz) – probir
 - prognostički – CD38, ZAP-70, imunološki status
 - Morfologija (PHD, citologija, FISH)
- Radiološka obrada (CT toraksa i abdomena, UZ vrata)
- Pohrana uzoraka – Biobanka (stanice, serum/plazma, parafinske kocke, DNA)

Praćenje

- uobičajeno kliničko praćenje (3-6 mjeseci)
 - Klinički pregled, krvna slika, DKS, TTM - minimum
 - Biokemijska obrada (uključujući i npr. B2 mikroglobulin) - optimum
 - Dodatne pretrage ovisno o tijeku bolesti

Reevaluacija

- Kriteriji za revaluaciju – dosizanje određene kritične točke:
 - Potreba za liječenjem
 - Određena razina tumorske mase (Limfocitoza, TTM, LČ)
 - Promjeni u tijeku bolesti (prema unaprijed postavljenim pravilima)
 - Kod stabilnih, svake 2 godine

- Ponavlja se obrada učinjena pri registraciji (potrebno prije početka liječenja) + potrebna obrada ovisno o predmijevanom liječenju
- Pohrana uzoraka – biobanka (stanica, seruma, DNA, parafinskih kocki)

Tablica 4. Plan istraživanja

	ULAZ -REGISTRACIJA	Praćenje (3-6m)	RE- evaluacija	Praćenje nakon liječenja (6m)
Klinički pregled, KKS, DKS, TTM	x	x	x	x
Biokemija (kompletna uz B2MG, Ig)	X	+/-	x	
Imunofenotip	x		x	
Morfologija PHD, citologija	x		x	
FISH	x		x	
CT, UZ	x		x	
Pohrana Istraživanje	x		x	

MJERE ISHODA (END-POINTS)

- Vrijeme do početka liječenja (time to treatment – TTT)
- vrijeme do početka progresije (time to progression)
- vrijeme do dosizanja određenih granica tumorske mase (TTM 9, 15)
- Preživljenje

STATISTIČKA RAZMATRANJA

- U RH incidencija oko 225 bolesnika
- Oko 1/3 bolesnika nikad ne zahtijeva terapiju, do 1/3 bolesnika zahtijeva terapiju pri dijagnozi
- do 2/3 ukupnog broja bolesnika na kraju zahtijeva liječenja
- populacija obuhvaćena ovom studijom uključuje sve bolesnike koji pri dijagnozi ne zahtijevaju terapiju, što predstavlja oko 2/3 dijagnosticiranih bolesnika
- broj očekivanih ishoda (TTT) u RH od 100 do 150 godišnje

MOLEKULARNE METODE U DIJAGNOSTICI LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLESTI PREMA KLASIFIKACIJI SZO 2008.

Snježana Dotlić, dr. med.

Dr. sc. Ivana Ilić, dr. med.

Klinički zavod za patologiju i citologiju

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: sdotlic@hotmail.com

ilic5@yahoo.com

Klasifikacija SZO iz 2008. godine donosi brojne novosti u odnosu na prethodna izdanja; jedna od bitnih je naglasak na definiranje pojedinih entiteta multidisciplinarnim pristupom. Pojavljuju se i novi entiteti, za čiju je adekvatnu dijagnostiku neophodna opsežnija imunohistokemijska analiza, ali i molekularne i genetske metode. U skupini limfoproliferativnih bolesti morfologija i dalje ostaje jedan od temelja klasifikacije, ali imunofenotip i genetske osobine tumora pridonose objektivnosti dijagnostike, povećavaju reproducibilnost klasifikacije i katkada omogućuju značajne prognostičke informacije. Važno je napomenuti da kliničke osobine postaju dio definicije pojedinih entiteta i dijagnozu nije moguće postaviti bez pouzdanih i detaljnih kliničkih informacija (primjerice nodalna ili ektranodalna lokalizacija, leukemijska prezentacija, primarna lokalizacija kožnih, medijastinalnih ili CNS limfoma, multiple koštane lezije). Također, gradus limfoma, odnosno procjena kliničke agresivnosti koristi se unutar pojedinih entiteta, dakle više se ne preporučuje pojedine entitete pojednostavljeno označavati indolentnima ili agresivnima.

Razlike između 3. i 4. izdanja klasifikacije SZO obuhvaćaju preciznije imunofenotipski i genetski definirane kategorije limfoproliferativnih bolesti. Prepoznaje se i pojava tzv. linijske plastičnosti (klonalna povezanost nekih neoplazmi histiocitnih/dendritičkih stanica i limfoma). Kod limfoproliferativnih bolesti B-imunofenotipa definirani su entiteti koji se očituju minimalnim klonalnim populacijama limfocita (monoklonalna B-limfocitoza, MCL *in situ*, MGUS, FL *in situ*), a preduvjet za dijagnozu su pouzdane molekularne tehnike. Predstavljen je konsenzus oko novih kriterija za MM, Waldenströmovu makroglobulinemiju/limfoplazmocitni limfom, KLL. Neki od novih entiteta su neklasificirani limfomi slezene, nove podvrste FL, intermedijarne kategorije limfoma („sive zone“ između DLBCL i BL, te između DLBCL i cHL).

B-limfoblastične leukemije/limfomi svrstavaju se u nekoliko genetski definiranih podtipova (Tablica 1.).

U SZO klasifikaciji iz 2001. postojala su 3 podtipa i 5 morfoloških varijanti DLBCL, a u klasifikaciji 2008. definirani su brojni kliničko-patološki entiteti u heterogenoj kategoriji DLBCL (Tablica 2.).

U skupini T/NK limfoma također se pojavljuju entiteti definirani dokazom monoklonalne populacije tumorskih stanica (EBV+ limfoproliferativne bolesti dječje dobi, *hidroa vacciniforme-like lymphoma*), neke podvrste kožnih T-limfoma (primarni kožni agresivni epidermotropni CD8+ T-limfom i primarni kožni gamma-delta limfom koji treba razlikovati od supkutanoga panikulitisa-sličnog T-limfoma). Iako je ALK+ ALCL dobro definirani entitet, za razlikovanje ALK- ALCL od Hodgkinovog limfoma često je neophodan dokaz preuredbe TCR u tumorskim stanicama.

