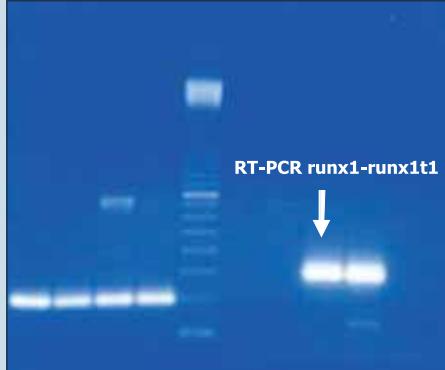
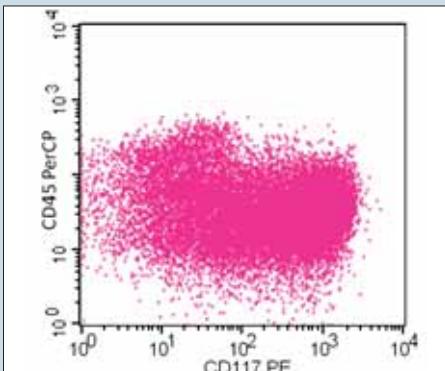
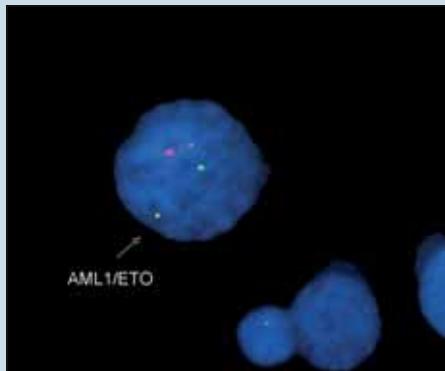
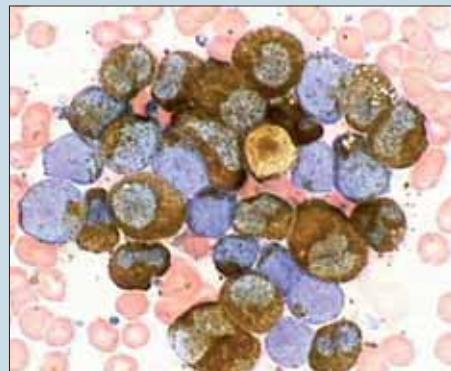
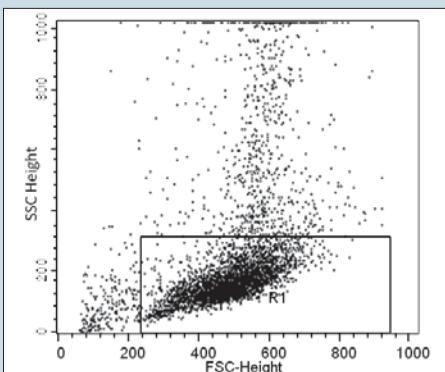
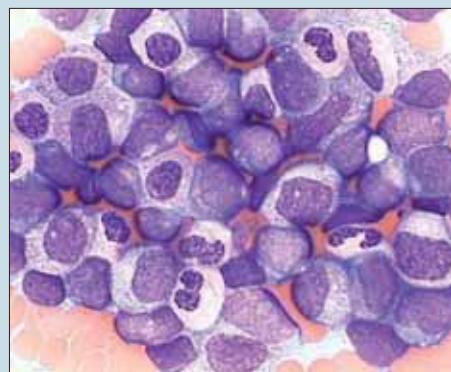


Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem



Volumen 3., Broj 1.

Krohema

Impresum

Bilten Krohema
Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem
Volumen 3., Broj 1., Svibanj 2011.

Nakladnik:

Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti Krohem

Za nakladnika:

Boris Labar

Glavni urednik:

Dražen Pulanić

Tajnica Krohema:

Dijana Perčin

Autori tekstova:

Renata Babok-Flegarić	Rajko Kušec
Sandra Bašić-Kinda	Boris Labar
Drago Batinić	Nada Lang
Ernest Bilić	Ružica Lasan Trčić
Božena Coha	Zlatka Nemet-Lojan
Dubravka Čaržavec	Vlatko Pejša
Elizabeta Čorović	Zinaida Perić
Srđana Čulić	Jasminka Petričević-Sinčić
Sanja Davidović	Željko Prka
Antica Duletić-Načinović	Dražen Pulanić
Nadira Duraković	Dubravka Sertić
Paula Granić	Ljubica Škare-Librenjak
Velka Gverić-Krečak	Radovan Vrhovac
Branimir Jakšić	Renata Zadro
Ika Kardum-Skelin	

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:

Prikaz dijagnostičkih postupaka u bolesnika s *de novo* akutnom mijeloičnom leukemijom (AML). Prvi stupac: prema citomorfologiji (gore) i citokemijskom nalazu peroksidaze (dolje) stanice su svrstane u skupinu AML-M2 prema FAB-u. Drugi stupac: klasična citogenetika (G-pruganje), FISH i molekularni nalaz u istog bolesnika otkrivaju translokaciju t(8;21) (gore), fuzijski produkt AML1/ETO (sredina) i umnoženi produkt runx1-runx1t1 (dolje). Treći stupac: protočnocihotmetrijski nalaz stanica koštane srži istog bolesnika - veličina i zrnatost stanica (gore) i izražaj biljega CD117 vs. CD45 (dolje). Konačna dijagnoza prema WHO: **AML s t(8;21)(q22;Q22); RUNX1-RUNX1T1**. Ustupljeno i priređeno ljubaznošću Radne skupine Krohema za laboratorijsku hematologiju i morfologiju.

Sadržaj

B. Labar:	
Uvodnik.....	2
B. Labar, R. Kušec, B. Jakšić, Lj. Škare-Librenjak, A. Duletić-Načinović, J. Petričević-Sinčić, D. Čaržavec, B. Coha, V. Gverić-Krečak, E. Čorović, N. Lang, Z. Nemet-Lojan, R. Babok-Flegarić:	
Dijagnostičko-terapijski pristup u bolesnika s esencijalnom trombocitemijom Smjernice Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti-KROHEM.....	3
V. Pejša:	
(R)-DA-EPOCH u liječenju bolesnika s agresivnim NHL	11
Ž. Prka:	
Izvanbolnička primjena DA-EPOCH protokola	13
A. Duletić-Načinović:	
Primarni limfomi središnjeg živčanog sustava	15
S. Bašić-Kinda:	
Bendamustin - stari/novi lijek za liječenje limfoproliferativnih bolesti	18
S. Čulić:	
Von Willebrandova bolest	22
D. Pulanić, V. Gverić-Krečak:	
Praćenje učestalosti venskih tromboembolijskih bolesti u Republici Hrvatskoj	25
N. Duraković, E. Bilić, R. Vrhovac:	
Postupnik kod neutropenijske vrućice	27
D. Sertić:	
Dasatinib u liječenju Ph pozitivne kronične mijeloične leukemije - naše iskustvo	30
P. Granić:	
Određivanje koncentracije imatiniba u humanoj plazmi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s UV detektor (HPLC-UV)	32
Z. Perić:	
Registri za kroničnu mijeloičnu leukemiju	34
Z. Perić:	
Paroksizmalna noćna hemoglobinurija	36
D. Batinić, I. Kardum-Skelin, R. Lasan Trčić, S. Davidović, R. Zadro:	
Standardni pristup laboratorijskoj dijagnostici akutnih leukemija	38
D. Sertić:	
Fotografije iz Vodica i Šibenika sa sastanka Krohema u studenom 2010.....	43

KROHEM

KROHEM sve ozbiljnije korača. Više ne postoji bojazan je li KROHEM sastavni dio hrvatske hematologije. Sada je sve više pitanja kako djelovati, ponajprije ne samo od sastanka do sastanka. Svim čitateljima Biltena želim uputiti nekoliko poruka, možda više pitanja sa ciljem da ih potaknem i na razmišljanje ali i na akciju. Naši sastanci kao odraz podneblja i tradicionalnog edukacijskog pristupa kao da su rezervirani za raspravu šefova, voditelja pojedinih radnih skupina, što je dobro. Ali nedostaje inicijativa mlađih, njihova aktivnost i konstruktivni prijedlozi, nove vizije, ta nužna kreativnost mlađih koja gleda 20-30 godina unaprijed. Stoga u posljednje vrijeme razmišljam kako i na koji način uz sve naše aktivnosti, KROHEM učiniti prepoznatljivim našoj budućnosti, ne samo kroz subordinaciju, već i kreaciju. Kad kažem subordinaciju mislim na konkretan posao koji za potrebe KROHEM-a obavljaju najčešće i najviše mlađi suradnici. Ovim ih putem pozivam da se što aktivnije uključe u život KROHEM-a.

Sve naše aktivnosti više-manje kreću uzlaznom putanjom. Postoji malo nezadovoljstvo Registrom KROHEM-a. Čak ne bih rekao načinom i brzinom kako pristižu podaci u Registre pojedinih bolesti već rješavanjem zajedničkog koncepta. Dok Registar bude isključivo funkcionirao dobrom voljom pojedinaca a bez jasne svakodnevne stručne profesionalne poruke, osjećaj je da nikad neće biti dovoljno kvalitetan za sve ono što želimo od Registra: epidemiološke pokazatelje i dobru bazu podataka za hematološke bolesti. Registar mora postati trajni prioritet i pokazatelj kvalitete rada KROHEM-a.

Odredili smo što to znači biti članom KROHEM-a. Definicija članova ima za cilj pozitivni poticaj za rad u KROHEM-u, a nikako ograničavanje prava pojedincima, ponajprije mlađim kolegama.

Web stranica KROHEM-a još uvijek nije našla svoje mjesto, ne živi. Ona je još uvijek forma a ne sredstvo komunikacije među članovima KROHEM-a. Stranica ne može biti samo "usputna stanica"...

Projekti kliničke i translacijske studije su na vratima što je izazov neposrednih budućih dana: kliničke studije akutne mijeloidne leukemije, kronične limfocitne leukemije, kronične mijeloidne leukemije, hemostaze i tromboze i još nekoliko njih u pripremi samo nagovještavaju svjetliju budućnost KROHEM-a.

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

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, Jasmina Petričević-Sinčić⁶, Dubravka Čaržavec⁷, Božena Coha⁸, Velka Gverić-Krečak⁹, Elizabeta Čorović¹⁰, Nada Lang¹¹, Zlatka Nemet-Lojan¹², Renata Babok-Flegarić¹³

1 – Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb

2 – Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Dubrava, Zagreb

3 – Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Merkur, Zagreb

4 – Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, KBC Split

5 – Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, KBC Rijeka

6 – Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku, KBC Osijek

7 – Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Sestre Milosrdnice, Zagreb

8 – Internistički Odjel, OB Josip Benčević, Slavonski Brod

9 – Internistički odjel, OB Šibenik

10 – Internistički odjel, OB Dubrovnik

11 – Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Sv. Duh, Zagreb

12 – Internistički odjel, OB Koprivnica

13 – Internistički odjel, OB Varaždin

Adresa autora za kontaktiranje:

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

S a ž e t a k

Esencijalna trombocitemija (ET) je klonalni mijeloproliferativni zločudni tumor. Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti, KROHEM, predlaže smjernice dijagnostičkog i terapijskog pristupa. Dijagnoza ET temelji se na kriterijima dijagnostike i podjele mijeloidnih zločudnih tumora Svjetske zdravstvene organizacije (SZO). Razina terpijskih preporuka polazi od pokazatelja predloženih od elektronskog izvora medicinskih informacija, *UpToDate®*. Za dijagnozu ET potrebno je dokazati trajan porast broja trombocita ($>450 \times 10^9/L$), uz tipičnu histološku sliku megakariocitopoeze u koštanoj srži, te isključiti postojanje sekundarne trombocitoze ili drugih kroničnih mijeloproliferativnih zločudnih tumora. Liječenje se temelji na pokazateljima rizika bolesti koji je određen brojem trombocita, dobi bolesnika te prisutnošću rizika ili znakova tromboze i krvarenja. Bolesnike niskog rizika (dob < 60 godina i trombociti $< 1000 \times 10^9/L$) ne treba liječiti već samo pratiti. U iste dobne skupine bolesnika ovisno o broju trombocita predlaže se liječenje anagrelidom (kada su trombociti $1000-1500 \times 10^9/L$) ili hidroksurejom (kada su trombociti $> 1500 \times 10^9/L$). U bolesnika visokog rizika (dob > 60 godina) prva linija terapije je hidroksureja a anagrelid se primjenjuje u bolesnika s nepotpunim odgovorom na hidroksureju. U trudnica, kada je potrebno liječenje, preporučuje se alfa interferon.

* Napomena: Ovaj tekst objavljen je u Liječničkom vjesniku 2010;132:333-339., te ga prenosimo uz odobrenje glavnog urednika Liječničkog vjesnika.

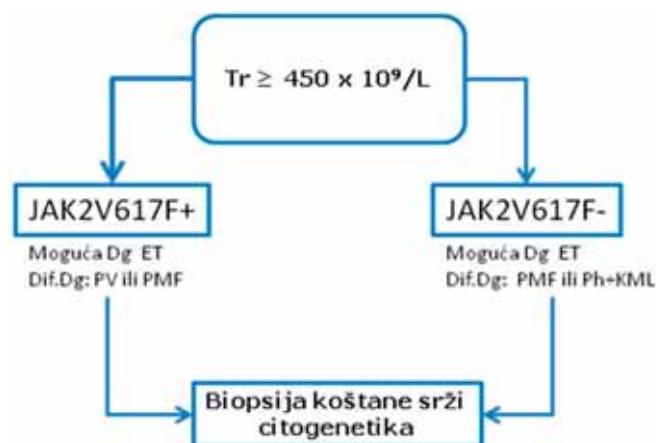
1.0 Uvod

Esencijalna trombocitemija (ET) je klonalni zločudni tumor krvotvornih matičnih stanica i prema podjeli Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) ubraja se u Ph negativne kronične mijeloproliferativne zločudne tumore (MPN)¹. ET se obično pojavljuje u starijoj dobi i prvenstveno ju treba razlikovati od relativno čestih stanja sa sekundarnom, reaktivnom trombocitozom kao npr. pri kroničnom gubitku krvi, hemolitičkoj anemiji, u kroničnim upalnim stanjima, infekcijama i različitim zločudnim tumorima.

2.0 Smjernice – dijagnostički pristup

Dijagnostika ET započinje određivanjem broja trombocita (Slika 1.).

Slika 1. Dijagnostički postupnik u ET.²



Svaka trombocitoza $\geq 450 \times 10^9/\text{L}$ (I.) prvi je pokazatelj moguće ET. Drugi test u ovom algoritmu je određivanje JAK2V617F u perifernoj krvi (II.). Pozitivan nalaz mutacije JAK2V617F ukazuje da se vrlo vjerojatno radi o ET ali treba isključiti ostale MPN tj. policitemiju veru (PV) i primarnu mijelofibrozu (PMF)². Negativan nalaz mutacije JAK2V617F ne isključuje dijagnozu ET. No u slučaju negativnog nalaza moguća je i dijagnoza PMF i Philadelphia pozitivne kronične mijeloične leukemije (Ph+ KML)². Slijedeći postupci u dijagnostici su biopsija kosti i citogenetika (III.). Citogenetičkim pretragama treba isključiti Ph+ KML. U oko 9% bolesnika s ET može se dokazati citogenetske promjene, koje nisu specifične za ET³. Histološke značajke ET u optičkom materijalu koštane srži su nalaz proliferacije ponajprije megakariocitne loze s povećanim brojem velikih, zrelih megakariocita, a bez značajnog porasta ili pomaka u lijevo neutrofilne granulocitopoeze i eritrocitopoeze. Ako se nađu patuljasti megakariociti opravdano je molekularnim tehnikama (RT-PCR) dokazati ili isključiti postojanje *BCR-ABL* prijepisa, unatoč prethodno negativnom citogenetskom

nalazu za t(9;22)². Važno je napomenuti da se pri obradi i tumačenju rezultata treba što je moguće striktnije pridržavati preporuka SZO za obradu bolesnika koji boluju od zločudnih mijeloidnih tumora¹ (Prilog 1.).

Temeljni dijagnostički kriteriji za ET prema SZO¹ navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Kriteriji za dijagnozu esencijalne trombocitemije (ET) prema SZO.¹

Za dijagnozu ET potrebna su 4 kriterija	
1.	Trajno povećani broj trombocita $\geq 450 \times 10^9/\text{L}$
2.	U biopsiji koštane srži nalaz proliferacije ponajprije megakariocitne loze s povećanim brojem velikih, zrelih megakariocita, a bez značajnog porasta ili pomaka u lijevo neutrofilne granulocitopoeze i eritrocitopoeze.
3.	Nepostojanje kriterija za policitemiju veru [†] , primarnu mijelofibru [‡] , <i>BCR-ABL</i> -pozitivnu KML [§] ili mijelodisplastični sindrom , ili drugi mijeloidni zločudni tumor
4.	Dokaz JAK2V617F ili drugog klonalnog biljega, ili u slučaju negativnog nalaza JAK2V617F nepostojanje pokazatelja za reaktivnu trombocitozu

[†] Potreban je i kriterij koji pokazuje da se primjenom željeza ne može povećati razina hemoglobina do razine PV u slučaju snižene vrijednosti feritina. PV se može isključiti temeljem vrijednosti hemoglobina i hematokrita, i nije potrebno načiniti određivanje mase eritrocita.