Kod perifernog T limfoma NOS, dijagnoza se katkada može postaviti na temelju karakterističnih morfoloških promjena i „gubitka“ imunohistokemijskih T-markera, međutim ovi limfomi često ne pokazuju niti jednu od navedenih karakteristika i jedini je način za potvrdu dijagnoze dokaz preuredbe TCR u tumorskim stanicama. Molekularni dokaz monoklonalnosti, uz kliničku sliku, sastavni je dio dijagnoze primarnih kožnih limfoma.

Dijagnoza Burkittovog limfoma danas se ne smije postaviti bez FISH analize (translokacije *C-MYC* i *BCL2*) koja omogućava razlikovanje „double hit“ limfoma i intermedijarne kategorije limfoma s osobinama između DLBCL i BL (Slika 1.). Kod ovih bolesnika potrebno je i citogenetskom analizom isključiti kompleksne kromosomske anomalije (Slika 2.). Histološki i imunofenotipski ovi entiteti mogu biti potpuno jednaki.

Sasvim je jasno: za točnu dijagnozu limfoproliferativne bolesti patologu odavno nije dovoljna interpretacija histološkog preparata.

Napomena: Slike ljubaznošću prof. Eliasa Campa, Hospital Clinic-University of Barcelona, Španjolska.

B limfoblastične leukemije/limfomi

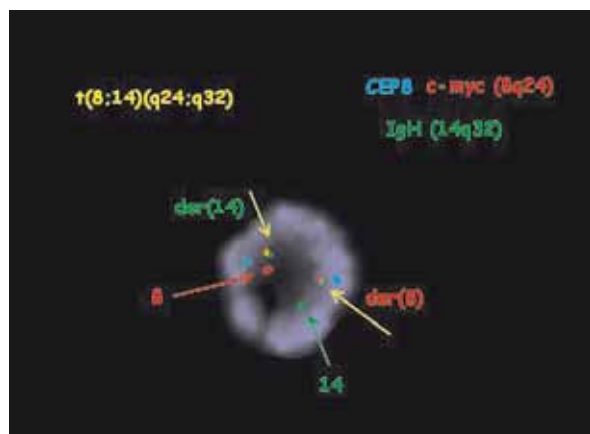
- B limfoblastična leukemija, NOS
- B-limfoblastična leukemija s rekurentnim genetskim anomalijama
 - t(9;22)
 - t(v;11q23)
 - t(12;21)
 - S HIPERDIPLOIDIJOM
 - S HIPODIPLOIDIJOM
 - t(5;14)
 - t(1;19)

Tablica 1.

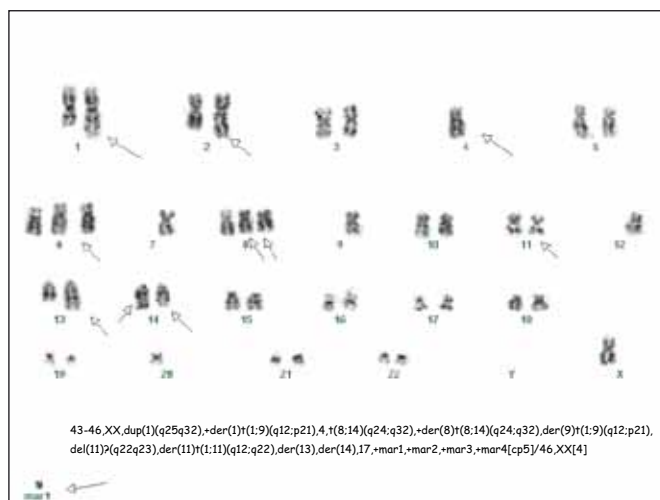
DLBCL - SZO 2008

- Difuzni velikostanični B limfom, NOS
 - Podrijetla *germinativnog centra*
 - Aktiviranih B-limfocita (*non-GC*)
 - EBV pozitivni DLBCL, NOS
- Difuzni velikostanični B limfom bogat T limfocitima
- DLBCL povezan s *kroničnom upalom*
- Primarni medijastinalni (timični) velikostanični B-limfom
- Primarni DLBCL CNS-a
- Primarni kožni DLBCL, ("leg type")
- Intravaskularni velikostanični B-limfom
- ALK + velikostanični B limfom
- Plazmablastični limfom
- Primarni efuzijski limfom
- Velikostanični limfom B-imunofenotipa kod multicentrične Castlemanove bolesti povezane s HHV8

Tablica 2.



Slika 1.



Slika 2.

Kratice: SZO – Svjetska zdravstvena organizacija, MCL – limfom plaštene zone, engl. *mantle cell lymphoma*, MGUS – *monoclonal gammopathy of unknown significance*, FL – folikularni limfom, MM – multipli mijelom, CLL – kronična limfocitna leukemija, engl. *chronic lymphocytic leukemia*, DLBCL – difuzni velikostanični B limfom, engl. *diffuse large B cell lymphoma*, BL – Burkittov limfom, cHL – klasični Hodgkinov limfom, ALCL – anaplastični limfom velikih stanica, engl. *anaplastic large cell lymphoma*, TCR – T cell receptor

PROCJENA KLONALNOSTI NHL-a

¹ Dr. sc. Petra Korać, dipl. ing.

² Dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro, dipl. ing.

¹ Prof. dr. sc. Mara Dominis, dr. med.

¹ Zavod za patologiju i citologiju,

Klinička bolnica Merkur, Zagreb

² Zavod za kliničku kemiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

E-pošta: pkorac@gmail.com,

mariana.kardum@zg.t-com.hr,

mara.dominis@zg.t-com.hr

Na XIV sastanku Europskoga hematopatološkog društva održanom u Bordeauxu u rujnu 2008. godine prikazali smo slučaj vezan uz procjenu klonalnosti unutar sekcije *Meet the Professor: Han van Krieken, Nijmegen, The Netherlands, 'Clonality Testing'*.