[‡] Nepostojanje značajne retikulinske fibroze, kolagenske fibroze, leukoeritroblastoze u perifernoj krvi, ili značajno hipercelularne koštane srži uz megakariocitnu morfologiju koja je tipična za primarnu mijelofibru – mali do veliki megakariociti s poremećenim odnosom jezgre/citoplazme kao i hiperkromatskim okruglim do nepravilno uvučenim jezgrama te gustim nakupinama.

[§] Neophodna je odsutnost *BCR-ABL* prijepisa.

^{||} Neophodno je dokazati nepostojanje diseritrocitopoeze i disgranulocitopoeze.

Uzroci reaktivne trombocitoze su manjak željeza, splenektomija, kirurški zahvat, infekcije, upale, bolesti vezivnog tkiva, metastatski karcinom, i limfoproliferativne bolesti. Međutim, prisustvo bilo koje od navedenih bolesti i stanja s reaktivnom trombocitozom ne isključuje mogućnost ET, ako su zadovoljeni ostali kriteriji.

ET je potrebno razlikovati od sekundarne, reaktivne trombocitoze. Značajke diferencijalne dijagnoze između reaktivne trombocitoze i ET prikazuje Tablica 2.

Tablica 2. Diferencijalna dijagnoza ET od reaktivne ili sekundarne trombocitoze.

NALAZ	ESENCIJALNA TROMBOCITEMIJA	TROMBOCITOZA SEKUNDARNA (REAKTIVNA)
Osnovna sistemska bolest	Ne	Često klinički vidljiva
Ishemija prstiju i cerbrovaskularna ischemija	Karakteristično	Ne
Arterijska ili venska tromboza velikih krvnih žila	Povećan rizik	Ne
Krvarenje	Povećan rizik	Ne
Splenomegalija	Da u oko 40%	Ne
Razmaz periferne krvi	Gigantski trombociti	Normalni trombociti
Megakariociti u koštanoj srži Broj Morfološke promjene	Povećan Gigantski, displastični oblici s povećanjem ploidije; velike mase ostataka trombocita	Da Normalne
Mutacija JAK2V617F	prisutna u ~50% pacijenata	nema mutacije

3.0 Smjernice za terapijski postupnik

Terapijski pristup ima za cilj spriječiti pojavnost ozbiljnih komplikacija ponajprije tromboze i embolije. Stoga se terapijski pristup u bolesnika s ET temelji na riziku moguće pojave tromboze i krvarenja (Tablica 3.). Temeljem rizika bolesnici se dijele u dvije skupine: one malog i one velikog rizika⁴.

Tablica 3. Podjela bolesnika s ET temeljem rizika za pojavnost tromboze i krvarenja.⁴

Mali rizik	Veliki rizik
<ul style="list-style-type: none"> Dob < 60 godina Broj trombocita < 1000 x 10⁹/L Bez anamneze tromboza/trombofilije 	<ul style="list-style-type: none"> Dob ≥ 60 godina i/ili Pozitivna anamneza za trombozu/trombofiliju

Iz ove jednostavne podjele vidljivo je da se bolesnici s obzirom na dob, broj trombocita, anamnestičke pokazatelje o tromboembolijskoj bolesti ili sklonosti za trombozu ili emboliju mogu svrstati u nekoliko terapijskih skupina. Temeljem tih kriterija Tablica 4. prikazuje preporuke liječenja ET.

Tablica 4. Preporuke liječenja u bolesnika s ET.

Broj Tr (x10 ⁹ /L)	< 60 godina		≥ 60 godina
	Mali rizik (bez simptoma, bez ranije tromboze/ trombofilije, JAK2 neg.)	Veliki rizik Bolesnici sa simptomima, ranije tromboze/ trombofilije, JAK2 poz.)	
450-1000	0 ili ASK	ANG ili IFNa* + ASK	ASK + (HU**)
1000-1500	ANG ili IFNa*	ANG ili IFNa* + ASK	HU
1500-2000	HU → ili ANG ili IFNa*	HU → ANG ili IFNa	HU
>2000	HU (+/-TF) → IFNa* ili ANG	HU (+/-TF) → IFNa ili ANG	TF+ HU

ANG = anagrelid; ASK = aspirin; HU = hidroksiureja; IFNa = interferon-alfa, TF = trombocitafereza

* = u bolesnica trudnica i tijekom dojenja;

** = u bolesnika s kliničkim simptomima tromboze.

3.1. RAZINA PREPORUKE⁴ (Prilog 2.)

3.1.1. Bolesnici s malim rizikom tj. bolesnici bez simptoma, koji su mlađi od 60 godina a trombociti su ispod $1000 \times 10^9/L$:

U tih se bolesnika predlaže praćenje^{6,7} (**Razina preporuke 2b**)*. Preporuka je ako postoji bilo koji pokazatelj ili sumnja na trombofiliju (vidi uzroci venske tromboze – Prilog 3.), načiniti odgovarajuću obradu.

Preporuka je svakih 8-12 tjedana kontrola broja trombocita i temeljem broja trombocita odnosno simptoma i znakova postupiti prema smjernicama navedenim u ovom programu.

* Vidi Prilog 2.

3.1.2. Bolesnici bez simptoma, koji su mlađi od 60 godina, a trombociti su iznad $1000 \times 10^9/L$:

Predlaže se liječenje anagrelidom (**Razina preporuke 2c**)*, ako broj trombocita ne prelazi $1500 \times 10^9/L$. Za veće vrijednosti trombocita ($>1500 \times 10^9/L$) preporuča se započeti liječenje hidroksiurejom (**Razina preporuke 2c**)*. Primjena lijekova temelji se na pokazateljima da je uz povećani broj trombocita prisutan povećani rizik za krvarenja⁸⁻¹⁰. Usto izražita trombocitoza može potaknuti poremećenu adsorpciju velikih multimera von Willebrandovog faktora (VWF) što ima za posljedicu poremećaj hemostaze¹¹. Anagreliid pokazuje dobar učinak na broj trombocita¹²⁻¹⁴. Preporuka doze za anagreliid: $2 \times 0,5 \text{ mg}$ kao početna doza a potom povećanje doze do željenog učinka za $0,5 \text{ mg/tjedno}$. Optimalna doza je od 1 do 4 mg/dan ($4 \times 1 \text{ mg/dan}$) postiže se za 5 do 7 tjedana. Hidroksiureja^{15,16} se primjenjuje u početnoj dozi od 1,5 do 2,0 grama. Nakon što se postigne željeni učinak doza se smanjuje na dozu održavanja (obično 0,5-1,0 grama/dan tj. primjenjuje se ona doza koja održava željeni broj trombocita ispod $450 \times 10^9/L$. Anagreliid^{12-14,18} se predlaže primjeniti u stanjima nepotpunog odgovora na hidroksiureju (trombociti iznad $800 \times 10^9/L$), na isti način kao u bolesnika bez simptoma, koji su mlađi od 60 godina a trombociti su iznad $1000 \times 10^9/L$. Procjena primjene hidroksiureje i anagrelida ovisi i o pojavi/težini neželjenih reakcija ova dva lijeka¹⁹⁻²⁵ (Prilog 4.).

preporuke 1b)*. Prva linija terapije je hidroksiureja¹⁵⁻¹⁷ u početnoj dozi od 1,5 do 2,0 grama. Nakon što se postigne željeni učinak doza se smanjuje na dozu održavanja (obično 0,5-1,0 grama/dan tj. primjenjuje se ona doza koja održava željeni broj trombocita ispod $450 \times 10^9/L$. Anagreliid^{12-14,18} se predlaže primjeniti u stanjima nepotpunog odgovora na hidroksiureju (trombociti iznad $800 \times 10^9/L$), na isti način kao u bolesnika bez simptoma, koji su mlađi od 60 godina a trombociti su iznad $1000 \times 10^9/L$. Procjena primjene hidroksiureje i anagrelida ovisi i o pojavi/težini neželjenih reakcija ova dva lijeka¹⁹⁻²⁵ (Prilog 4.).

3.1.4. Bolesnice trudnice, dojilje ili bolesnice koje planiraju trudnoću:

U bolesnica s malim rizikom ne preporuča se primjena lijekova koji smanjuju broj trombocita²⁶ (**Razina preporuke 2C**)*. U bolesnica s anamnezom spontanog abortusa predlaže se primjeniti aspirin i ili interferon, iako ne postoje jasni dokazi učinka ove terapije²⁷ (**Razina preporuke 2C**)*.

U bolesnica velikog rizika preporuča se primjeniti interferon^{28,29} (**Razina preporuke 2C**)*. Prosječna početna doza je 3 milijuna, iako se može primjeniti i doza od 5 milijuna jedinica/m² na dan. U bolesnica velikog rizika s anamnezom abortusa treba što prije započeti primjenom heparina, interferona i aspirina.

3.1.5. Ostalo

U bolesnika s vazomotornim simptomima predlaže se primjena aspirina (100 mg/dan), u slučajevima nepostojanja stečene von Willebrandove bolesti⁴ (**Razina preporuke 2C**)*.

Zbog trombogenog učinka predlaže se zabrana pušenja i u pretilih osoba smanjenje tjelesne težine^{20,31} (**Razina preporuke 2C**)*.

* Vidi Prilog 2.

U slučajevima ekstremne trombocitemije sa znacima krvarenja ili tromboze predlaže se uz lijekove za smanjenje broja trombocita načiniti trombocitaferezu³² (trombociti $> 2000 \times 10^9/L$) (**Razina preporuke 2C**)*.

* Vidi prilog 2.

3.1.3. Bolesnici bez simptoma, visokog rizika, stariji od 60 godina s prisutnim faktorima rizika za kardiovaskularnu bolest:

Predlaže se primjena lijekova koji smanjuju broj trombocita na vrijednosti ispod $450 \times 10^9/L$ (**Razina**

Prilog 1. Preporuke dijagnostičkog postupka u mijeloidnih zločudnih tumora prema SZO.⁴

Uzorak

- Uzorak periferne krvi i koštane srži treba uzeti prije početka liječenja;
- Uzorak periferne krvi ili razmaz aspirata koštane srži i/ili „touch“ preparat treba obojati MGG ili sličnim bojenjem;
- Uzorak koštane srži dobiven biopsijom treba biti dugačak najmanje 1.5 cm. Biopsiju treba napraviti pod pravim kutem prema kortikalisi kosti, kada god je to moguće;
- Treba uzeti uzorak koštane srži za citogenetsko ispitivanje te za protočni razvrstač stanica uz dodatni uzorak koji se smrzava za molekularna ispitivanja. Molekularno testiranje treba provoditi temeljem nalaza kariograma, kliničkih i morfoloških nalaza te imunofenotipizacije

Blasti

- Postotak blasta u perifernoj krvi i u koštanoj srži treba određivati ručnom metodom;
- Mijeloblasti. Monoblasti, promonociti, megakarioblasti (ne i displastični megakariociti) se ubrajaju u blaste i njihov zbroj predstavlja broj (%) blasta u dijagnostici AML ili blastične transformacije; patološki promijelociti se također ubrajaju u blaste u slučaju dijagnoze APL (AML-M3)
- Proeritroblasti se ne ubrajaju u blaste osim u rijetkim slučajevima čiste eritroleukemije
- Određivanje CD34+ stanica protočnom citometrijom ne preporuča se kao zamjena za pregled razmaza; svi blasti ne ispoljavaju CD34 biljeg, U slučaju nedostatnog uzorka dobivenog punkcijom ili ako je prisutna fibroza koštane srži, moguće je imunohistokemijom na CD34 stanice u biopšćkom materijalu odrediti broj blasta.

Određivanje tipa blasta (lozi kojoj pripadaju)

- Preporuča se primjena multiparametrijskog protočnog razvrstača stanica s više od 3 boje; panel protutijela mora biti dostatan da odredi lozu kao i aberantne antigene zločudne tumorske populacije.
- Citokemija također može biti od pomoći, ponajprije određivanje mijeloperoksida ili nespecifičnih esteraza u AML, u slučajevima nejasne dijagnoze, ali u većine bolesnika s akutnom leukemijom nije od posebne vrijednosti.
- Zbog postojanja velikog broja antitijela sve se više koristi imunohistokemija; ova je metoda od koristi u razlikovanju mijeloidnih i limfoidnih antigena.

Određivanje genetskih promjena

- Kada god je to moguće treba provesti kompletну citogenetiku stanica koštane srži pri dijagnozi
- Ostala ispitivanja kao FISH, RT-PCR, određivanje mutacija ovisi o procjeni kliničkih, laboratorijskih i morfoloških pokazatelja
- Preporuča se određivanje mutacija *NPM1*, *CEBPA* i *FLT3* u svih bolesnika s AML i normalnom citogenetikom; *JAK2* treba određivati u *BCR-ABL1*-negativnih mijeloproliferativnih zločudnih tumora, a mutacije *KIT*, *NRAS*, *PTNP11*, itd. primjenjuju se u slučajevima kliničke indikacije

Usporedba/Prikaz nalaza

- Sve je nalaze potrebno prikupiti i prikazati kao zajedničko izvješće temeljem podjele SZO

Prilog 2. Razina terapijskih preporuka prema UptoDate.⁵

RAZINA PREPORUKE	JASNOĆA MEĐUODNOSA PREDNOST/RIZIK	KAKVOĆA DOKAZA	IMPLIKACIJE
1A. Jaka preporuka, visoka razina dokaza	Prednosti se jasno razlikuju i znatno su veće od rizika i izdataka ili obrnuto;	Čvrsti dokazi temeljem dobro provedenih randomiziranih, kontroliranih kliničkih ispitivanja ili čvrsti dokazi drugog načina ispitivanja. Nije za očekivati da bi buduća istraživanja mijenjala naš stav u procjeni prednosti i rizika.	Jaka preporuka se može bez ikakvih rezervi primjeniti u većine bolesnika i u većine stanja. Kliničar treba slijediti ove preporuke osim ako nisu prisutni vrlo jasni i čvrst racional za drugačiji pristup.
1B. Jaka preporuka, umjerena razina dokaza	Prednosti se jasno razlikuju od rizika; mogu biti znatno veće od rizika ili obrnuto;	Dokazi temeljem randomiziranih, kontroliranih kliničkih ispitivanja s ograničenjima (nedosljedni rezultati, metodološke greške, nedovoljno precizne studije) ili čvrsti dokazi drugog načina ispitivanja. Za očekivati je da bi buduća istraživanja mogla utjecati na stav u procjeni prednosti i rizika i stoga mogla dovesti do promjene procjene preporuke.	Jaka preporuka koja se može primjeniti kod većine bolesnika. Kliničar treba slijediti ove preporuke osim ako nisu prisutni vrlo jasan i čvrst racional za drugačiji pristup.
1C. Jaka preporuka, mala razina dokaza	Prednosti se ne razlikuju jasno od rizika;	Dokazi temeljem opservacijskih kliničkih ispitivanja, nesustavnog kliničkog iskustva ili temeljem randomiziranih kontroliranih kliničkih ispitivanja s ozbiljnom pogreškom. Bilo koja procjena učinka nije sigurna.	Jaka preporuka koja se može primjeniti kod većine bolesnika. Dokazi na kojima se temelji preporuka su male razine kvalitete.
2A. Slaba preporuka, velike razine dokaza.	Prednosti se ne razlikuju jasno od rizika i izdataka;	Čvrsti dokazi temeljem dobro provedenih randomiziranih, kontroliranih kliničkih ispitivanja ili čvrsti dokazi drugog načina ispitivanja. Nije za očekivati da bi buduća istraživanja mijenjala naš stav u procjeni prednosti i rizika.	Slaba preporuka, primjena se može razlikovati ovisno o mogućnostima, stavu bolesnika ili socijalnim pokazateljima.
2B. Slaba preporuka, umjerene razine dokaza.	Prednosti se ne razlikuju jasno od rizika i izdataka; nejasnoće u procjeni prednosti, rizika i izdataka.	Dokazi temeljem randomiziranih, kontroliranih studija s ozbiljnim ograničenjima (nedosljedni rezultati, metodološke greške, nedovoljno precizne studije) ili čvrsti dokazi drugog načina ispitivanja. Za očekivati je da bi buduća istraživanja mogla utjecati na stav u procjeni prednosti i rizika i stoga mogla dovesti do promjene procjene preporuke.	Slaba preporuka s pristupom prema procjeni što je u određenim situacijama boljeza određene bolesnike.
2C. Slaba preporuka, mala razina dokaza.	Nije moguća procjena prednosti, rizika i izdataka. Prednosti se ne razlikuju jasno od rizika i izdataka;	Dokazi temeljem opservacijskih kliničkih ispitivanja, nesustavnog kliničkog iskustva ili temeljem randomiziranih kontroliranih kliničkih ispitivanja s ozbiljnom pogreškom. Bilo koja procjena učinka nije sigurna.	Vrlo slaba preporuka. Bilo koji drugi pristup čini se da je jednako prihvatljiv.

Prilog 3. Trombofilije – nasljedni i stečeni poremećaji.

Nasljedne trombofilije	Stečeni poremećaji
<ul style="list-style-type: none"> Mutacija faktora V Leiden Mutacija protrombinskog gena Manjak proteina S Manjak proteina C Manjak antitrombina Rijetki poremećaji Disfibrinogenemija 	<ul style="list-style-type: none"> Zločudni tumori Centralni venski kateter Kirurški zahvat (ponajprije ortopedski) Trauma Trudnoća Oralni kontraceptivi Hormonska nadomjesna terapija Tamoksifen, Bevacizumab, Talidomid, Lenalidomid Imobilizacija Dekompenzacija srca Antifosfolipidni sindrom Mijeloproliferativni zločudni tumori Policitemija vera Esencijalna trombocitemija Paroksizmalna noćna hemoglobinurija Upalna bolest crijeva Nefrotski sindrom Hiperviskoznost Waldenstromova makroglobulinemija Multipli mijelom Izrazita leukocitoza u akutnih leukemija Anemija srpastih stanica HIV/AIDS

Prilog 4. Nuspojave/toksičnost/mjere opreza tijekom liječenja hidroksiurejom i anagrelidom.¹⁹⁻²⁵

Hidroksiureja

- Supresija koštane srži. Može se javiti, ponajprije u bolesnika s anamnezom liječenja kemoterapijom ili ozračenjem.
- Kožni vaskulitis (vaskulitis s ulceracijama i gangrenom): javlja se pogotovo uz istodobnu primjenu s interferonom; ako se razvije kožni vaskulitis treba prekinuti liječenje hidroksiurejom.
- Sekundarna leukemija: hidroksiureja je mutageni i klastogeni lijek. Dugotrajno liječenje mijeloproliferativnih zločudnih tumora (PV i ET) dovodi do pojave sekundarne leukemije; međutim, nije poznato koliko je pojava sekundarne leukemije posljedica lijeka i koliko je znak transformacije mijeloproliferativnog zločudnog tumora.
- Megalobastična eritrocitopoeza: opaža se u ranoj fazi liječenja; utilizacija željeza od strane prethodnih stanica eritrocitne loze je usporena.
- Učestalost nuspojava $\geq 10\%$
Neutropenija, anemija, ulcera usne šupljine, hiperpigmentacije, osip, promjene nokata, ulkusi kože na nogama, promjene poput lihen planusa usta i kože, mučnina, proljevi.

Anagrelid

- Učestalost nuspojava veća od 10%
 - Kardiovaskularne: palpitacije (26%), edem (21%)
 - Središnji živčani sustav: glavobolja (44%), vrtoglavica (15%), bol (15%)
 - Gastrointestinalni sustav: proljev (26%), mučnina (17%), bol u trbuhi (16%)
 - Neuromuskularni sustav: mišićna slabost (23%)
 - Respiratori sustav: dispneja (12%)
- Plućna toksičnost: primjenom anagrelida se povezuje intersticijska bolest pluća (alergijski alveolitis, eozinofilna pneumonija i intersticijski pneumonitis). Pojava toksičnosti od jednog tjedna do nekoliko godina, a obično se očituje progresivnom dispnejom i plućnim infiltratom. Simptomi se obično značajno smanjuju nakon prekida liječenja
- Primjena uz oprez:
 - U slučaju bolesti kardiovaskularnog sustava ponajprije tahikardije, ortostatske hipotenzije ili srčane dekompezacije
 - U slučaju povećanih vrijednosti jetrenih enzima. Ako su vrijednosti > 1.5 puta od gornje referentne vrijednosti preporuka je reducirati dozu kako bi se zadržao učinak i smanjila razina aktivnosti transferaza. U slučaju teške jetrene lezije primjena anagrelida je kontraindicirana
 - U bubrežnog oštećenja, ako je serumski kreatinin veći od 200 mg/L striktno pratiti primjenu lijeka, i u slučaju porasta kreatinina prekinuti liječenje

Literatura

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114:937-51.
2. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008; 22:14-22.
3. Gangat N, Tefferi A, Thanarajasingam G, Patnaik M, Schwager S, Ketterling R, Wolanskyj AP. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur J Haematol.* 2009;83:17-21.
4. Tefferi A. Prognosis and treatment of essential thrombocythemia. <http://www.uptodate.com>. 2009.
5. Editorial Policy: Grading guide. <http://www.uptodate.com>. 2009.
6. Ruggeri M; Finazzi G; Tosetto A; Riva S; Rodeghiero F; Barbui T No treatment for low-risk thrombocythaemia: results from a prospective study. *Br J Haematol.* 1998; 103:772-7.
7. Finazzi G, Barbui T. Expertise-based management in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Cancer J.* 2007; 13:372-6.
8. Bellucci S; Janvier M; Tobelem G; Flandrin G; Charpak Y; Berger R; Boiron M. Essential thrombocythemia. Clinical evolutionary and biological data. *Cancer.* 1986;58:2440-7
9. Fenaux P, Simon M, Caulier MT, Lai JL, Goudemand J, Bauteurs F. Clinical course of essential thrombocythemia in 147 cases. *Cancer.* 1990;66:549-56.
10. Tefferi, A. Risk-based management in essential thrombocythemia. ASH Education Program Book. Hematology. 1999:172.
11. Budde U; van Genderen PJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Semin Thromb Hemost.* 1997;23:425-31.
12. Boban A, Sertić D, Radman I, Zupanić-Salek S, Zadro R, Labar B. Anagrelid u liječenju bolesnika s esencijalnom trombocitemijom. *Lij Vjes.* 2008;130:141-5
13. Reilly JT. Anagrelide for the treatment of essential thrombocythemia: a survey among European hematologists/oncologists. *Hematology.* 2009;14:1-10.
14. Pettit RM, Silverstein MN, Petrone ME. Anagrelide for control of thrombocythemia in polycythemia and other myeloproliferative disorders. *Semin Hematol.* 1997;34:51-4.
15. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, Barbui T. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med.* 1995; 332:1132-6.
16. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, Wilkins BS, van der Walt JD, Reilly JT, Grigg AP, Revell P, Woodcock BE, Green AR. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med.* 2005;353(1):33-45.
17. Finazzi G, Barbui T. Expertise-based management in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Cancer J.* 2007;13:372-6.
18. Anagrelide Study Group. Anagrelide, a therapy for thrombocythemic states: experience in 577 patients. *Am J Med.* 1992;92:69-76.
19. Navarra, P, Preziosi, P. Hydroxyurea: New Insights on an Old Drug. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;29:249.
20. Stevens, MR. Hydroxyurea: An Overview. *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13:172.
21. Yarboro, JW. Mechanism of Action of Hydroxyurea. *Semin Oncol* 1992;19(3 Suppl 9):1.
22. Pescatore, SL, Lindley, C. Anagrelide: A Novel Agent for the Treatment of Myeloproliferative Disorders. *Expert Opin Pharmacother.* 2000;1:537.
23. Pettit, RM, Silverstein, MN, Petrone, ME. Anagrelide for Control of Thrombocythemia in Polycythemia and Other Myeloproliferative Disorders. *Semin Hematol.* 1997; 34:51.
24. Spencer, CM, Brogden, RN. Anagrelide. A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in the Treatment of Thrombocythaemia. *Drugs* 1994;47:809.
25. Steurer, M, Gastl, G, Jedrzejczak, WW, i sur. Anagrelide for Thrombocytosis in Myeloproliferative Disorders: A Prospective Study to Assess, Efficacy, Adverse Event, Profile. *Cancer,* 2004, 101:2239.
26. Saba R; Jabbour E; Giles F; Cortes J; Talpaz M; O'brien S; Freireich EJ; Garcia-Manero G; Kantarjian H; Verstovsek S. Interferon alpha therapy for patients with essential thrombocythemia. *Cancer.* 2005;103(12):2551-7.
27. Wright CA, Tefferi A. A single institutional experience with 43 pregnancies in essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.* 2001;66:152-9.
28. Martinelli P, Martinelli V, Agangi A, Maruotti GM, Paladini D, Ciancia R, Rotoli B. Interferon alfa treatment for pregnant women affected by essential thrombocythemia: case reports and a review. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:2016-20.
29. Harrison C. Pregnancy and its management in the Philadelphia negative myeloproliferative diseases. *Br J Haematol.* 2005;129:293-306.
30. Watson KV; Key N. Vascular complications of essential thrombocythaemia: a link to cardiovascular risk factors. *Br J Haematol.* 1993;83:198-203.
31. van Genderen PJ, Prins FJ, Michiels JJ, Schror K. Thromboxane-dependent platelet activation in vivo precedes arterial thrombosis in thrombocythaemia: a rationale for the use of low-dose aspirin as an antithrombotic agent. *Br J Haematol.* 1999;104:438-41.
32. Lahuerta-Palacios JJ, Bornstein R, Fernandez-Debora FJ, Gutierrez-Rivas E, Ortiz MC, Larregla S, Calandre L, Montero-Castillo J. Controlled and uncontrolled thrombocytosis. Its clinical role in essential thrombocythemia. *Cancer.* 1988;61:1207-12.

(R)-DA-EPOCH u liječenju bolesnika s agresivnim NHL

Prof. dr. sc. Vlatko Pejša, dr. med.

Odjel za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Dubrava i Medicinski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: vpejsa@kbd.hr

DA (eng. dose adjustment) EPOCH protokol razvili su prof. WH. Wilson i suradnici u National Cancer Institute, Bethesda, SAD. Svoje prve rezultate liječenja tim protokolom objavili su u časopisu Blood (*Dose-adjusted EPOCH chemotherapy for untreated large B-cell lymphomas: a pharmacodynamic approach with high efficacy. Blood. 2002;99(8):2685-2693.*).

Osnovna ideja u razvoju DA-EPOCH protokola bili su rezultati *in vitro* studija koji su pokazali da su tumorske stanice manje otporne na produljenu izloženost niskim koncentracijama citostatika u usporedbi s kratkom eksponencijom visokim koncentracijama. Nadalje, dobro je znano da rituksimab povećava osjetljivost tumorskih stanica na apoptozu uzrokovana kemoterapijom.

To je, dakle, infuzijski protokol sa strategijom dinamičkog prilagođavanja doza koje nadilaze neadekvatnu koncentraciju lijekova. Doze i način aplikacije su kako slijede:

MabThera® 375 mg/m² i.v. dan 1.

Etoposide 50 mg/m² c.i.v. dani 1-4.

Vincristine 0.4 mg/m² c.i.v. dani 1-4.

Doxorubicin 10 mg/m² c.i.v. dani 1-4.

Cyclophosphamide 750 mg/m² i.v. dan 5.

Prednisone 60 mg/m² p.o. dani 1-5.

GM-CSF 5 µg/kg s.c. dan 6.

Prilagođavanje doze lijekova uvedeno je s mjerom da se nađe najveća doza kemoterapije, a uz prihvatljivu toksičnost i temelji se na nalazu KKS-a (točnije apsolutnom broju neutrofila i trombocitima) 2x tjedno između ciklusa.

ANC ≥ 500/µL u svim mjerjenjima: + 20% doze (od prethodnog ciklusa)

ANC < 500/µL u 1 ili 2 mjerjenja: bez promjene doze

ANC < 500/µL u više od 3 mjerjenja: - 20%

Svi detalji o načinu primjene protokola i prilagođavanju doze te svemu ostalom mogu se naći u gore navedenom radu Wilsona i suradnika.

Prve rezultate naših iskustava s ovim protokolom prikazali smo na 4. Kongresu hematologa i transfuziologa u Opatiji 2007., a rezultate s primjenom ovog protokola kod relapsnih limfoma na sastanku Krohema u Đurđevcu, 2009.

Na sastanku Krohema u Vodicama prikazali smo naše dosadašnje rezultate liječenja s DA-EPOCH-om +/- R. Ukupno je uključeno 59 bolesnika čije su karakteristike prikazane u Tablici 1.

Karakteristike bolesnika

n	59
dob (medijan)	58
raspon dobi	17 – 76
spol	m ž
	34 (58 %) 25 (42 %)
Ann Arbor	I, II III, IV
	18 (31 %) 41 (69 %)
LDH	normalan povišen
	24 (40 %) 35 (60 %)
PHD low/high	10/49 (17%/83%)
IPI	1 2 – 4
	16 (27 %) 43 (73 %)

*KBD Hematologija *10

Tablica 1.

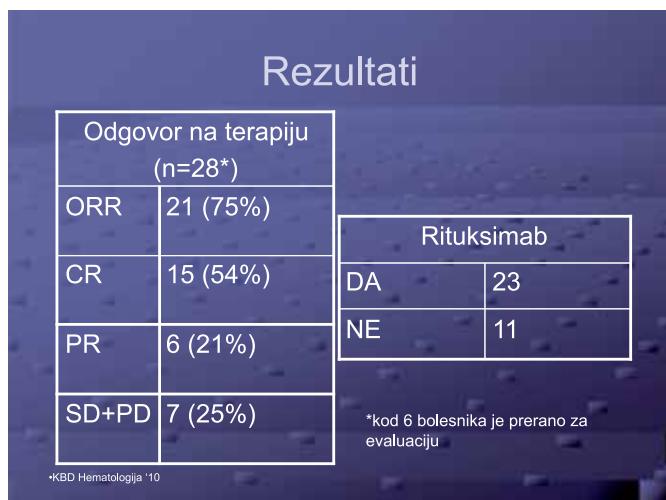
Ukupno preživljenje ove heterogene skupine bolesnika prikazano je na Dijagramu 1.



Dijagram 1.

Rezultati liječenja agresivnih limfoma s DA-EPOCH protokolom u 1. liniji

Ukupno je navedenim protokolom liječeno 28 bolesnika od kojih je 21 bilo pogodno za evaluaciju (Tablica 2.).



Tablica 2.

Ukupno preživljenje ove skupine bolesnika pokazuje Dijagram 2.



Dijagram 2.

Difuzni velikostanični B limfom

Iz gore nevedene skupine bolesnika izdvojili smo one sa DLBCL-om. Karakteristike ovih 16 bolesnika prikazuje Tablica 3.

Karakteristike bolesnika	
n	16
dob (medijan)	48
raspon dobi	17 – 73
spol m	11 (69 %)
ž	5 (31 %)
Ann Arbor I, II	5 (31 %)
III, IV	11 (69 %)
LDH normalan	2 (13 %)
povišen	14 (87 %)
IPI 1	4 (25 %) ($P > 80\%$)
2 – 4	12 (75 %)

+KBD Hematologija '10

Tablica 3.

Važno je spomenuti da su 4 bolesnika s niskim rizikom primili DA-EPOCH-R zbog visokog proliferacijskog indeksa. Od 16 bolesnika kod jednog je bilo prerano za evaluaciju. Ukupni odgovor na terapiju (ORR) bio je 93% uz 9 kompletnih remisija. Ukupno preživljenje (OS) bilo je oko 55% (Dijagram 3.).



Dijagram 3.

Rezultati liječenja bolesnika DA-EPOCH protokolom u 2. liniji

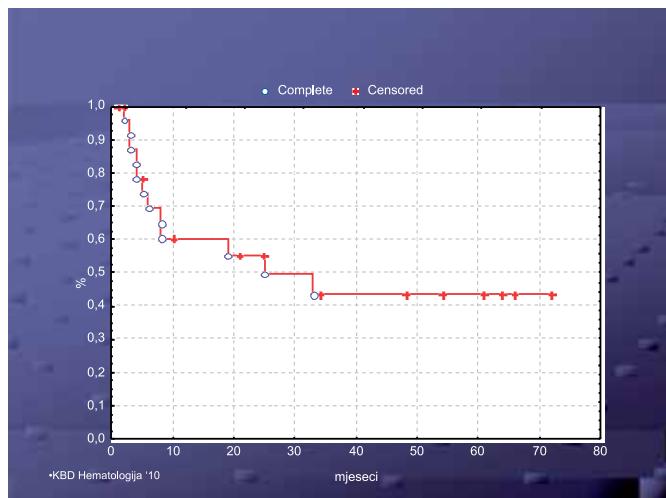
Kao 2. liniju terapije ovaj protokol dobilo je 25 bolesnika čije su karakteristike prikazane u Tablici 4.