Pacijentici (1937., *Diabetes mellitus*) je u siječnju 1990. godine dijagnosticiran pseudolimfom na uzorku resekcije tumora gornjega reznja lijevoga pluća. Godine 2007. uzorak toga tumora zaprimljen je na našem Zavodu kako bi se napravio test za klonalnost. Tumor je imunohistokemijski bio: CD20+, CD23-, Ki67~30%, MUM1+/-, BCL1-, CD138-, (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7: +/-). Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) nađeno je klonalno preslagivanje gena za T-stanični receptor gamma, ali i klonalna preuredba gena za teški lanac imunoglobulina (IGH) u regiji IGH FR3-JH.

Pregled tumorskoga tkiva iz 1990. godine tražen je u sklopu pretraga zbog relapsa bolesti koji je utvrđen rendgenskim pregledom 2007. godine. Ponovno je napravljena resekcija gornjega reznja lijevoga pluća. Nije bilo limfadenopatije kao ni organomegalije. Histopatološki nalaz: limfom marginalne zone. PCR-om je nađeno klonalno preslagivanje gena za T-stanični receptor beta u regiji Vb-Jb2, ali i klonalna preuredba gena za teški lanac imunoglobulina (IGH) u regijama IGH FR1-JH, IGH FR2-JH, IGH FR3-JH i IGH DH7-JH. Pacijentica nije dobila terapiju. U veljači 2008. godine došlo je do infiltracije baze gornjega reznja i infiltracije donjega reznja lijevoga pluća. Limfadenopatija ni organomegalija nisu nađene. Preporučena je kemoterapija, no pacijentica je odbila pa je jedina terapija bilo zračenje. Kroz ožujak, travanj, svibanj i lipanj zabilježene su infekcije i hiperglikemija, bez limfadenopatije. U srpnju iste godine zamijećena je limfadenopatija u lijevoj aksili. Pacijentica je umrla u kolovožu.

Slučaj je izložen zbog dvostruke klonalnosti (B i T) koja je pratila bolest, a koja ne samo da je bila dvostruka već je nađena u različitim regijama IGH i TCR lokusa. Voditelj sekcije, prof. Han van Krieken, i njegova suradnica, dr. sc. Patricia Groenen, zamijetili su razliku u načinu vizualizacije naših rezultata određivanja klonalnosti i vizualizacije rezultata određivanja klonalnosti prema preporučenom protokolu grupe BIOMED-2. Protokol za određivanje klonalnosti osmišljen je unutar projekta BIOMED-2 koji nudi vrste i sekvence početnica za PCR reakcije kao i detaljan pregled predtretmana i vizualizacije rezultata. Dogovoreno je da uzorke tkiva iz 1990. i 2007. godine pošaljemo u Nizozemsku, u Odjel za patologiju, Radboud University Nijmegen Medical Centre, gdje će rezultati PCR-a biti vizualizirani na poliakrilamidnom gelu (mi smo koristili komercijalno dostupan gel visoke razlučivosti, Spreadex, El-chrom), a bit će napravljena i detekcija fragmenata sekvencerom, te da sami pokušamo poboljšati test koristeći nakon reakcije PCR-a i heterodupleks. Pozvani smo na radionicu *BIOMED-2/EUROCLONALITY WORKSHOP ON CLONALITY ASSESSMENT* koja se održala u Nijmegenu krajem veljače 2009. godine. Na radionici smo prikazali 3 nova slučaja odabrana kroz 2008. godinu kriterijem dvostruke klonalnosti. Sva tri slučaja prikazana su u Nijmegenu i sva su tri bila upitne klonalnosti (T-NHL limfoidna papuloza, tip C; ektranodalni B-limfom marginalne zone; bez dijagnoze – „hematološki nalazi zadovoljavajući”).

Koristeći znanje i sugestije stečene na radionici, nabavili smo odgovarajući sustav za poliakrilamidnu gel elektroforezu (PAGE), a metoda je u našem laboratoriju poboljšana vizualizacijom rezultata određivanja klonalnosti bojenjem srebrom umjesto bojom SyberGold. Usavršili smo metodu prema rezultatima koje su nizozemski kolege dobili na uzorcima pacijentice čiji smo slučaj prikazali u Bordeauxu. U uzorku te pacijentice iz 2007. godine nađena je preuredba u genu za teški lanac imunoglobulina (IgH) u regijama IGH FR1-JH, IGH FR2-JH, IGH FR3-JH i preuredba u genu za laki lanac imunoglobulina kappa IGK Vκ-Jκ, dok u uzorku iz 1990. godine određivanje klonalnosti nije bilo moguće zbog slabe kvalitete DNA.

U cilju unapređenja dijagnostike NHL-a u Hrvat-

skoj, po povratku smo pokušali saznati tko u Hrvatskoj i prema kojem protokolu nudi određivanje B i T klonalnosti. Pritom su korištene stranice Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB), na kojima su, među ostalima, navedene i pretrage B i T klonalnosti i njihova cijena. Na pismeni upit HKMB-u odgovor nije dobiven pa smo odlučili stečena znanja prikazati na sastanku KROHEM-a u studenome 2009. godine kliničarima i dijagnostičarima kojima je prema novoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije ova pretraga nužna za postavljanje dijagnoza pojedinih NHL-a.

Sva četiri pacijenta koja su imala i B i T klonalan tumor razriješeni su metodom dorađenom prema preporukama BIOMED-2 grupe. Nažalost, točni rezultati došli su čak nekoliko mjeseci nakon postavljanja dijagnoze. Iako su, zahvaljujući iskustvu naših patologa i hematologa, navedeni pacijenti u pravom trenutku dobili točnu dijagnozu, mišljenja smo da je procjenu klonalnosti potrebno usavršiti i ujednačiti prema protokolu BIOMED-2 grupe na razini cijele Hrvatske kako se ovakvi slučajevi ne bi ponovili.

Ponavljamo stoga reference koje predlažemo kao osnovu za harmonizaciju i standardizaciju specijalnih pretraga, u ovome slučaju procjene B i T klonalnosti:

1) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936.

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA.
Leukemia. 2003;17(12):2257-317.

2) Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936.

van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, Morgan GJ, Parreira A, Molina TJ, Cabeçadas J, Gaulard P, Jasani B, Garcia JF, Ott M, Hannsmann ML, Berger F, Hummel M, Davi F, Brüggemann M, Lavender FL, Schuurin E, Evans PA, White H, Salles G, Groenen PJ, Gameiro P, Pott Ch, Dongen JJ.
Leukemia. 2007;21(2):201-6.

3) Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936.

Evans PA, Pott Ch, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, Garcia JF, van Krieken JH, Pals S, Kluin P, Schuurin E, Spaargaren M, Boone E, González D, Martinez B, Villuendas R, Gameiro P, Diss TC, Mills K, Morgan GJ, Carter GI, Milner BJ, Pearson D, Hummel M, Jung W, Ott M, Canioni D, Beldjord K, Bastard C, Delfau-Larue MH, van Dongen JJ, Molina TJ, Cabeçadas J.
Leukemia. 2007;21(2):207-14.

4) Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936.

Brüggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, Jasani B, Ott M, Delsol G, Orfao A, Tiemann M, Herbst H, Langerak AW, Spaargaren M, Moreau E, Groenen PJ, Sambade C, Foroni L, Carter GI, Hummel M, Bastard C, Davi F, Delfau-Larue MH, Kneba M, van Dongen JJ, Beldjord K, Molina TJ.
Leukemia. 2007;21(2):215-21.

Do uspostave standardiziranih i ujednačenih testova klonalnosti, ističemo važne točke postupka procjene klonalnosti:

- a) procjena kvalitete izolirane DNA – fragmenti izolirane DNA moraju biti veliki barem 300 pb da bi test mogao biti pouzdan;
- b) razlike u testovima izolacije DNA tkiva uklopljenoga u parafin – postoje razni komercijalno dostupni testovi; naši rezultati pokazuju da najveće fragmente daje standardni postupak izolacije pomoću sredstva za deparafinizaciju, digestijskoga pufera (tris/EDTA/tween) i proteinaze K;
- c) razlika kvalitete svježega uzorka i uzorka fiksiranoga formalinom uklopljenoga u parafin – korištenje svježega uzorka kad god je to moguće;
- d) optimalna metoda vizualizacije rezultata – preporučuje se poliakrilamidni gel i bojenje srebrom;
- e) odabir početnica, uvjeta PCR-a, korištenje heterodupleks metode – komercijalno dostupni kitovi napravljeni prema sekvencama BIOMED-2, praćenje preporuka u priloženome protokolu;
- f) očitavanje dobivenih rezultata – trajna edukacija kroz radionice BIOMED-2 grupe ili u europskim laboratorijima koji rade prema njihovim protokolima;

- g) korištenje 4 vrste kontrola – pozitivna monoklonalna, pozitivna poliklonalna, negativna koja umjesto uzorka ima vodu, negativna koja umjesto uzorka ima DNA izoliranu iz npr. epitelnih stanica;
- h) određivanje potrebnih reakcija za procjenu B, odnosno T klonalnosti – B klonalnost procjenjivati s pomoću IGH i IGK testova, T klonalnost procjenjivati s pomoću TCR β i TCR γ testova; ovakve kombinacije testova prema literaturi daju ispravan rezultat u 99% slučajeva.

U nadi da će se prepoznati potreba unapređivanja procjene klonalnosti na nacionalnoj razini, stojimo na raspolaganju zainteresiranim kolegama:

pkorac@gmail.com,
 mariana.kardum@zg.t-com.hr,
 mara.dominis@zg.t-com.hr.

Morfološke metode utvrđivanja zahvaćenosti koštane srži plazma stanicama u multiplom mijelomu

**Sanja Štifter, Emina Babarović, Toni Valković,
 Irena Seili-Bekafigo², Christophe Štemberger²,
 Antica Duletić-Naćinović¹, Ksenija Lučin,
 Nives Jonjić**

Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, ¹Odjel hematologije, ²Odjel citologije, Klinike za unutarnje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Rijeka

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Nives Jonjić, dr. med.

Zavod za patologiju

Klinički bolnički centar Rijeka i

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: nives@medri.hr

Analiza koštane srži je neizostavna pri postavljanju dijagnoze multiplog mijeloma (MM) bez obzira na indikativni radiološki i imunološki nalaz (1,2). Ona osigurava neophodne informacije o stupnju zahvaćenosti koštane srži plazma stanicama kao i o njihovim morfološkim osobitostima (2). Kvantificiranje plazma stanica osim toga se koristi pri evaluaciji morfološke remisije (3) i minimalne ostatne bolesti MM (4). Visoki je postotak plazma stanica u koštanoj srži prepoznat kao pouzdan prediktor relapsa mijeloma u bolesnika nakon terapije (5). Upravo stoga su do sada provedene brojne studije s ciljem da se preporuči najpouzdanija metoda za procjenu plazmastičnih infiltrata u rutinskom radu.

Morfološke metode koje se koriste pri utvrđivanju procjene postotka zahvaćenosti koštane srži stanicama mijeloma su analiza aspirata koštane srži i koštane biopsije. Aspirati koštane srži su esencijalni i najadekvatniji za evaluaciju plazmastične diferencijacije. Tako se temeljem plazmastične morfologije u razmazima koštanih srži mijelomi

mogu klasificirati na zrele, intermedijarne, nezrele i plazmablastične (6). Utvrđeno je da ovakva podjela korelira s preživljenjem bolesnika, jer oni s plazmablastičnom morfologijom imaju medijan preživljenja 10, a svi ostali 35 mjeseci (6,7).