Karakteristike bolesnika	
n	25
dob (medijan)	61
raspon dobi	23 – 76
spol m	13 (52 %)
ž	12 (48 %)
Ann Arbor I, II	6 (24 %)
III, IV	19 (76 %)
LDH normalan	11 (44 %)
povišen	14 (56 %)
IPI 1	5 (20 %)
2 – 4	20 (80 %)

+KBD Hematologija '10

Tablica 4.

Od 25 bolesnika 8 je imalo DLBCL, 6 FCC, 5 T limfome, 4 „mantle cell“ te 2 s ostalim dijagnozama. Od 25 bolesnika, 22 su bila pogodna za evaluaciju. Od 22 bolesnika na terapiju je odgovorilo njih 21 (ORR 83%) uz 11 kompletnih remisija (50%). Uku-
pno preživljenje ovih bolesnika prikazano je u Dij-
gramu 4.



Dijagram 4.

DA-EPOCH kao mobilizacijski protokol

DA-EPOCH može se koristiti i kao mobilizacijski protokol uz znatno manju toksičnost od standardnih

protokola. U KB Dubrava od ukupno **16** bolesnika liječenih ovim protokolom koji su bili predviđeni za autoSCT kod njih **10** zadnji ciklus terapije uspješno je iskorišten za mobilizaciju perifernih matičnih stanica (**62,5 %**).

Zaključak

Rezultati liječenja NHL u skupini bolesnika pretežno visokog rizika (IPI, histologija, Ann Arbor) pokazuju odličnu učinkovitost (R)-(DA)-EPOCH protokola. Jednom postignuta remisija je dugotrajna. U skupini bolesnika niskog rizika bilo bi za očekivati još bolje rezultate. Činjenica da se ovaj protokol može koristiti i za mobilizaciju perifernih matičnih stanica (u KB Dubrava kod skoro 2/3 bolesnika s NHL) uz manju toksičnost još je jedna dobrobit ovog protokola u liječenju bolesnika s agresivnim limfomima.

Izvanbolnička primjena DA-EPOCH protokola

Željko Prka, dr. med.

Odjel za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Dubrava

E-pošta: zeljkoprka@yahoo.com

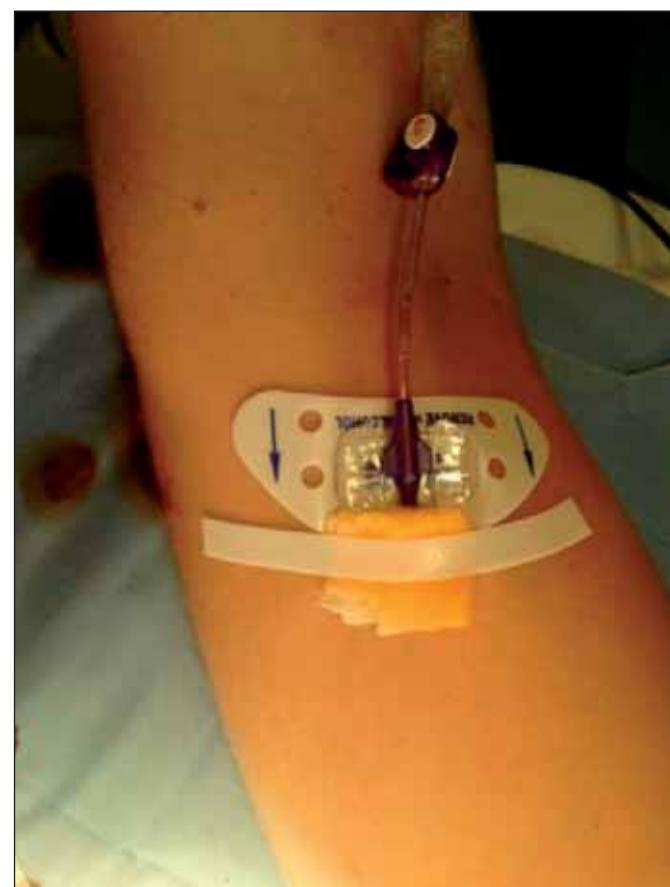
Infuzijski protokol DA-EPOCH +/- R prvi put smo primijenili u KB Dubrava krajem 2004. godine. S obzirom na činjenicu da se primjena navedenog protokola ustalila u našoj bolnici, a imajući na umu i odlične rezultate protokola, prikazane i na sastanku Krohema u Vodicama, htio bih se osvrnuti i na tehničke nedostatke koji se tiču same primjene lijekova.

Osnovni nedostatci primjene ovog protokola liječenja su:

1. venski pristup – u kasnijim ciklusima (4., 5. itd. ciklusi)
2. kontinuirani infuzijski protokol – duga hospitalizacija bolesnika (5 dana)
3. moguća precipitacija lijekova (etopozid) kod viših koncentracija lijeka.

Pitanje venskog pristupa javlja se u većoj ili manjoj mjeri kod primjene svakog protokola posebno u kasnijim ciklusima terapije kada aplikacija kemo-terapeutika i ostale suportivne terapije može postati važan limitirajući čimbenik liječenja bolesnika. Kao rješenje ovog problema, na Odjelu hematologije u KB Dubrava prije godinu i pol dana počeli

smo koristiti središnje venske katetere s perifernom insercijom (PICC-engl. peripherally inserted central catheters) (Slika 1.).



Slika 1.

Karakteristike PICC-a:

- središnji venski kateter koji se uvodi kroz perifernu venu (v.basilica, cubitalis ili cephalica)
- kompresibilne vene-lakše zaustavljanje krvarenja
- uz minimalno, ali redovito održavanje može ostati 3-6 mjeseci
- rješava problem aplikacije kemoterapije, ali i ostalih lijekova, vađenja uzoraka krvi...
- koristi se i za sakupljanje matičnih stanica
- veliki komfor za naše bolesnike, ali i olakšan rad sestrama
- ako se uzme u obzir sav ušteđeni materijal financijski nije prezahtjevno.

S obzirom na gore navedeno, važno je istaknuti da su PICC-ovi, odnosno takav način aplikacije terapije vrlo važan dio u liječenju naših bolesnika, te osnova za mogućnost ambulantne primjene višednevnih protokola.

Kao drugi dio rješenja venskog pristupa istaknuo bih i vaskularni ultrazvuk (engl. vascular access ultrasound, Slika 2.) pomoću kojeg je uvelike olakšano postavljanje PICC katetera te odabir najpogodnije veze za terapiju.



Slika 2.

Vaskularni UZV dakle:

- omogućuje postavljanje katetera u dublje položene vene
- koristan i kod postavljanja ostalih CVK (subclavia, femoralis)
- u nedostatku istoga PICC se plasira u kubitalnu venu.

Jedan od osnovnih prigovora u korištenju DA-EPOCH protokola je i duljina trajanja protokola (4 dana kontinuirane infuzije te 5. dan CTX) koja zahtijeva dugu hospitalizaciju bolesnika te time i veće troškove. No, korištenjem PICC-katetera i (ne nužno) UZV-a stvorena je osnova za aplikaciju navedenog protokola na ambulantnoj bazi (Dnevna bolnica). Naime, pristup krvnim žilama preduvjet je za korištenje malih, prijenosnih infuzijskih pumpi (Slika 3.) kojima se terapija može davati i u kućnim uvjetima uz uvjet da bolesnik svaki dan dolazi u Dnevnu bolnicu na zamjenu vrećice s lijekom.



Slika 3.

Karakteristike infuzijskih pumpi:

- pumpe s litijskom baterijom u trajanju od 24 h
- ne troše se dok je uređaj spojen na izvor struje (npr dok bolesnik spava, gleda TV...)
- po isključivanju iz struje baterija se automatski uključuje
- omogućuju aplikaciju terapije na izvanbolničkoj bazi
- bolesnik svaki dan dolazi u DB na zamjenu vrećice s terapijom.

Što se tiče spomenute precipitacije lijekova kao nedostatka protokola radi se ustvari o manjem, „kozmetskom“ nedostatku. Naime, kod viših koncentracija etopozida zapažena je veća učestalost precipitacije infuzijske mješavine (Eto, VCR, Doxo). U tim slučajevima potrebno je lijek pripremiti u vrećici od 1000 ml fiziološke otopine. Kod nas u KB Dubrava “cut-off” je na 140 mg etopozida.

Daljnji potencijalni nedostatci protokola su:

- edukacija bolesnika oko primjene infuzijske pumpe – pumpe su relativno jednostavne za korištenje, ali naravno, nije realno je očekivati suradljivost kod svih bolesnika. S obzirom da su infuzijske pumpe u naš centar pristigle mjesec dana prije sastanka Krohema u Vodicama, još nemamo iskustva u primjeni pumpi u kućnim uvjetima. Isprobali smo aplikaciju lijeka putem ovih pumpi u bolničkim uvjetima što je prošlo bez problema. Prve rezultate u ambulantnoj primjeni EPOCH protokola nadamo se

prikazati na našim skorašnjim sastancima.

- Komplikacije vezane uz katetere - infekcije, tromboze. Incidencija ovih komplikacija je manja od uobičajenih središnjih venskih katetera, osim kod nestručnog rukovanja.
- Cijena (pumpe – 20.000, vaskularni UZV – oko 60.000 kn, PICC set 1200 kn) - iako je jasno da su cijene visoke, važno je istaknuti da se kod upotrebe PICC katetera štedi na ostalom bolničkom materijalu (gaze, igle...), UZV nije neophodan (moguće postavljanje katetera u kubitalnu venu), a pumpe, jednom kupljene, imaju dugi vijek trajanja.

Primarni limfomi središnjeg živčanog sustava

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

Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Rijeka i Medicinski fakultet

Sveučilišta u Rijeci

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

Definicija: Primarni limfomi središnjeg živčanog sustava (PLSŽS) oblik su ekstranodalnih non-Hodgkinovih limfoma (NHL) lokalizirani u središnjem živčanom sustavu (SŽS). Najčešće nastaju u mozgu, zatim u moždanim ovojnicama, leđnoj moždini ili očima (1).

Epidemiologija: Najčešći su u šestom i sedmom desetljeću života, te su nešto češći u muškaraca. Čine 2,7-5% svih primarnih tumora mozga i oko 1% svih NHL-a. Neke studije sugeriraju povećanje incidencije PLSŽS-a, ali nije jasno li je to zbog sve boljih dijagnostičkih mogućnosti ili se stvarno radi o povećanoj incidenciji (1,2).

Etiologija i patogeneza: Etiologija bolesti je nepoznata. I u ovoj bolesti virusi imaju značajnu ulogu: EBV, JCV ko-faktor (onkogeni polioma virus), HHV6, HHV8, SV40 i drugi. Virus humane imunodeficijencije (HIV) povećava vjerojatnost za razvoj PLSŽS-a (2). U središnjem živčanom sustavu normalno su prisutni uglavnom CD4+ T-limfociti uz vrlo malo B limfocita, dok čak do 90% PLSŽS-a čine agresivni difuzni B-velikostanični limfomi. Ostalih 10% limfoma otpada na B-limfome niskog stupnja malignosti i T-stanične limfome. Većina PLSŽS-a pripada skupini limfoma nastalih iz aktiviranih B-

limfocita, što može biti jedan od razloga njihove lošije prognoze u odnosu na sistemski NHL (3).

Lokalizacija tumora: Najčešća lokalizacija je parenhim mozga (>90%), u 75% slučajeva prezentira se kao solitarna lezija često smještena supratentorialno i periventrikularno. Sljedeća lokalizacija su moždane ovojnice, obično popraćena i zahvaćenošću parenhima mozga. Oko je zahvaćeno u približno 10% slučajeva, dok je lokalizacija u leđnoj moždini rijetka (<1%) (1).

Dijagnoza: Anamnestički podaci potvrđuju fokalne neurološke deficite (hemipareza, afazija) u >50% bolesnika, alterirani mentalni status (gubitak pamćenja, konfuznost) u oko 33%. Glavobolja i mučnina prisutne su u 33% slučajeva. Poremećaji vida susreću se kad je u pitanju limfom oka (1,5).

Slikovne pretrage: bolesnici sa sumnjom na tumor mozga podvrgavaju se magnetskoj rezonanciji (MR) s primjenom gadolinijskog kontrasta. U slučaju da MR nije moguće učiniti, indicirana je kompjutorizirana tomografija (CT) mozga s primjenom kontrasta. Ako se radiološki postavi sumnja na PLSŽS, pristupa se stereotaksijskoj biopsiji s ciljem postavljanja histološke dijagnoze. Nakon što se postavi dijagnoza limfoma u središnjem živčanom sustavu, pristupa se daljnjoj obradi koja uključuje serologiju na HIV te pretrage kojima je cilj procijeniti proširenost bolesti i isključiti postojanje sistemskog limfoma (1,4).

Liječenje novo dijagnosticiranih bolesnika s PLSŽS

PLSŽS su radiosenzitivni i kemosenzitivni infiltrativni tumori, stoga je operativni zahvat rezer-

viran samo za dijagnostičku biopsiju. Kirurško odstranjenje tumora ne povećava preživljjenje. Liječenjem PLSŽS-a **samo zračenjem** postiže se dobar, ali privremen odgovor (medijan ukupnog preživljjenja 10-18 mjeseci, 5-godišnje preživljjenje <5%) (5). Većina relapsa nastaje na mjestima na kojima je primijenjena maksimalna doza zračenja (5,6).

Navedeni skromni rezultati liječenja ovih tumora samo zračenjem rezultirali su uvođenjem **terapije temeljene na visokim dozama metotreksata +/- radioterapija** (7,8). Metotreksat (MTX) ima mogućnost prodora kroz krvno-moždanu barijeru i postizanja citotoksičnih koncentracija unutar središnjeg živčanog sustava. Počevši od 1990. godine na ovome brojne studije faze II potvrđuju da kombinacija visokih doza MTX-a sa zračenjem rezultira dužim preživljjenjem u odnosu na samo zračenje (medijan preživljjenja 2-4 godine; 5-godišnje preživljjenje 20-40%). Nadalje, primjena standardne kemoterapije (CHOP) uz radioterapiju nije rezultirala boljim preživljjenjem što se tumači lošim prodorom tih kemoterapeutika u SŽS. Do sada nije prospektivno ispitivana optimalna doza zračenja, ali najčešće primjenjivana doza iznosi 40-45 Gy (5,6). I dalje ostaje otvoreno pitanje hoće li kod bolesnika koji su postigli kompletan odgovor na terapiju visokim dozama MTX-a konsolidacija zračenjem dati bolje preživljjenje. Nedavno je objavljena retrospektivna studija s najdužim praćenjem, u kojoj je 57 bolesnika različite dobi liječeno visokim dozama metotreksata sa zračenjem ili bez njega (7). Medijan praćenja preživjelih bio je 115 mjeseci, nakon čega je ukupno 30% bolesnika živo. Preživljjenje u ljudi mlađih od 60 godina bilo je 74%, a medijan preživljjenja u starijih bolesnika iznosio je 29 mjeseci, bez obzira na to jesu li bili zračeni ili ne. Relaps se pojavio u 44% bolesnika, najčešće u prve dvije godine. Slične rezultate imali su i drugi autori (8).

Više je studija istraživalo efikasnost različitih „**visokih doza**“ **MTX-a** te modalitete njegove aplikacije u terapiji novodijagnosticiranih bolesnika. Neuvelt i suradnici pokušavaju intraarterijalno aplikirati MTX (2,5 g) i tako postići bolji prodor kroz krvno-moždanu barijeru. Rezultati u 81% bolesnika potvrđuju kompletan odgovor, no uz komplikiranu proceduru same aplikacije MTX-a (9). Rezultati Bonn protokola potvrđuju da visoke doze MTX-a (5 g/m²) u kombinaciji s vinkristinom, ifosfamidom, ciklofosfamidom i citarabinom plus intraventrikularna terapija daju 71% odgovora (61% kompletan odgovor + 10% parcijalni odgovor) uz medijan ukupnog preživljjenja od 50 mjeseci. Protokol je potvr-

dio i visoku akutnu toksičnost i odgođenu neurotoksičnost (10). Omuro i suradnici potvrđuju 90% odgovor na liječenje (38% parcijalni i 52% kompletan odgovor) uz medijan preživljjenja >54 mjeseca kod primjene visokih doza MTX-a (3 g/m²) u kombinaciji s i.v. kemoterapijom +/- intratekalna aplikacija (11). Dakle, kemoterapija sama uz odgodu zračenja (kod bolesnika s kompletanim odgovorom) potvrđuje kraće preživljjenje bez progresije, dok su medijani preživljjenja usporedivi s rezultatima kombinirane kemoterapije plus zračenje, ali uz bolju neurokogniciju i bolju kvalitetu života. Rezultati studija su potvrđili da je MTX ključni lijek u terapiji PLSŽS-a, no i dalje ostaje otvoreno pitanje treba li uz visoke doze MTX-a dodati još koji citostatik i te koji bi to trebao biti. U NOA-3 kliničkom ispitivanju primijenjen je samo MTX u dozi od 8 mg/m², a rezultati su potvrđili niski medijan preživljjenja bez progresije (10 mjeseci) uz visoku neurotoksičnost (20%) (12). Khan i suradnici primjenjuju visoke doze MTX-a i predlažu primjenu intratekalne kemoterapije u slučajevima pozitivne citologije cerebrospinalnog likvora (13). Uloga intratekalne profilakse u PLSŽS zahtjeva daljnja prospektivna ispitivanja. Rezultati randomiziranog kliničkog ispitivanja faze II (Ferreri i suradnici) potvrđuju da je terapija visokim dozama MTX-a (3,5 g/m² primijenjen 1. dan) u kombinaciji s visokim dozama citarabina (2 g/m² primijenjen dva puta dnevno 2. i 3. dana) superiornija u odnosu na terapiju samo visokim dozama MTX-a (14). Primjenjena su ukupno četiri ciklusa terapije. Jedna skupina bolesnika je nakon kemoterapije nastavila liječenje zračenjem. Medijan dobi bolesnika uključenih u ovu studiju bio je 60 godina (raspon 17 do 75 godina). Autori zaključuju da je u bolesnika s PLSŽS koji imaju 75 godina i manje terapija izbora **terapija s visokim dozama MTX-a uz dodatak visokih doza citarabina** jer omogućuje bolji ishod liječenja uz prihvatljivu toksičnost u usporedbi s liječenjem samo visokim dozama MTX-a (6).