Neosporno je da je MM u relativno visokom postotku fokalni proces (prema našim podacima u 20% slučajeva), što može značajnije utjecati na točnost i pouzdanost procjene broja plazma stanica u aspiratu. Razlike postotka plazma stanica u aspiratu i koštanoj biopsiji su izraženije u infiltracijama nodularnog tipa odnosno u uzorcima srži s izraženom retikuloplazijom, koja može značajno smanjiti celularnost aspirata. Literaturni podaci ukazuju na značajne razlike i relativno slabu podudarnost postotka plazma stanica utvrđenog u aspiratu u odnosu na koštanu biopsiju (8). Ovakve činjenice ukazuju na potrebu analize koštane biopsije bolesnika s MM.

Plazmastični infiltrat u koštanoj biopsiji može se podijeliti na intersticijski, nodularni i difuzni tip, koji su proporcionalni stadiju bolesti. Intersticijski i nodularni infiltrati se uočavaju uz još uvijek očuvanu hematopoezu dok je difuzni udružen sa suprimiranim hematopoezom. Drugim riječima transformacija intersticijskog ili nodularnog tipa infiltrata u difuzni govori u prilog progresije bolesti (7,9).

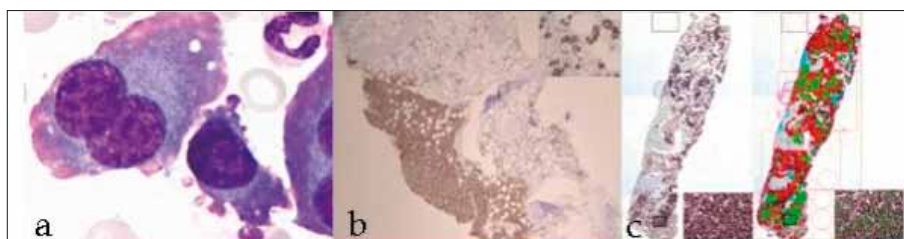
Dodatno se u novije vrijeme, a sve u cilju što točnije procjene plazma stanica u koštanoj biopsiji, koristi imunohistokemijska analiza primjenom protutijela na CD138 antigen, odnosno syndecan-1. Radi se o transmembranskom proteoglikanu bogatom heparan sulfatima. Smatra se visoko specifičnim markerom normalne i neoplastične plazma stanice te biljekom limfoidnih tumora s plazmastičnom diferencijacijom (5,10-12). Rezovi obojeni s CD138

omogućuju izvrsnu procjenu broja plazma stanica i njihove distribucije u koštanoj biopsiji.

Ovako obojeni preparati mogu se kvantificirati pod svjetlosnim mikroskopom, kao i primjenom računalno potpomognute analize slike (Slika 1.). Noviji radovi ukazuju na visoku razinu reproducibilnosti ovakve kvantifikacije (13,14). Ova metoda osobito je važna tijekom praćenja bolesnika (15) jer može detektirati neoplastičnu distribuciju, tj. rekurenciju bolesti bez obzira na ukupan broj plazma stanica u koštanoj srži (5,16). Naročito je značajna

u kontekstu poslijeterapijskih hipocelularnih srži u kojima plazma stanični infiltrati mogu biti mali ili u vidu mikroagregata koji se mogu previdjeti (4).

Zaključno se može istaknuti da svaka pojedina metoda ima svoja ograničenja, stoga kombinirana primjena više analiza, aspirata i biopsije omogućava temeljitiji i objektivniji pristup u procjeni zastupljenosti i morfologije plazma stanica u koštanoj srži, koja može biti značajna za dijagnozu, kliničko praćenje i prognozu bolesti.



Slika 1. (a) Razmaz aspirata koštane srži bojane May-Grimwald-Giemsa bojanjem. Binuklearna plazma stanica s eozinofilnim protruzijama citoplazme na povećanju x1000. (b) Imunohistokemijsko bojanje cilindra koštane biopsije sa CD138 na povećanju x20 (detalj slike na povećanju x400). (c) Računalno potpomognuta analiza slike. Snimke zaslona skeniranog uzorka s detaljima histologije slike, rasčlamba na osnovi razlika u boji uzorka.

Literatura:

1. Rajkumar SV, Fonseca R, Dispenzieri A, et al. Methods for estimation of bone marrow plasma cell involvement in myeloma: predictive value for response and survival in patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Am J Hematol* 2001; **68**:269-75.
2. Provan D, Singer CRJ, Baglin T, et al. *Oxford handbook of clinical hematology*. Second edition. Oxford: Oxford University Press, 2006; 266.
3. Charles KS, Winfield DA, Angel C, et al. Audit of bone marrow aspirates and trephine biopsies in multiple myeloma – a single centre study. *Clin Lab Haematol* 2004; **26**:403-6.
4. Wei A, Westerman D, Feleppa F, et al. Bone marrow plasma cell microaggregates detected by immunohistology predict earlier relapse in patients with minimal disease after high-dose therapy for myeloma. *Haematologica* 2005; **90**:1147-9.
5. Brunning R, McKenna RW. *Atlas of tumor pathology. Tumors of the bone marrow*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1994; 323-67.
6. Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, et al. Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol* 1987; **87**:342-55.
7. Carter A, Hocherman I, Linn S, et al. Prognostic significance of plasma cell morphology in multiple myeloma. *Cancer* 1987; **60**:1060-5.
8. Handa U, Chhabra S, Mohan H. Plasma cell tumours: cytomorphological features in a series of 12 cases diagnosed on fine needle aspiration cytology. *Cytopathology* 2009; [Epub ahead of print]
9. Subramanian R, Basu D, Dutta TK. Prognostic significance of bone marrow histology in multiple myeloma. *Indian J Cancer* 2009; **46**:40-5.
10. Costes V, Magen V, Legoulffe E, et al. The Mi 15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Hum Pathol* 1999; **30**:1405-11.
11. Chilosi M, Adami F, Lestani M, et al. CD 138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol* 1999; **12**:1101-6.
12. Bayer-Garner IB, Sanderson RD, Dhodapkar MV, et al. Syndecan-1(CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol* 2001; **14**:1052-8.
13. Joshi R, Horncastle D, Elderfield K, et al. Bone marrow trephine combined with immunohistochemistry is superior to bone marrow aspirate in follow-up of myeloma patients. *J Clin Pathol* 2008; **61**:213-6.
14. Went P, Mayer S, Oberholzer M, et al. Plasma cell quantification in bone marrow by computer-assisted image analysis. *Histol Histopathol* 2006; **21**:951-6.
15. Al-Quran SZ, Yang L, Magill JM, et al. Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry. *Hum Pathol* 2007; **38**:1779-87.
16. Ng AP, Wei A, Bhurani D, et al. The sensitivity of CD138 immunostaining of bone marrow trephine specimens for quantifying marrow involvement in MGUS and myeloma, including samples with a low percentage of plasma cells. *Haematologica* 2006; **91**:972-5.