U novije vrijeme, u bolesnika mlađih od 60 ili 65 godina, visokim dozama metotreksata pridaje se **intenzivna kemoterapija uključujući autolognu transplantaciju koštane srži** uz adjuvantno zračenje. Postižu se odlični rezultati, s očekivanim petogodišnjim preživljjenjem većim od 60% i prihvatljivom toksičnosti, no praćenje je još uvijek kratko. S druge strane, dodatni je problem neurotoksičnosti značajan i u mlađoj populaciji, sniženje doze ili odustajanje od zračenja nakon kemoterapije povećava vjerojatnost za relaps (15,16). Stoga je, trenutno,

kombinacija kemoterapije i radioterapije još uvijek standard u liječenju mlađih bolesnika, iako postoje studije s dobrim rezultatima i bez zračenja.

Terapija u starijih bolesnika: Kod starijih bolesnika (>60 godina) koji čine više od polovice bolesnika s PLSŽS preporuča se liječenje samo kemoterapijom bez zračenja zbog problema neurotoksičnosti. Neurontoksičnost dodatno sužava terapijske opcije u starijih bolesnika. Zbog svega toga prijeko su potrebni novi, učinkoviti i manje toksični lijekovi.

Imunoterapija sa **monoklonskim anti-CD20 protutijelom** primijenjena je i u bolesnika s PLSŽS (17). S obzirom na to da koncentracija u likvoru prilikom intravenske aplikacije rituksimaba iznosi manje od 1% u odnosu na odgovarajuću koncentraciju u serumu, pokušana je intratekalna odnosno intraventrikularna aplikacija u bolesnika s leptomeningealnom lokalizacijom. Autori potvrđuju privremeno dobre rezultate na provedeno liječenje, no dodavanje rituksimaba kemoterapiji i dalje ostaje spekulativno (17). Iwamoto i suradnici u kliničkoj studiji primjenjuju ibritumomab tiuksetan kao selektivnu **radioimunoterapiju za CD20** kod bolesnika s refrakternom bolešću ili relapsom (18).

Temozolomid je noviji citostatik iz skupine alkilirajućih agensa, karakteriziran dobrim prodom u SŽS, blagom nefrotoksičnosti i mijelotoksičnosti, što ga čini optimalnim za terapiju PLSŽS-a. Kombinirana sistemska primjena temozolomida i rituksimaba u predhodno liječenih starijih bolesnika može dovesti do kompletног, ali samo privremenog odgovora (17).

Zaključno, visoke doze metotreksata plus visoke doze citarabina (ili samo visoke doze metotreksata) u današnje su vrijeme temelj terapije PLSŽS-a (bolesnici s ≤ 75 godina), uz zračenje kao konsolicaciju kod mlađih bolesnika (14). Kod starijih su bolesnika terapijske mogućnosti manje, a prognoza nepovoljna (19).

Literatura

1. Del Rio MS, Rousseau A, Soussain C, i sur. Primary CNS lymphoma in immunocompetent patients. The Oncologist. 2009;14:526-539.
2. Coté TR, Manns A, Hardy CR, i sur. Epidemiology of brain lymphoma among people with or without acquired immunodeficiency syndrome. AIDS/Cancer Study Group. J Natl Cancer Inst. 1996; 88(10):675-9.
3. Camilleri-Broët S, Crinière E, Broët P. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. Blood. 2006;107(1):190-6.
4. Mitrović Z, Radman I, Aurer I, i sur. Primarni limfomi središnjeg živčanog sustava- prikaz vlastitih rezultata. Liječ Vjesn. 2007;129:391-395.
5. Cabanillas F. How important is whole brain radiotherapy for treatment of primary CNS lymphoma? Lancet Oncol. 2010;11:1011-1012.
6. Ferreri AJ, De Angelis C, Illerhaus G, i sur. Whole-brain radiotherapy in primary CNS lymphoma. The Lancet Oncology. 2011;12(2):118-119.
7. Gavrilovic IT, Hormigo A, Yahalom J. Long-Term Follow-Up of High-Dose Methotrexate-Based Therapy With and Without Whole Brain Irradiation for Newly Diagnosed Primary CNS Lymphoma. J Clin Oncology. 2006;24(28):4570-4574.
8. Thiel E, Korfel A, Martus P, i sur. High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. Lancet Oncol. 2010;11:1036-1047.
9. Neuvelt EA, Goldman DL, Dahlborg SA, i sur. Primary CNS lymphoma treated with osmotic blood-brain barrier disruption: Prolonged survival and preservation of cognitive function. J Clin Oncol. 1991;9:1580-1590.
10. Pels H, Schmidt-Wolf IG, Glasmacher A, i sur. Primary central nervous system lymphoma: Results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy. J Clin Oncol. 2003;21:4489-4495.
11. Omuro AM, Taillandier L, Chinot O, i sur. Methotrexate (MTX), procarbazine and CCNU for primary central nervous system lymphoma (PCNSL) in patients younger than 60: Can radiotherapy (RT) be deferred? J Clin Oncol. 2006;24(18 suppl.):Abstract 1551.
12. Herrlinger U, Küker W, Uhl M, i sur. NOA-03 trial of high-dose methotrexate in primary central nervous system lymphoma: Final report. Ann Neurol. 2005;57:843-847.
13. Khan RB, Shi W, Thaler HT, i sur.. Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma? J Neurooncol. 2002;58:175-178.
14. Ferreri AJ, Foppoli M, Martelli M, i sur. High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. Lancet. 2009;374(9700):1512-20.
15. Kasenda B, Schorb E, Fritsch K, Hader C, i sur. Primary CNS lymphoma-radiation-free salvage therapy by second autologous stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17(2):281-3.
16. Colombat P, Lemevel A, Bertrand P, i sur. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation as first-line therapy for primary CNS lymphoma in patients younger than 60 years: a multicenter phase II study of the GOELAMS group. Bone Marrow Transplant. 2006;38:417-20.
17. Wong ET, Tishler R, Barron L, Wu JK. Immunochemotherapy with rituximab and temozolomide for central nervous system lymphomas. Cancer. 2004;101:139-145.
18. Yamamoto FM, Schwartz J, Pandit-Taskar N, i sur. Study of radiolabeled indium-111 and yttrium-90 ibritumomab tiuxetan in primary central nervous system lymphoma. Cancer. 2007;110:2528-2534.
19. Carrabba MG, Reni M, Foppoli M, i sur. Treatment approaches for primary CNS lymphomas. Expert Opin Pharmacother. 2010;11(8):1263-76.

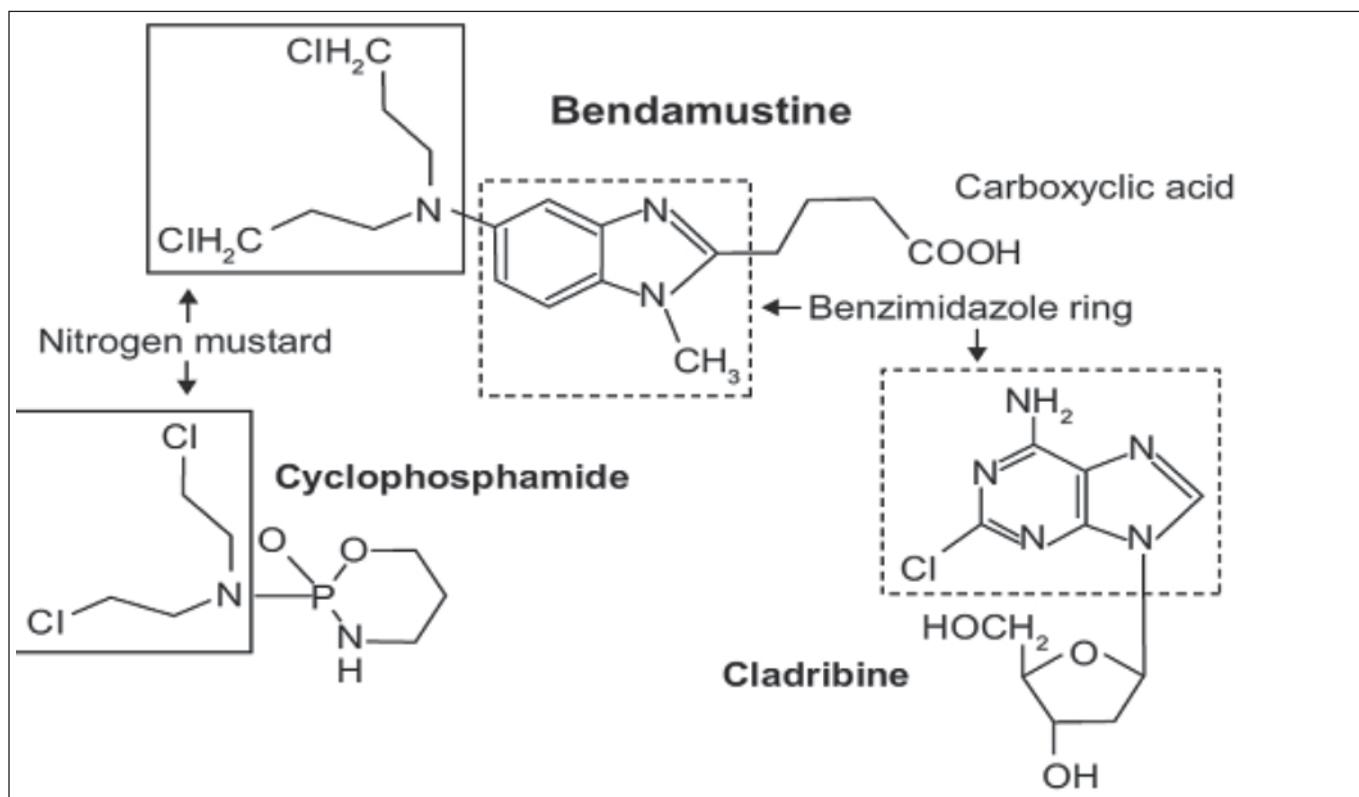
Bendamustin - stari/novi lijek za liječenje limfoproliferativnih bolesti

Sandra Bašić-Kinda, dr. med.
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
KBC Zagreb
E-pošta: sandra.kind@seznam.hr

Bendamustin je alkilirajući agens, mekloretaminski derivat, sa strukturom sličnom klorambucilu i drugim alkilirajućim agensima. Posjeduje i benimidazolski prsten koji djeluje kao antagonist purinima i aminokiselinama (Slika 1.).

uzvojnica DNA, ali je njegov učinak jači i dugotrajniji (1).

U početku se koristio za liječenje raznih vrsta tumora s različitim odgovorom na terapiju. Kod tumora glave i vrata, gdje se koristio u kombinaciji s radioterapijom, postignuto je 62% parcijalnih remisija, kod mikrocelularnog karcinoma pluća u kombinaciji s cisplatinom odgovor je postignut u 88% bolesnika, dok se za liječenja kolangiokarcinoma pokazao neučinkovitim. Testiran je također u



Slika 1.

Sintetiziran je ranih 1960-ih u Jeni, u tadašnjoj istočnoj Njemačkoj Demokratskoj Republici. Više od 30 godina u toj je zemlji korišten za liječenje NHL-a, KLL-a, MM-a i karcinoma dojke, a ujedinjenjem Njemačke lijek je odobren u cijeloj Njemačkoj za iste indikacije. To je potaklo započinjanje novih studija kako bi se bolje definirala njegova uloga u liječenju navedenih bolesti. Lijek se dobro resorbiра iz probavnog trakta, ima dobru bioraspoloživost nakon peroralne primjene, ali je testiran gotovo isključivo kao intravenski pripravak. Metabolizira se uz pomoć citokroma P450 1A2 u aktivne metabolite delta-hidroksi-bendamustin i N dezmetil-bendamustin, a čini se da klinička aktivnost ovisi primarno o hidroksi-bendamustingu. Bendamustin kao i drugi alkilirajući agensi uzrokuje razaranje dvostrukih

karcinomu dojke i metastatskom karcinomu dojke s različitim rezultatima (28-45% PR).

Kod hematoloških tumora prvi pozitivni rezultati postignuti su u liječenju multiplog mijeloma gdje je u kombinaciji s talidomidom i prednizonom ukupni odgovor na terapiju bio 86%. U liječenju non-Hodgkinovog limfoma i kronične limfatične leukeemije isproban je kao monoterapija i u kombinaciji s drugim lijekovima (fludarabinom, mitoksantronom, vinkristinom, rituksimabom, kortikosteroidima...) uz odgovor na terapiju od 60-80%.

Bendamustin u indolentnih NHL

Indolentni non-Hodkinovi limfomi čine 30-40% svih NHL. Nakon odličnog inicijalnog odgovora na različite lijekove većina pacijenata razvije relaps bolesti, odgovor na svaku sljedeću terapiju je slabiji a trajanje remisije sve kraće, zbog čega se stalno na-meće potreba za novim učinkovitim lijekovima.

Prve studije s bendamustinom provedene su kod indolentnih NHL u relapsu ili refraktornih na standardnu terapiju. Studije faze II monoterapije bendamustinom pokazuju različite rezultate vjerojatno zbog različitih skupina pacijenata koji su uključeni u studije. Ukupni odgovor na terapiju varirao je od 73-100%, postotak kompletnih remisija od 11-34%, parcijalnih remisija od 43-62%, a srednje trajanje odgovora od 6,7-39 mjeseci. Većina ovih studija provedena je u Njemačkoj sredinom 90-tih, no i u Americi su provedene studije na istoj skupini bolesnika koje su također pokazale da je lijek učinkovit, a jedina značajna toksičnost je srednje teška mijelosupresija. Hematološka toksičnost gradus 3 i 4 varira od studije do studije od 13-55% pacijenata, a nehematološka toksičnost gradus 3 i 4 javlja se u manje od 10% pacijenata. Razlike u hematološkoj toksičnosti mogu se možda objasniti prethodnim terapijama koje su pacijenti primali, tako da je veća toksičnost kod pacijenata koji su ranije tretirani fludarabinom. U Tablici 1. prikazano je nekoliko studija provedenih u Europi kod ove skupine bolesnika. Studija nakon koje je bendamustin odobren od američkog FDA-a za liječenje relapsa i refraktornog indolentnog NHL-a provedena je od Kahla i suradnika na 100 pacijenata. Bendamustin je apliciran i.v. u dozi od 120 mg/m² 1. i 2. dan svaka 3 tjedna, 6-8 ciklusa. Odgovor na terapiju bio je od 71-100% ovisno o histologiji: KR

postiglo je 20% FL, 5% SLL, 11% nodalnih MZL i 43% ekstranodalnih MZL. Nakon što je dokazana njegova učinkovitost kao monoterapije, započete su studije u kombinaciji s različitim lijekovima. Kao i kod drugih lijekova, zbog male toksičnosti a velike učinkovitosti, najzanimljivijim se pokazao rituksimab. U Tablici 2. prikazane su studije u kojima je bendamustin kombiniran s rituksimabom i s drugim lijekovima, te je vidljivo da kombinacija s drugim lijekovima nije povećala učinkovitost u odnosu na kombinaciju BR. Ukupni odgovor na terapiju u kombinaciji s rituksimabom u različitim studijama varira od 60-90%, uz 40-60% kompletnih remisija, a u kombinaciji s drugim lijekovima (fludarabin, mitoksantron, vinkristin) od 66-96% uz značajno veći broj gradus 3 i 4 hematološke toksičnosti i veći broj febrilnih neutropenija (2).