FOXP3 pozitivne stanice u MALT-tipu limfoma želuca

Doc. dr. sc. Slavko Gašparov, dr. med.

Zavod za patologiju i citologiju

Klinička bolnica Merkur, Zagreb

E-pošta: gasparovslavko@yahoo.com

T regulatorne stanice CD4+CD25+high čine subpopulaciju T limfocita, i mogu biti „naivne“ ako nastaju iz timusa (nTreg) ili „inducirane“ (iTreg) ako nastaju *de novo*, tj. konverzijom perifernih CD4+CD25- limfocita. Ova podskupina T limfocita u žarištu je interesa brojnih istraživanja zbog važne uloge koju ima u modifikaciji imunološke reakcije tumora kao i u regulaciji upalne (bakterijske, virusne) te autoimune reakcije. Specifični marker Treg limfocita je FOXP3, koji je član *forkhead winged helix family* transkripcijskih čimbenika a njegov se gen nalazi na X kromosomu (Xp11.23).

Carreras i suradnici (2006.) su dokazali da povećani broj FOXP3 limfocita u folikularnim limfomima (FL) direktno korelira s boljom prognozom (>10% FOXP3 stanica, petogodišnje preživljenje 80%; <5% FOXP3 stanica, petogodišnje preživljenje 50%). Tzankov i suradnici (2008.) također su dobili pozitivnu prognostičku korelaciju s većim brojem FOXP3 limfocita u FL, difuznom B velikostaničnom limfomu i klasičnom Hodgkinovom limfomu. Povećani broj FOXP3 limfocita u nekim je tumorima povezan s lošijom prognozom (karcinom jajnika i dojke).

Cilj našeg istraživanja (pilot studija u sklopu šireg projekta o FOXP3 stanicama u limfoproliferativnim bolestima) bio je istražiti prisutnost FOXP3 u upalnom infiltratu želuca u sklopu infekcije s *Helicobacter pylori* (Hp) – MALT-u, te u MALT-tipu limfoma želuca – MALTom-u.

Infekcija s Hp povezana je s akutnim kroničnim gastritisom, čija je jedna od glavnih karakteristika *mucosa associated lymphoid tissue* - MALT, tj. upalni infiltrat s aberantnom imunološkom reakcijom obilježenom limfatičnim folikulima (LF). Kao posljedica dugogodišnje infekcije u jednog manjeg broja neliječenih bolesnika nastaje ekstrapnodalni limfom marginalne zone tj. MALTom.

MALTom-i se češće javljaju u starijih ljudi (6 -7. desetljeće), nešto su češći u žena, 50-60% primarno nastaju u želucu, obično su kliničkog stadija I i II, a vrlo rijetko su diseminirani. Lokalizirani tumori se mogu izliječiti „trojnom“ terapijom. MALTom-i su građeni od centrocitima sličnih limfocita, mono-

citoidnih B stanica i plazma stanica. Čest je nalaz limfoepitelne lezije (LEL).

U istraživanju su analizirani konsekutivni biopsijski uzorci 9 pacijenata s MALTom-om (2003. do 2008.), i to ukupno 85 uzoraka. Učinjeno je između 2 i 9 endoskopskih pregleda kod pojedinog bolesnika i tom prilikom je uzeto između 2-13 biopsijskih uzoraka od čega je imunohistokemijski analiziran po jedan uzorak s tumorskim infiltratom (MALTom-om) te po jedan uzorak s MALT-om. Imunohistokemijsko bojenje (IHC-HRP) učinjeno je anti-FOXP3 antitijelom (236A/E7). Broj FOXP3 limfocita određen je po 1 mm², prema Tzankov A. i suradnicima (2008.). Na istim uzorcima ispitali smo i prisutnost trisomije 3, te translokacije *BCL10* i *MALT1* gena metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) obzirom da su ova dva gena prema mnogim istraživanjima uključena u etiopatogenezu MALTom-a.

Dobili smo značajno veći broj FOXP3 pozitivnih stanica u uzorcima tumorskog infiltrata, MALTom-a (~80,1/1mm² u rasponu 12,3-172,7) u usporedbi s uzorcima sluznice želuca izvan tumorskog infiltrata, MALT-a (~12,4/1mm² u rasponu 1,3-29,6). Trisomija 3 nađena je u 5 bolesnika (u 10 uzoraka s MALTom-om i 5 uzoraka s MALT-om). Nismo našli translokaciju *BCL10* gena niti u jednom od 85 uzoraka. Od 79, za analizu adekvatnih, interpretabilnih uzoraka translokacija *MALT1* gena nađena je u 4 bolesnika (ukupno 11 uzoraka). U jednog bolesnika je translokacija *MALT1* nađena i u fazi MALT-a i u MALTom-u, dok je kod preostala tri bolesnika translokacija *MALT1* nađena samo u tumorskom infiltratu tj. MALTom-u.

Može se zaključiti da je broj FOXP3 pozitivnih stanica povezan s obilnijim infiltratom i prisutan u značajno većem broju u uzorcima MALTom-a. Potreban je znatno veći broj pacijenata i uzoraka da bi se moglo odrediti eventualno prognostičko značenje FOXP3 pozitivnih stanica u mikrookolišu MALTom-a. Mišljenja smo da bi mogla postojati povezanost FOXP3 pozitivnih stanica i translokacije *MALT1* gena u tumorskim stanicama kod etiopatogeneze ovog tumora.

FOXP3 pozitivne stanice u folikularnom limfomu i limfomu malih limfocita

Prof. dr. sc. Mara Dominis, dr. med.

Dr. sc. Petra Korać, dip. ing.

Zavod za patologiju i citologiju,

Klinička bolnica Merkur, Zagreb

E-pošta: mara.dominis@zg.t-com.hr

pkorac@gmail.com

CD25^{high}, CD4+/FOXP3+ stanice tipične su za mikrokoliš različitih tumora, a i njihova prisutnost ima različiti utjecaj na kliničko ponašanje. Ne-Hodgkinov limfom folikularnih stanica (FCC-NHL) indolentni je limfom, medijan preživljenja je oko deset godina. Klinički tijek FCC limfoma je različit, u većine bolesnika relapsi i remisije bolesti su česti i mogu trajati godinama, kod drugih bolesnika je tijekom bolesti brzo progresivan i preživljenje je kratko. Danas se zna da mikrokoliš vrlo vjerojatno ima odlučujuću ulogu u kliničkom ponašanju FCC limfoma, no nije još u potpunosti definirano o kojim se sve stanicama radi, pa su zato i rezultati još uvijek konfliktni. Visoki se broj neaktiviranih stanica (T stanica/FOXP3+) kod FCC limfoma najčešće smatra povoljnim, tj. ti bolesnici imaju bolji odgovor na terapiju i dulje preživljenje, dok visoki broj dendritičkih stanica i makrofaga ima suprotni smjer tijeka bolesti.

U 100 bolesnika s histološkom dijagnozom FCC-NHL-a određen je broj FOXP3+ stanica i uspoređen je s odgovorom na terapiju i preživljenjem. Morfološka dijagnoza je postavljena prema kriterijima SZO (2008). Broj FOXP3+ stanica (MoAB–Abcam–Cambridge, UK određen je semikvantitativnom metodom (0-30=1; 30-50=2; >50=3) na ukupan broj tumorskih stanica, vidno polje 40x10. Karakteristike bolesnika i efekt primljene terapije prikazani su na Tablicama 1. i 2., te Slici 1.

Rezultati su pokazali da broj FOXP3+ stanica nije u naših 100 bolesnika povezan s boljim odgovorom na terapiju, kao i da ne postoji povezanost s brojem FOXP3+ stanica i preživljenjem.

Limfomi malih limfocita (SLL) su isto tako indolentni limfomi i pokazuju slične kliničke karakteristike s FCC-NHL, a i pristup terapiji je vrlo sličan. O povezanosti FOXP3+ stanica s kliničkim ponašanjem SLL-a nema podataka u literaturi. 56 bolesnika s primarnom morfološkom dijagnozom SLL su reevaluirani i određen je broj FOXP3+ stanica (Tablica 3., Slika 2.). Metodologija odedivanja pozitivnih stanica bila je ista kao i kod FCC limfoma. Vrijednosti FOXP3+ stanica su uspoređene s odgovorom na terapiju i preživljenjem. Rezultati su pokazali da

u naših bolesnika broj FOXP3+ stanica ne utječe na terapijski učinak i nije povezan s preživljenjem.

Smatramo da se ovi rezultati, a koji su dodatak nejasnoj ulozi FOXP3 stanica u limfomima, mogu objasniti: a) metodologijom očitavanja FOXP3+ stanica, b) heterogenim terapijskim pristupom u oba obrađena kliničko morfološka entiteta.

Tablica 1. FCC-NHL

lokalizacija	gradus				score			
	1	2	3A	3B	1	2	3	4
limfni čvor – 88	35	32	11	10	64	14	4	6
ekstranodalno - 12	5	1	3	3	6	1		3

Score: 1 nodularno; 2 nodularno i difuzno; 3 parcijalno nodularno; 4 difuzno

TERAPIJA

- Opservacija
- Remisija
- Parcijalna remisija
- Progresija
- Relaps
- Lost

ODGOVOR NA TERAPIJU

- R + varijante
- R + varijante + PBSCT
- neR + varijante
- neR + varijante + PBSCT
- PBSCT
- Nihil
- Lost

STATUS

ŽIVI 72
MRTVI 19
LOST 9

Tablica 2. FCC-NHL

FOXP3 – ODGOVOR NA TERAPIJU

FOXP3		ODGOVOR NA TERAPIJU	
• 1 i 2	1	• R + PR	1
• 3	2	• Progresija, relaps	2
• neg.	3	• Opservacija	3
• NI	9	• Lost	9

Fisher's Exact Test Table Probability (P) 0.0339

FOXP3/n

Pr <= P P=0.6484
Sample Size = 91

Fisher's Exact Test Table Probability (P) 0.0029

FOXP3/i

Pr <= P P=0.2358
Sample Size = 90

Tablica 3. SLL/CLL

56 malostaničnih B-NHL-a nakon reevaluacije grupirano je:

SLL	18
SLL/CLL	30
"mantle cell" NHL	2
"marginal zone" NHL	2
limfoplazmocitoidni NHL	4