Nakon dokazane učinkovitosti kod relapsne ili refraktorne bolesti, provedene su kliničke studije kod novodijagnosticiranih pacijenata s indolentnim NHL. U studiji koju se proveli Rumel i suradnici 513 pacijenata randomizirano je na R-CHOP ili RB. Bendamustin je apliciran u dozi od 90 mg/m², 1. i 2. dan svakih 28 dana uz rituksimab u standardnoj dozi. Vrijeme do progresije (PFS) bilo je 34,8 mjeseci kod bolesnika liječenih s R-CHOP, a 54,9 mjeseci kod bolesnika liječenih s BR. Nije bilo razlike u ukupnom odgovoru ni u broju kompletnih remisija, kao ni u ukupnom preživljjenju. Zahvaljujući ovim rezultatima bendamustin se sve češće koristi kod bolesnika u prvoj liniji liječenja indolentnog limfoma kod kojih nije moguće provesti terapiju antraciklinima. Provedene su i provode se studije u prvoj liniji liječenja pacijenata s agresivnim limfomom.

Tablica 1.

Author	Dose (mg/m ²)	Schedule of drug delivery	Number of patients	% OR	% CR	Remission duration (median, months)
Heider and Niederle ¹³	120	Days 1,2 Q three weeks	52	73	11	16
Bremer ⁷	60	Days 1-5 Q four weeks	62	82	15	39
Weidmann ¹⁷	120	Days 1,2 Q three weeks	18	44	17	NR
Friedberg ²⁴	120	Days 1,2 Q three weeks	74	77	34	6.7
Kahl ²⁷	120	Days 1,2 Q three weeks	100	76	33	9.2

Tablica 2.

Authors	Other agents used in trials	Number of patients	% OR	% CR	Duration of response (median, months)
Rummel ^{31,32}	Rituximab	166	90	60	PFS 30 months
Lakner ³³	Rituximab	46	85	43	PFS 12 months
Mohren ³⁴	Rituximab	10	70	40	NR
Robinson ³⁷	Rituximab	66	92	54	21
Koenigsman ³⁸	Fludarabine	29	77	45	14
Weide ⁴²	Mitoxantrone, rituximab	55	89	35	PFS 19 months
Matous ⁴⁷	Bortezomib, rituximab	16	80	53	NR

Bendamustin kod KLL

U liječenju kronične limfocitne leukemije bendamustin je također prvo testiran kod bolesnika s relapsom kronične limfocitne leukemije, a korištene su različite doze i sheme primjene lijeka te je i toksičnost varirala od studije do studije. U Tablici 3. prikazano je nekoliko studija monoterapije bendamustinom u pacijenata s relapsom ili refraktornih na terapiju. Nakon studije provedene kod bolesnika u prvom relapsu KLL gdje su bolesnici randomizirani na fludarabin ili bendamustin potvrđeno je da bendamustin može biti alternativa fludarabinu (ORR 79% kod bendamustina i 65% kod fludarabina, PFS 83 tjedna/63 tjedna). Knauf i suradnici 2001. godine proveli su studiju kod neliječenih bolesnika s KLL. 319 bolesnika randomizirano je ili na bendamustin ili na klorambucil. Doza bendamustina bila je 100 mg/m² 1. i 2. dan, a klorambucila 0,8mg/kg 1. i 15. dan. Kod bolesnika liječenih bendamustinom postignuto je 31% kompletnih i 37% parcijalnih remisija, a kod pacijenata liječenih klorambucilom 2% kompletnih i 29% parcijalnih remisija. PFS nakon 29,2

mjeseca praćenja bio je 21,5 mjesec kod bolesnika liječenih bendamustinom i 8,3 mjeseca kod onih liječenih klorambucilom. Najčešća nuspojava je hematološka toksičnost, više kod bendamustina (27% neutropenijska, 25% trombocitopenija, te anemija u 22% pacijenata). Neutropenijski gradus 3 ili 4 opisana je u 37 bolesnika (23%), a infekcije gradus 3 ili 4 dogodile su se u 8% bolesnika. Mučnina, povraćanje i proljev bili su također češći nego kod bolesnika na klorambucilu. Na osnovu ove studije FDA je одobrila bendamustin za liječenje KLL-a. Bendamustin je također kombiniran s drugim lijekovima za liječenje relapsa ili refraktorne KLL prvenstveno s mitoksantronom i/ili rituksimabom. Studije s mitoksantronom provedene su na malom broju pacijenata, stoga se ova kombinacija ne proporučuje izvan kliničkih studija, a studija s rituksimabom pokazuje ohrabrujuće rezultate, no potrebna su daljnja istraživanja da bi se bolje utvrdila dijelotvornost ove kombinacije (3).

Tablica 3.

Author	Phase	Regimen	Number of patients	ORR (CR), %	Median time to event (months)
Kath 2001 ²²	II	<70 yrs: 60 mg/m ² >70 yrs: 50 mg/m ² d 1-5, q 28 d	23; 13 previously untreated	65 (26)	NR
Aivado 2002 ²⁰	II	100 mg/m ² , d 1-2, q 28 d	23 relapsed/refractory	67 (29)	TTP 6 (4-19)
Bremer 2002 ²¹	II	60 mg/m ² , d 1-5, q 28 d	15 relapsed/refractory	93 (7)	Not reached
Bergmann 2005 ²³	I/II	70 mg/m ² , d 1-2, q 28 d	16 relapsed/refractory	56 (13)	NR
Lissitchkov 2006 ²⁴	I/II	100 mg/m ² , d 1-2, q 28 d	15 relapsed/refractory	60 (27)	NR
Knauf 2008 ²⁵	III	B: 100 mg/m ² d 1-2, q 28 d C: 0.8 mg/kg d 1, 15, q 28 d	319 previously untreated	B: 67 (NR) C: 30 (NR)	PFS (B vs C): 21.5 vs 8.3
Niederle 2008 ²⁵	II	B: 100 mg/m ² , d 1-2, q 28 d F: 25 mg/m ² , d 1-5, q 28 d	96 relapsed	B: 78 (29) F: 65 (10)	PFS (B vs F): 83 vs 64 weeks

Studije nedavno provedene u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama potvrđuju učinkovitost i netoksičnost bendamustina kao monoterapije ili u kombinaciji s drugim lijekovima za liječenje NHL i KLL. Lijek je odobren za liječenje KLL i rituksimab-refraktornih NHL u SAD, te za liječenje KLL, NHL i MM u Njemačkoj.

Bendamustin se vrlo dobro podnosi te bi mogao biti dobra opcija za liječenje bolesnika s KLL i NHL, posebice starijih bolesnika, s komorbiditetima, koji nisu pogodni za druge vrste terapije (alemtuzumab, radioimunoterapiju). U studiji provedenoj s bendamustinom i klorambucilom, bendamustin se pokazao učinkovitijim, a dodatak rituksimaba sigurno će još povećati učinkovitost. S obzirom na rezultate u studiji R-B vrs. R-CHOP bendamustin se čini kao dobra opcija za liječenje bolesnika s indolentnim limfomom i lošom kardijalnom funkcijom. Bendamustin bi također mogao imati učinka i u agresivnih limfoma, naročito kod limfoma plaštene zone, gdje se pokazao učinkovit u liječenju relapsa ili refraktorne bolesti (RR 92%, KR 59%, trajanje odgovora je 19 mjeseci). U tijeku su brojne studije kojima se nastoji utvrditi efikasnost i sigurnost primjene ovog lijeka:

- KLL
 - B+R vrs FC-R
 - B+R+R
- NHL
 - DLBCL
 - koji se ne mogu liječiti R-CHOP-om - R+B
 - Limfom plaštene zone
 - BERT
 - Folikularni limfomi limfoplazmocitoidni limfom
 - Bortezomib +B+R

Iako se lijek već dugo koristi, optimalne doze i sheme primjene lijeka još uvijek nisu definirane.

Preporučene sheme doziranja kod KLL:

Prva linija monoterapija: B 100 mg/m² d 1+2 / 28

Prva linija kombinacija s rituksimabom:

	1. ciklus	2.-6. ciklus
B 90 mg/m ²	d 1+2	d 1+2
R 375 mg/m ²	d 0	-
R 500 mg/m ²	-	d 1

Liječenje relapsa - monoterapija:

neličečni F-om **liječečni F-om**

B 100 mg/m² d 1+2 / 28 B 70 mg/m² d 1+2 / 28

Liječenje indolentnog limfoma prva linija i relaps u kombinaciji s rituksimabom:

	1. ciklus	2-6. ciklus
B 90 mg/m ²	d 1+2	d 1+2
R 375 mg/m ²	d 0	d 1

Liječenje relapsa indolentnog limfoma:

B 120 mg/m² d 1+2 / 28

Zaključak:

Bendamustin je „novi“ lijek efikasan u liječenju bolesnika s limfoproliferativnim bolestima. Registriran je za liječenje indolentnog limfoma i KLL u EU, dok u Hrvatskoj nije registriran. Daljnji razvoj toga lijeka mogao bi poboljšati ishod liječenja kod bolesnika s limfomom i kroničnom limfatičnom leukemijom.

Literatura:

1. Trevor W. Dennie, i sur. Clinical Therapeutic. 2009;31: 2290-2309.
2. Fredrick H, i sur. OncoTargets and Therapy. 2009;2:269–279.
3. Jamshed S, i sur. OncoTargets and Therapy. 2009;2:43–49.

Von Willebrandova bolest

Prof. dr. sc. Srđana Čulić, prim. dr. med.

Klinika za dječje bolesti

KBC Split

Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

E-pošta: srdjana.culic@st.htnet.hr

Von Willebrandova bolest (engl. *von Willebrand Disease* - vWD) nastaje zbog nedostatka, smanjenih vrijednosti ili disfunkcije von Willebrandova čimbenika (engl. *von Willebrandov Factor* - vWF) koagulacije, što uzrokuje smanjenje sposobnosti zgrušavanja krvi u bolesnika. Hemostaza se odvija u dvije faze:

1. Primarna hemostaza (adhezija trombocita, vWF, trombociti i fibrinogen)
2. Sekundarna hemostaza (kaskada čimbenika koagulacije, stabilizacija ugruška pomoću fibrina).

VWF omogućava adheziju i agregaciju trombocita na mjestu povrede i nosilac je i stabilizator F VIII:C u cirkulaciji.

VWF nastaje u endotelnim stanicama i u megakariocitima. Onaj koji nastaje u endotelnim stanicama cirkulira u plazmi, dok je drugi smješten u alfa granulama trombocita (1).

Ova bolest prvi put je otkrivena u djevojčice od 5 godina s Ålandske otoka 1924. g. kada je ovedena je u bolnicu Deaconess u Helsinkiju u Finskoj (Slika 1.). Pregledao ju je finski internist dr. Erik von Willebrand, koji je prvi opisao vWD. On je obradio 66 članova ove obitelji i otkrio da su oba roditelja i brojni rođaci imali česta blaža krvarenja, te da su tri sestre umrle prije 4. godine života od teških krvarenja. Potvrđio je da je težina krvarenja varirala između članova obitelji od blage do teške kliničke slike. Tipična su bila krvarenja iz usta, nosa, genitalnog, mokraćnog i probavnog sustava. Neke žene u obitelji su imale teška menstrualna krvarenja.

Godine 1926. objavio je da je riječ o predhodno neopisanoj bolesti različitoj od hemofilije koja zahvaća muškarce i žene, a karakterizira je krvarenje u sluznice, autosomno naslijedivanje i produljeno vrijeme krvarenja. Bolest je dobila ime po dr. Eriku von Willebrandu jer su njegova zapažanja bila vrlo dobra a bolesti detaljan.



Slika 1. Ålandske otoci u Finskoj

Bolest je najčešće blaga ali najučestalija od svih ostalih bolesti zgrušavanja. Pojavljuje se u muškaraca i žena svih etničkih skupina, česta je u više osoba iste obitelji, a 1 - 3 od 100 ljudi ima vWD (1% - 3% populacije). U nekim bolesnika može izazvati ozbiljne posljedice naročito kod kirurških zahvata, nakon ozljede ili tijekom poroda.

Broj neprepoznatih slučajeva je daleko veći najčešće zbog blagih simptoma ili neadekvatne obrade. Često ni bolesnik pa niti liječnik ne prepozna ovu nasljednu bolest.

FVIII cirkulira u krvi u formi kompleksa vWF-FVIII:C od kojih FVIII:C predstavlja koagulacijsku aktivnost FVIII, a vWF omogućava adheziju i agregaciju trombocita na mjestu ozljede i nosilac je i stabilizator F VIII:C u cirkulaciji. FVIII:C nastaje u jetrenim stanicama, vWF nastaje u megakariocitima i stanicama endotela. VWF se sintetizira kao monomer koji zatim prelazi u multimere. Veliki multimeri podržavaju adheziju trombocita na kolagen (2).

Od 1980. godine započete su molekularne studije koje su pomogle preciznijoj definiciji vWD, bolesti koja se nasljeđuje autosomno dominantno. Definirana je mutacija gena za vWF na kromosomu 12, pa osobe s vWD imaju normalan FVIII gen na X kromosomu, promijenjen vWF gen na kromosomu

12. Blaži oblici ne moraju uvijek biti uzrokovani mutacijom vWF gena. Klasifikacija vWD prikazana je u Tablici 1.

Najčešći je tip 1 vWD (70 – 80%), koji se nasljeđuje autosomno dominantno, manje čest je tip 2 (20 – 30%), koji se također nasljeđuje autosomno dominantno. Tip 3 se pojavljuje rijetko (1%), a nasljeđuje se recessivno (3).

Tablica 1. Klasifikacija vWD

TIP	Karakteristike
1	Djelomični kvantitativni nedostatak vWF
2	Kvalitativni defekt vWF-a
2A	Smanjena vWF adhezija trombocita s nedostatkom velikih multimeri
2B	Povećana aktivnost za trombocitni GPIb
2M	Smanjena vWF adhezija trombocita bez nedostatka velikih multimeri
2N	Značajno smanjen afinitet nosivosti FVIII:C
3	Kompletan nedostatak vWF

Pojedini tipovi vWD razlikuju se i po svojim kliničkim karakteristikama, koje su prikazane u Tablici 2.

Prema težini bolesti i postotku faktora vWD dijelimo na teški oblik kada je vWF:RCO < 10%, srednje teški oblik kada je vWF:RCO između 10% i 30% i blagi oblik s vWF:RCO između 30% i 40%.

Tablica 2. Kliničke karakteristike pojedinih tipova VWD.

TIP	Kliničke karakteristike
1	Kvantitativni nedostatak vWF: Najblaži, lako stvaranje modrica, rekurentna krvarenja iz nosa, teža menstrualna krvarenja, produljeno krvarenje kod porođaja, krvarenja kod kirurških zahvata
2	Kvalitativni nedostatak vWF: Simptomi u ranom djetinjstvu čak i kod rođenja, krvarenja iz posjekotina, hematomi po koži i krvarenja iz nosa, produljena krvarenja nakon vađenja zuba ili male traume. Više od 50% žena s vWD tip 2 ima teška menstrualna krvarenja koja mogu zahtijevati i transfuzije krvi, produljena pojačana krvarenja u porođaju
3	Kompletan nedostatak vWF: Najteži udružen s krvarenjem iz usta i nosa, probavnog, genitalnog i mokraćnog sustava, spontana krvarenja u mišiću i zglobove, deformacije zglobova i invaliditet, produljena krvarenja tijekom menstruacije i porođaja

Za postavljanje dijagnoze potrebna je pozitivna osobna i/ili obiteljska anamneza o mukokutanim krvarenjima i klinički kriteriji kao što su:

1. evidentna mukokutana krvarenja,
2. pozitivni laboratorijski testovi,
3. zbir bodova krvarenja (engl. *Bleeding Score* - BS).

BS se izračunava kao zbroj težine krvarenja za više simptoma (Tablica 3.). U zdravih ljudi je < 3. Postoje upitnici koji su prilagođeni odraslim bolesnicima i oni koji su prilagođeni djeci (4).