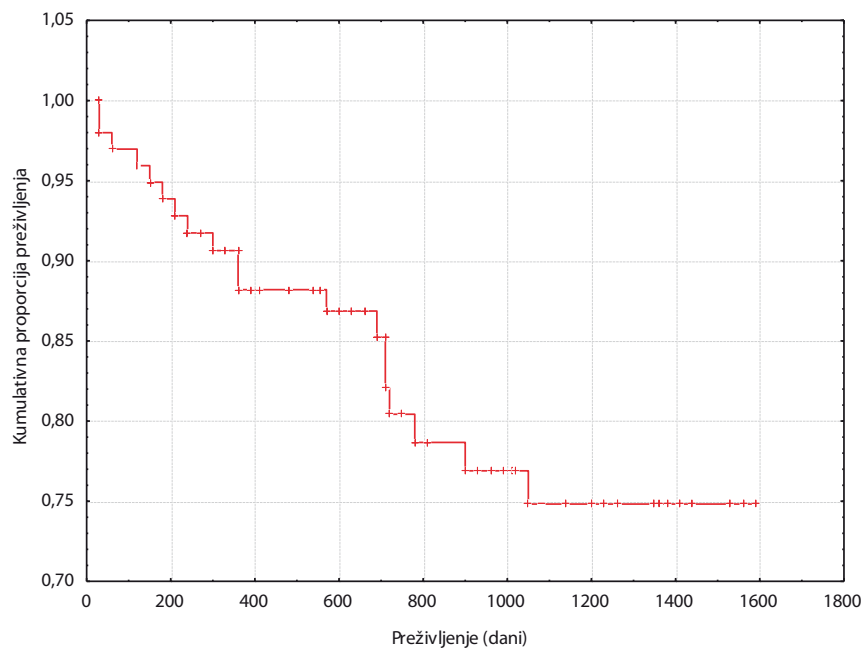
TERAPIJA

- R + VARIJANTE
- neR + VARIJANTE
- NIHIL
- LOST

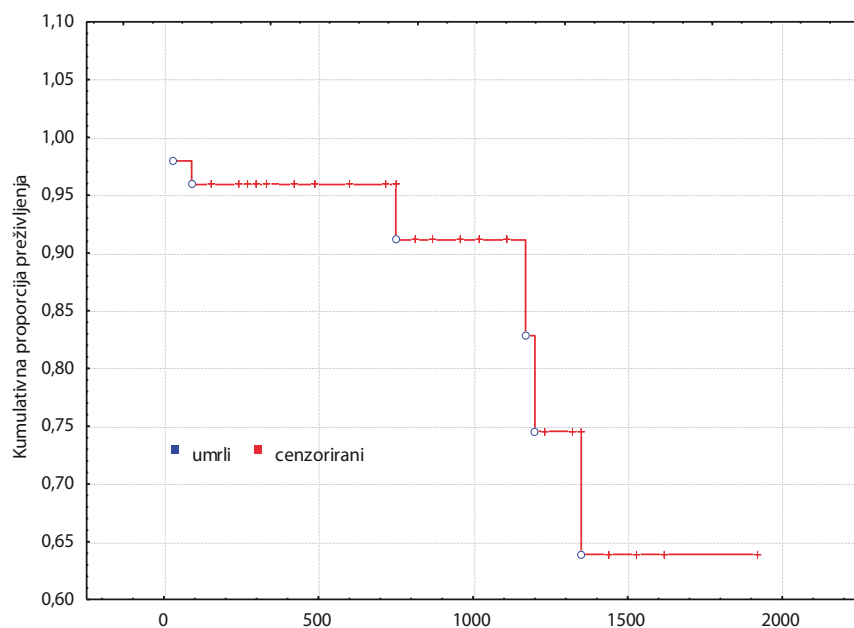
ODGOVOR NA TERAPIJU

- OPSERVACIJA
- REMISIJA
- PARCIJALNA REMISIJA
- PROGRESIJA
- LOST

Slika 1. Krivulja preživljenja FCC



Slika 2. Krivulja preživljenja za SLL/CLL

**Zahvaljujemo na kliničkim podacima:**

N. Lang, Z. Nemet-Lojan, Ž. Škunca, E. Čorović, B. Coha,
M. Dejanović, V. Suvić-Križanić, R. Babok-Flegarić,
R. Ajduković, V. Hariš, J. Petričević-Sinčić, M. Tatković,
D. Čaržavec.

Literatura:

1. Lee AM, Clear AJ, Calaminici M i sur. (2006): Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P-3 positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol*, 24;5052-59.
2. Alvaro T, Lejeune M, Salvado M-T i sur. (2006): Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiological behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol*, 24;5350-57.
3. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC. (2006): High number of tumor-infiltrating FOXP3-positive T cells are associated with improved survival in follicular lymphoma. *Blood*, 108; 2957-64.
4. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P i sur. (2008): Correlation of high number of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 93(2);193-200.
5. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G i sur. (2009): High number of tumor infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 27;1470-76.
6. De Jong D, Koster A, Hagenbeek A i sur. (2009): Impact of the tumor microenvironment on prognosis in follicular lymphoma is dependent on specific treatment protocols. *Haematologica*, 94;70-77.

Sporazum o suradnji između Republike Hrvatske i glasovitog američkog Nacionalnog instituta za rak

U Cavtatu je 25. ožujka 2010. tijekom petog Hrvatskog onkološkog kongresa potpisan sporazum o suradnji između Vlade Republike Hrvatske (RH) i Nacionalnog instituta za rak (National Cancer Institute, NCI) Nacionalnih instituta za zdravlje (National Institutes of Health, NIH) Sjedinjenih Američkih Država. Sporazum su potpisali dopredsjednik Vlade RH i ministar zdravstva i socijalne skrbi dr. Darko Milinović, ministar znanosti, obrazovanja i športa dr. Radovan Fuchs, te direktor Odjela za međunarodnu suradnju NCI dr. Joe Harford. Pokretač suradnje između američkog NCI i RH bio je dr. Steven Živko Pavletić s NCI, Bethesda, Maryland, SAD, koji je svoju karijeru svojedobno započeo na hematologiji zagrebačkog KBC Rebro.

NCI je stožerna američka institucija za liječenje i istraživanje zloćudnih bolesti. Zloćudne bolesti su među najvećim zdravstvenim problemima današnjice u svijetu i u Hrvatskoj. Hrvatska se potpisivanjem ovog izuzetno važnog sporazuma o suradnji našla među rijetkim privilegiranim državama kojima se omogućava izmjena znanja i iskustava s NCI. Hrvatski liječnici koji se bave hematološkom onkologijom, onkolozi, medicinske sestre, te znanstvenici koji se bave istraživanjem raka moći će otići u NCI na stručno i znanstveno usavršavanje. Može se pretpostaviti da će potpisana suradnja rezultirati unaprjeđenjem prevencije, dijagnostike i liječenja bolesnika sa zloćudnim bolestima u RH, te da će suradnja rezultirati brojnim daljnjim zajedničkim projektima između hrvatskih institucija i glasovitog američkog NCI.