Tablica 3. Zbir bodova krvarenja - BS

Simptomi	Bodovi
Epistaksia	0 = ne ili beznačajna 1 = prisutna 2 = tamponada, kauterizacija 3 = transfuzija, nadomjesna terapija
Kožna krvarenja	0 = ne ili beznačajni 1 = petehije ili modrice prisutne 2 = hemATOMI 3 = medicinska pomoć
Krvarenja kod manjih povreda	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutna (1-5 epizoda godišnje) 2 = medicinska pomoć 3 = kirurška pomoć/ transfuzija
Krvarenja u usnoj šupljini	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutna 2 = medicinski pomoć 3 = kirurška pomoć/ transfuzija
Krvarenja u probavni sustav	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutna 2 = medicinska pomoć 3 = kirurška pomoć/ transfuzija
Postapartalna krvarenja	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutna, terapija željezom 2 = transfuzije, kiretaža, suture 3 = histerektomija
Mišićni hematomi i krvarenje u zglobove	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutni 2 = medicinska pomoć 3 = transfuzije, intervencija
Ekstrakcija zuba (teža krvarenja)	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutna 2 = suture ili tamponada 3 = transfuzije

Kirurški zahvati (teža krvarenja)	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutna 2 = suture ili reoperacija 3 = transfuzije
Menoragija	0 = ne ili beznačajno 1 = prisutna 2 = konzultacije, tablete, terapija željezom 3 = transfuzije, histerektomija, kiretaža, nadomjesno liječenje

Smjernice u dijagnozi nam daje anamneza i klinički pregled. Ako su anamneza i BS pozitivni izraditi ćemo KKS, trombocite, PV, aPTV, TV i fibrinogen, a ako su krvarenja intenzivna potrebno je učiniti incijalne testove: vWD:Ag, vWD:RCO (ristocetin kofaktor) i FVIII. Ako su ovi testovi pozitivni onda će se provesti dijagnostika koja nam može ukazati o kojem se podtipu vWD radi. Odabrana specijalizirana ispitivanja za vWD nakon što se ponove incijalni vWD testovi su:

1. Omjer vWD:RCO i vWD:Ag,
2. Distribucija multimera,
3. Vezanje kolagena (engl. *vWF collagen binding - vWF:CB*),
4. Agregacija trombocita inducirana ristocetinom (engl. *Ristocetin-Induced Platelet Aggregation - RIPA*) ili vezanje trombocita,
5. Vezanje FVIII,
6. vWF propeptid (vWFpp),
7. Studije trombocita i vWF,
8. Odgovor FVIII:C i vWF na desmopresin (DDAVP),
9. Sekvencioniranje DNA vWF gena (tip 2).

Ove pretrage su neophodne za potpunu dijagnozu različitih varijanti vWD i razlikovanje tipova 1 i 2 od teških varijanti tipa 1 i tipa 3 (5).

Za liječenje vWD koriste se DDAVP i koncentrat FVIII/vWF. Od poznatih koncentrata koji su dostupni na našem tržištu su Haemate-P i najnoviji Wilate (6,7).

Tablica 4. Preporučeno liječenje vWD

TIP vWD	Preporučeno liječenje
1	DDAVP
2	FVIII/vWF koncentrat
2A	FVIII/vWF koncentrat
2B	FVIII/vWF koncentrat
2M	FVIII/vWF koncentrat
2N	FVIII/vWF koncentrat
3	FVIII/vWF koncentrat

Literatura:

1. Gralnick HR, Williams SB, McKeown LP, i sur. Platelet von Willebrand factor. Mayo Clin Proc. 1991;66(6):634-40.
2. Castaman G, Rodeghiero F. Advances in the diagnosis and management of type 1 von Willebrand disease. Expert Rev Hematol. 2011;4(1):95-106.
3. Michiels JJ, Gadsseur A, Budde U, i sur. Characterization, classification, and treatment of von Willebrand diseases: a critical appraisal of the literature and personal experiences. Semin Thromb Hemost. 2005;31(5):577-601.
4. Biss TT, Blanchette VS, Clark DS, i sur. Quantitation of bleeding symptoms in children with von Willebrand disease: use of a standardized pediatric bleeding questionnaire. J Thromb Haemost. 2010;8(5):950-6.
5. Gadsseur A, Hermans C, Berneman Z, Schroyens W, Deckmyn H, Michiels JJ. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. Acta Haematol. 2009;121(2-3):71-84.
6. Dolatkhah R, Kermani IA, Sanaat Z, i sur. Clinical use of Haemate-P in inherited von Willebrand's disease: a patient with type 3 VWD and recurrent menometrorrhagia. Haemophilia. 2010;16(3):555-7.
7. Berntorp E, Windyga J; European Wilate Study Group. Treatment and prevention of acute bleedings in von Willebrand disease-efficacy and safety of Wilate, a new generation von Willebrand factor/factor VIII concentrate. Haemophilia. 2009;15(1):122-30.

Praćenje učestalosti venskih tromboembolijskih bolesti u Republici Hrvatskoj

**Dr. sc. Dražen Pulanić, dr. med.¹,
Velka Gverić-Krečak, dr. med.²**

¹Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: dpulanic@yahoo.com

²Odjel interne medicine, OB Šibenik

E-pošta: velka.gveric-krecak@si.t-com.hr

Uvod

Venske tromboembolije (VTE) su među najvećim medicinskim i javnozdravstvenim problemima današnjice. Incidencija VTE, koje uključuju duboku vensku trombozu (DVT) i plućnu emboliju (PE), se prema većini recentnih studija u svijetu kreće oko 1 na 1000 stanovnika. Ukoliko se obradom ne može utvrditi uzrok VTE, ona se smatra idiopatskom. Trombofilija je prema definiciji sklonost ili predispozicija za nastanak tromboze. Trombofilija se najčešće dijeli na primarnu (nasljednu, genetsku) i sekundarnu (stečenu). U sekundarnu trombofiliju ubraja se niz bolesti, poremećaja i stanja, pa i uzmajanje određenih lijekova, koji povećavaju rizik nastanka VTE.

Brojni podaci vezani uz VTE, te nasljednu i stečenu trombofiliju u Hrvatskoj nisu poznati. S obzirom na veliku učestalost VTE u općoj populaciji, nije jednostavno odrediti ili procijeniti incidenciju VTE. Tijekom sastanka Krohema u Vodicama je raspravljen prijedlog Krohemove studije praćenja učestalosti venskih tromboembolija u Šibensko-kninskoj županiji (a po mogućnosti i u što više drugih županija), a zatim bi se takvi podaci ekstrapolirali na cijelu Republiku Hrvatsku (RH).

1. Ciljevi

Ciljevi predloženog istraživanja su odrediti učestalost:

1. VTE u pojedinoj županiji, a zatim ih ekstrapolirati na cijelu RH,
2. idiopatskih VTE u pojedinoj županiji, a zatim ih ekstrapolirati na cijelu RH,
3. sekundarnih (stečenih) VTE u pojedinoj županiji, a zatim ih ekstrapolirati na cijelu RH.

2. Metode

Analizirali bi se bolesnici s VTE liječeni u pojedinim županijskim bolnicama.



Ispunio bi se niže navedeni upitnik, te bi se zatim nakon jednogodišnjeg praćenja učinila statistička analiza s ekstrapolacijom podataka na cijelu Republiku Hrvatsku.

Upitnik o novodijagnosticiranoj venskoj tromboemboliji:

1)	Inicijali, spol, datum rođenja _____
2)	Dijagnoza (zaokružiti): 1) DVT 2) PE 3) DVT i PE
3)	“Rijetke” VTE (zaokružiti): cerebralne, portalne, hepatalne, lijenalne, mezenterijske ili renalne vene
4)	1. ili recidiv VTE (brojčano koji recidiv): _____
5)	Cigarete (zaokružiti): 1) Da 2) Ne Ako da, koliko na dan (broj cigareta) _____
6)	VTE prvih srodnika (zaokružiti): 1) Da 2) Ne
7)	VTE (zaokružiti): 1) idiopatska 2) sekundarna
8)	Ako sekundarna (provocirana, stečena) VTE, koja (zaokružiti): a) Aktivna zločudna bolest ≤ 6 mjeseci b) Trauma, imobilizacija, operacija, sepsa, centralni venski kateter c) Trudnoća i puerperij d) Let avionom > 6 sati e) Lijekovi (zaokružiti): peroralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija, talidomid, L-asparaginaza, tamoksifen, raloksifen, ostalo (navesti) _____ f) Druge bolesti (zaokružiti): antifosfolipidni sindrom, mijeloproliferativna neoplazma, paroksizmalna noćna hemoglobinurija, DIK, trombotična trombocitopenična purpura, sistemski eritematozni lupus, upalna bolest crijeva, neurološke bolesti s paralizom, ostalo (navesti) _____
9)	Ishod liječenja (zaokružiti): 1) izlječen 2) umro
10)	Uzrok smrti (navesti): _____
11)	Komorbiditet (navesti najvažnije): _____

Pokrenut je administrativni postupak kako bi se navedeno istraživanje moglo provesti u pojedinim bolnicama, te su do trenutka zaključivanja ovog teksta osim dr. Velke Gverić-Krečak iz OB Šibenik u ovu studiju također uključeni dr. Mili Komljenović iz OB „Hrvatski ponos“ Knin, dr. Ana Bajer Feketić iz OB Virovitica i dr. Ilenija Romić iz OB Dubrovnik.

Zaključak: Ostvarenje predloženog ispitivanja će svakako biti zahtjevno, ponajviše zbog velike učestalosti VTE i stoga što se nerijetko VTE liječe i kod liječnika drugih specijalnosti, a ne samo hematologa. Nadamo se da će predloženo i pokrenuto istraživanje prikupiti barem aproksimativne podatke o incidenciji VTE u RH, što bi moglo imati veliku javnozdravstvenu važnost. Za očekivati je da će se u studiju vremenom uključiti i drugi centri iz drugih županija, čime bi uzorak bolesnika postao još veći i reprezentativniji za cijelu RH.

Postupnik kod neutropenijske vrućice

Dr. sc. Nadira Duraković, dr. med.¹,

doc. dr. sc. Ernest Bilić, dr. med.²,

prof. dr. sc. Radovan Vrhovac, dr. med.³

¹Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

²Zavod za dječju hematologiju i onkologiju, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KB Merkur, Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Radovan Vrhovac, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Merkur, Zagreb

E-pošta: radovan.vrhovac@zg.t-com.hr

Uvod

Tijekom sastanka Krohema u Vodicama predstavljen je postupnik pri neutropenijskoj vrućici u čijoj su izradi osim članova Radne skupine za potpornu terapiju sudjelovali i infektolozi prof. dr. Bruno Baršić i prof. dr. Adriana Vince. Nakon rasprave te naknadnog doprinosa članova Pedijatrijske skupine usvojena je ova verzija smjernica. Dogovoren je da će se smjernice periodički reevaluirati, mijenjati, odnosno dopunjavati ovisno o novim saznanjima.

DEFINICIJA NEUTROPENIJSKE VRUĆICE:

- Vrućica: jednokratno izmjerena temperatura $\geq 38.3^{\circ}\text{C}$ ili temperatura $\geq 38.0^{\circ}\text{C}$ izmjerena u dva navrata s namanje 1h razmaka
- Neutropenija:
 - neutrofili $<0.5 \times 10^9/\text{L}$, ili
 - neutrofili $<1.0 \times 10^9/\text{L}$ uz očekivani daljnji pad na $<0.5 \times 10^9/\text{L}$ u sljedećih 48h.

Procjena stanja bolesnika:

- ustanoviti vitalne znakove: RR, puls, CVT ukoliko ima CVK
- kompletni pregled bolesnika uključujući meningitičke znakove, pregled kože i kožnih pregiba, anusa, pregled ždrijela i usne šupljine, auskultaciju srca i pluća, mjesta insercije CVK, mjesta eventualnih zahvata/biopsija.

Radiološka i laboratorijska obrada:

- KKS, DKS, urea, kreatinin, elektroliti, transaminaze, CRP, analiza urina
- RTG srca i pluća.

Početna mikrobiološka obrada:

- 2 seta hemokultura iz periferije i po jedan set iz svakog lumena katetera ukoliko postoji
- urinokultura
- brisevi suspektnih mjesta (ždrijelo, mjesto insercije CVK, aspirat/biopsija kožnih lezija)
- kultura sputuma u bolesnika s produktivnim kašljem
- u slučaju proljeva toksin *C. difficile*, stolica bakteriološki i virusološki.

Početna terapija:

- izbor početne terapije ovisi o lokalnim obrascima osjetljivosti, kolonizaciji i prethodnim infekcijama rezistentnim sojevima (MRSA, VRE, ESBL), mjestu infekcije, poremećenoj bubrežnoj/jetrenoj funkciji, prethodnoj profilaktičkoj/terapijskoj upotrebi antibiotika
- preporuča se u prvoj liniji koristiti monoterapiju
 - **piperacilin s tazobaktamom** u dozi od **4 x 4.5 g iv**
 - **meropenem** u dozi od **3 x 1 g iv** (djeca: 3 x 20 mg/kg TT, maksimalno 3 x 1 g)
 - **imipenem sa cilastatinom** u dozi od **6 x 500 mg iv** (djeca: 6 x 7.5 mg/kg TT, maksimalno 6 x 500 mg)
 - **cefepim** u dozi od **3 x 2 g iv** (djeca: 3 x 50 mg/kg TT ili 6 x 25 mg/kg TT, maksimalno 6 g ukupno).

Vankomicin u inicijalnoj terapiji

U empirijsku terapiju dodati **vankomicin** u dozi od **2 x 1 g iv** (djeca: 4 x 10 mg/kg TT ili 2 x 20 mg/kg TT) ukoliko:

- postoji klinička sumnja na postojanje infekcije katetera ili infekcije kože i mekih česti
- je poznata kolonizacija rezistentnim sojevima stafilocoka i streptokoka
- je identificiran gram pozitivan uzročnik iz hemokulture, prije nego je poznata konačna identifikacija odnosno antibiogram
- ima teški mukozitis (gradus III ili viši)
- klinička slika sepse sa septičkim šokom.

Ukoliko je terapija vankomicinom započeta empirijski, a dokazan je drugi uzročnik može se prekinuti primjena. Vankomicin je opravdano nastaviti ukoliko nije dokazan uzročnik, a nakon uvođenja vankomicina došlo je do regresije simptoma.

U slučaju da je postavljena indikacija za primjenu vankomicina, a bolesnik ima bubrežnu insuficijenciju indicirano je primijeniti linezolid odnosno teikoplanin u prvoj liniji.

Ukoliko je u hemokulturama višekratno dokazan gram + uzročnik valja razmotriti zamjenu centralnog venskog katetera.

Kombinirana antibiotska terapija

- ukoliko se bolesnik kod nastupa neutropenijske vrućice prezentira kliničkom slikom septičnog šoka opravdano je primijeniti kombiniranu terapiju, odnosno uz ranije predložene lijekove monoterapije dodati i aminoglikozid.

Dinamika praćenja kliničkih i laboratorijski parametara tijekom vrućice:

- dnevna procjena
 - vitalni znakovi, kompletna krvna slika
- najmanje tri puta tjedno
 - jetrena i bubrežna funkcija, CRP
- mikrobiologija: hemokulture dnevno u slučaju perzistirajuće vrućice, poželjno u trenutku nastupa zimice odnosno tresavice, ostalo u slučaju kliničke indikacije.

Prilagodba antibiotske terapije

- ukoliko se izolira uzročnik za kojeg se smatra da je moguć uzrok infekcije terapiju treba prilagoditi osjetljivosti
- ukoliko je bolesnik i dalje febrilan ali stabilan terapiju nastaviti tijekom 3-5 dana
- ukoliko je bolesnik febrilan nakon 3-5 dana od uvođenja terapije, lijek započet u monoterapiji zamjeni se drugim lijekom predloženim kao mogućim lijekom u monoterapiji (razmotriti ponovno kriterije za uvođenje vankomicina)
- ukoliko u bilo kojem trenutku bolesnik postane klinički nestabilan i zahtjeva trajno monitoriranje
 - konzultirati liječnika u Jedinici intenzivne skrbi
 - konzultirati specijalista infektologa/pulmologa
 - razmotriti potrebu dodatne dijagnostičke obrade
 - razmotriti potrebu prilagodbe antimikrobne terapije (zamjena antibiotika, kombinirana terapija, pitanje antifungalne terapije).

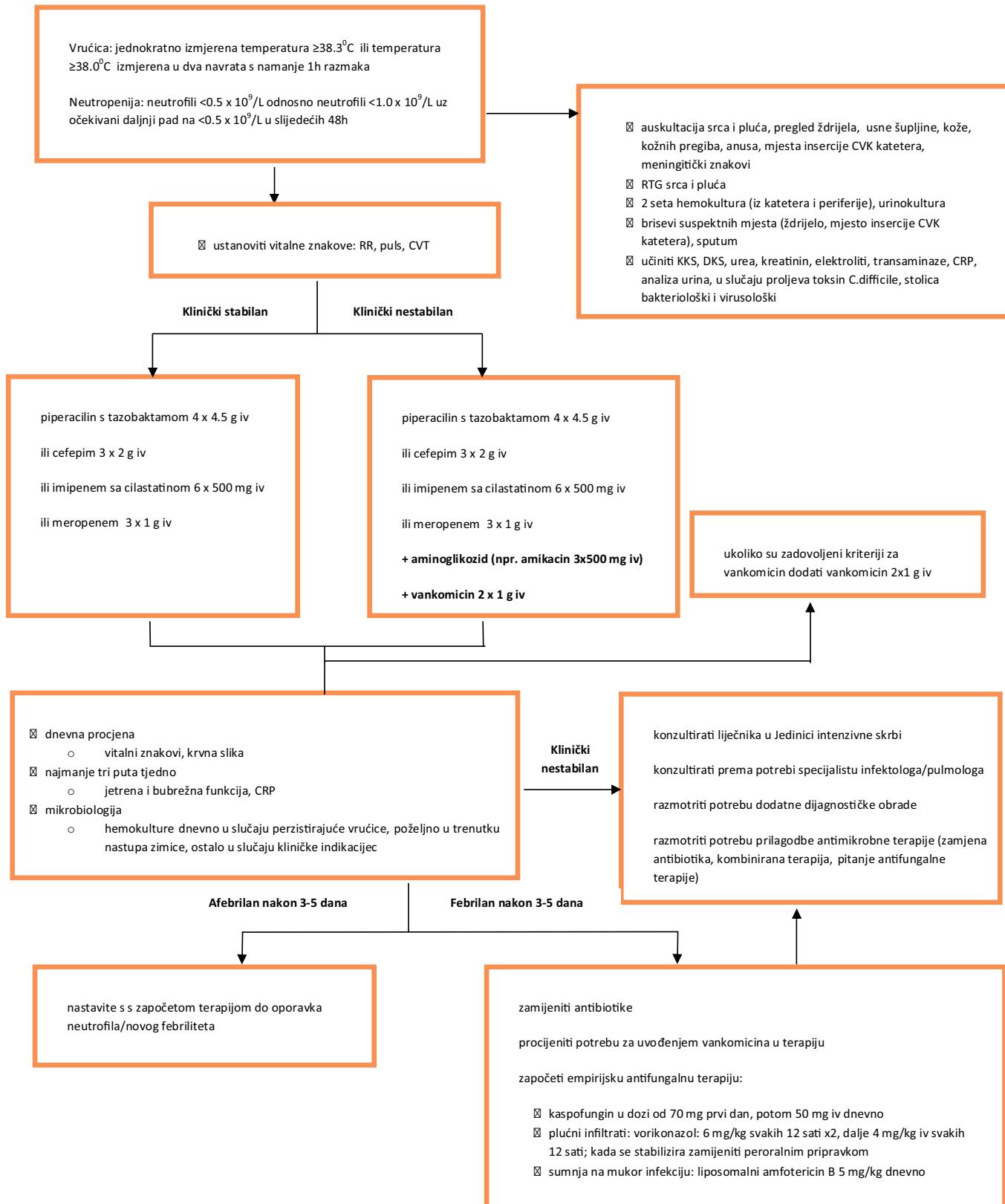
Empirijska antifungalna terapija

Ukoliko febrilitet perzistira, najkasnije 7 dana od početka febriliteta (u drugoj odnosno kasnijoj febrilnoj epizodi od 3. dana) opravdano je započeti empirijsku antifungalnu terapiju jednim od dostupnih antifungalnih lijekova:

- koloidna disperzija amfotericina B 3-6 mg/kg (početna 1 mg/kg, eskalacija do pune doze); djeca: 3-4 mg/kg (početna 1 mg/kg, eskalacija do pune doze tijekom 2-4 dana) ili liposomalna otopina amfotericina B u dozi od 3mg/kg
- kaspofungin 70 mg iv prvi dan, potom 50 mg iv dnevno (za djecu kaspofungin 70 mg/m² iv prvi dan, potom 50 mg/m² iv dnevno (maksimalna doza 70 mg odnosno 50 mg), za dojenčad u dobi ispod 3 mjeseca doza je 1 mg/kg TT iv 1x dnevno)
- vorikonazol: 6 mg/kg svakih 12 sati dvije doze potom 4 mg/kg iv svakih 12 sati;
- ukoliko su prisutni plućni infiltrati indicirano je primijeniti vorikonazol u prvoj liniji
- ukoliko sumnjamo na mukor infekciju indicirano je primijeniti dostupne pripravke amfotericina B
- ukoliko postoji sumnja na infekciju rezistentnim Candida sojevima indicirano je primijeniti kaspofungin.

Prekid terapije antibioticima

- ukoliko je bolesnik postao afebrilan, a broj neutrofila je $>0.5 \times 10^9/L$, a uzročnik i/ili sijelo infekcije nije identificiran može se prekinuti antibiotska terapija ako je provedena najmanje 10 dana
- ukoliko je bolesnik postao afebrilan, no i dalje je neutropeničan, nastaviti antibiotsku terapiju do oporavka neutrofila (neutrofili $>0.5 \times 10^9/L$)
- ukoliko je bolesnik febrilan i nakon prestanka neutropenije valja razmisliti i o neinfektivnim uzrocima vrućice (vrućica uzrokovana lijekovima, vrućica povezana s tumorom) te virusnim infekcijama.

**Literatura:**

- Hughes WT et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. Clin Infect Dis. 1997;25:551-73.
- Segal BH et al. Prevention and treatment of cancer-related infections. J Natl Compr Canc Netw. 2008;6(2):122-74.
- Marchetti O et al. Empirical antifungal therapy in neutropenic cancer patients with persistent fever. EJC Supplements. 2007; 5(2):23-31.
- Elting LS, Rubenstein EB, Rolston K, et al. Time to clinical response: an outcome of antibiotic therapy of febrile neutropenia with implications for quality and cost of care. J Clin Oncol. 2000;18:3699–3706.
- Mirko Šamija, Damir Nemet i sur. Potporno i palijativno liječenje onkoloških bolesnika. Medicinska naklada. Zagreb, 2010.

Dasatinib u liječenju Ph pozitivne kronične mijeloične leukemije – naše iskustvo

Dubravka Sertić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

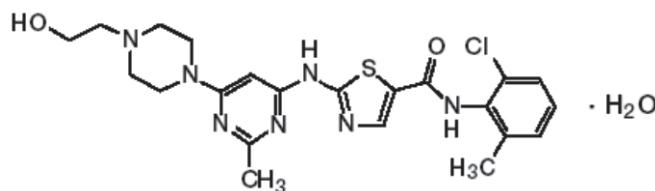
KBC Zagreb

E-pošta:

dsertic@net.hr

dsertic@kbc-zagreb.hr

Dasatinib je inhibitor tirozin kinaze druge generacije, te osim što inhibira abl kinazu također je i snažan src inhibitor. Od lipnja 2006. godine registriran je od FDA za liječenje Philadelphia pozitivne (Ph+) kronične mijeloične leukemije (KML) rezistentne na imatinib ili u slučaju nepodnošljivosti imatinib-a. Krajem 2010. registrira ga FDA, a potom EMEA za 1. liniju liječenja KML. Od 26.6.2010. uvršten je na osnovnu listu lijekova HZZO i na Popis posebno skupih lijekova koji se financiraju izvan bolničkog limita za liječenje Ph+KML nakon neuspjeha liječenja imatinibom ili nepodnošenja imatinib-a.



Od siječnja 2007. do lipnja 2010. postojao je program donacije dasatiniba od Bristol Myers Squibba kao "compassionate use" u Hrvatskoj za liječenje bolesnika s Ph+KML. U Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb liječeno je ukupno 11 bolesnika, 8 u kroničnoj fazi i 3 u blastičnoj transformaciji, svi nakon neuspjeha liječenja imatinibom.

Tablica 1.

Karakteristike bolesnika liječenih dasatinibom u KBC Zagreb 2007-2010

Ukupno bolesnika	11
Spol M/Ž	6/5
Dob	51,5 (31-67) god
Dob pri dg:	43,9 (23-59) god.
Faza bolesti (KF/BT)	8/3
Trajanje KML do th dasatinibom	80,8 (18-167) mj.
Trajanje liječenja imatinibom	44,9 (6-90) mj.
Liječenje interferonom +/-araC	5
Liječeni drugom terapijom	1
Praćenje	22 (5-44) mjeseci

Trajanje liječenja imatinibom bilo je često prekidano što zbog hematoloških nuspojava (citopenije), a što zbog nemogućnosti redovitog uzimanja imatiniba zbog postupka odobravanja liječenja. Također je često bila redukcija doze ispod 400 mg/dan. Prije odobravanja dasatiniba svi bolesnici su najmanje 3 mjeseca uzimali imatinib u dozi od 600-800 mg. Privremeni kompletan citogenetski odgovor na imatinib imalo je 5 bolesnika (3 u KF, 2 u BT), dvoje djelomičan citogenetski odgovor (manje od 35% Ph+ stanica, svi KF), troje mali citogenetski odgovor (Ph+>35%, svi KF) i jedan bez citogenetskog odgovora (BT).

Tablica 2.

Najbolji citogenetski odgovor na imatinib u bolesnika kasnije liječenih dasatinibom

	Kronična faza	Blastična transformacija
Kompletan citogenetski odgovor-CCR	3	2
Djelomični citogenetski odgovor-PCR	2	0
Mali citogenetski odgovor-MCR	3	0
Bez citogenetskog odgovora	0	1

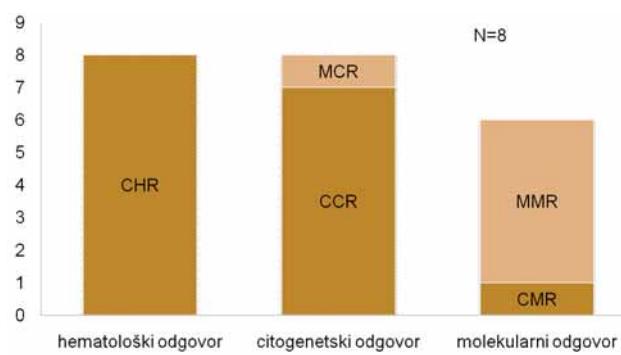
Pet bolesnika u KF imalo je dodatne kromosomske promjene u Ph+ stanicama. Kod jedne bolesnice u KF dokazana je prije terapije mutacija Y258H, a kod jednog bolesnika u BT retrogradno je dokazana mutacija E255K. Dva bolesnika su bila u mijeloičnoj, a jedan u limfoblastičnoj transformaciji KML.

Rezultati

Svih 8 bolesnika u kroničnoj fazi bolesti postiglo je kompletan hematološki odgovor. Sedmero je postiglo kompletan citogenetski odgovor, a jedan djelomičan. Veliki molekularni odgovor postiglo je 6 bolesnika (QT-PCR na bcr-abl/abl (IS)<0,1%), od kojih je jedan bolesnik postigao kompletan molekularni odgovor.

Slika 1.

Hematološki, citogenetski i molekularni odgovor bolesnika u kroničnoj fazi bolesti liječenih dasatinibom

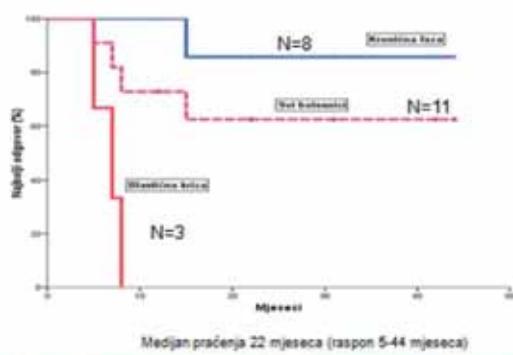


Kod jedne bolesnice s kompletnim citogenetskim i velikim molekularnim odgovorom ($bcr-abl/abl < 0,1\%$ ^{IS}) pojavile su se promjene u Ph-negativnim stanicama (+8 kromosom).

Medijan praćenja bolesnika bio je 22 mjeseca (raspon 5-44 mjeseca). Samo je kod jednog bolesnika u KF bolesti, i to onog koji nije postigao kompletan citogenetski odgovor, došlo do progresije bolesti, te je liječenje prekinuto i nastavljeno hidroksigurejom jer bolesnik nije više želio liječenje inhibitorom tirozin kinaze, a uputna je bila i suradljivost u dotadašnjem liječenju.

Slika 2.

Trajanje najboljeg odgovora u bolesnika liječenih dasatinibom u KBC Zagreb 2007-2010

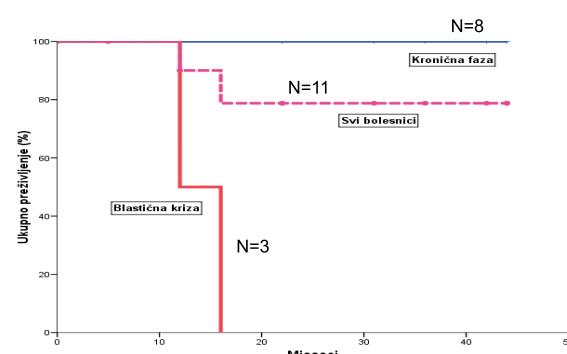


Slika 1. Trajanje najboljeg odgovora (line za bestentelni remisiju). Dvogodišnje raspodjeljenje trajanja odgovora: za kliničku fazu 80%, za blastičnu transformaciju 0%, za sve 62%. $P < 0,001$.

Sva tri bolesnika koji su dasatinib započeli uzimati u blastičnoj transformaciji povoljno su odgovorili na liječenje, tj. postigli su kompletan hematološki odgovor i postali neovisni o transfuzijama trombocita i eritrocita uz dobru kvalitetu života. Jedan bolesnik je postigao djelomični citogenetski odgovor (Ph 1-35%). U svih bolesnika je došlo do progresije, tj. ponovne pojave blastične krize (nakon 5, 7 i 8 mjeseci) i u svih troje bolesnika pojavila se u vrijeme progresije mutacija T315I.

Slika 3.

Preživljivanje bolesnika liječenih dasatinibom u KBC Zagreb 2007-2010



Slika 3. Ukupno preživljivanje (OS). Dvogodišnje ukupno preživljivanje: za kliničnu fazu 100%, za blastičnu transformaciju 0%, za sve 79%. $P = 0,001$.

Podnošljivost dasatiniba

Hematološke nuspojave (anemija, granulocitopenija i trombocitopenija) su bile najčešće stadij I i II, a samo jedan bolesnik je imao trombocitopeniju stadija III. Trombocitopenija je najčešće uzrokovala redukciju doze dasatiniba no s vremenom se uspjela postupno podići dnevna doza dasatiniba na 100 mg. Od sedmoro bolesnika koji nastavljaju liječenje samo dvoje i dalje ima značajniju trombocitopeniju (trombociti 30-50) uz postignuti kompletan citogenetski i veliki molekularni odgovor QT-PCR na $bcr-abl/abl$ IS $< 0,1\%$ (jedan bolesnik uzima dasatinib 100 mg, a drugi 80 mg dnevno).

Od nehematoloških nuspojava kod jednog bolesnika u četvrtoj godini liječenja javio se pleuralni izljev gradusa II. Drugih nuspojava nije zabilježeno.

Doziranje dasatiniba

Četiri bolesnika u kroničnoj fazi započelo je liječenje u dozi od 2×70 mg kako je u to vrijeme bilo propisano, no od 10./2007. nastavljaju liječenje u jednoj dnevnoj dozi od 100 mg. Ostali su započeli liječenje s dozom od 100 mg na dan. Četiri bolesnika nikada nisu trebali snižavati propisanu dnevnu dozu, dok su ostali imali sniženje doze uz povremene prekide. Tijekom vremena uspjela im se podići doza dasatiniba na optimalne vrijednosti (100 mg). Dalje nastavlja liječenje sedam bolesnika u kroničnoj fazi i to šestero po 100 mg/dan, a jedna bolesnica 80 mg/dan.

Sva tri bolesnika s blastičnom transformacijom nakon postizanja remisije imali su urednu krvnu sliku bez citopenije, te nije trebalo reducirati dozu. Doza dasatiniba za bolesnike u transformaciji KML je 140 mg jednom dnevno. Svi bolesnici s BT su zbog progresije prekinuli liječenje dasatinibom.

Zaključak

Dasatinib je vrlo djelotvoran u liječenju bolesnika s KML nakon neuspjeha liječenja imatinibom. Nehematološke nuspojave kod naših bolesnika su bile blage i nisu zahtijevale prekid liječenja. Od hematoloških nuspojava najizraženija je bila trombocitopenija zbog koje je doza dasatiniba kod nekih bolesnika bila reducirana, no u većine bolesnika uspjela se postupno povisiti doza na 100 mg. Kod bolesnika u blastičnoj transformaciji uspjelo se privremeno stabilizirati bolest odnosno postići hematološka i citoška remisiju. Za to vrijeme treba potražiti podobnog davatelja koštane srži i izvršiti transplantaciju što je u skladu s preporukama ELN.

Literatura:

- Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al.: Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108:1809-1820.
- Hochhaus A, Kantarjan HM, Baccarani M, et al: Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood*. 2007;109:2303-2309.
- Baccarani M, Cortes J, Pane, F et al: Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management Recommendations of European Leukemia Net: *J Clin Onc*. 2009;27:6041-6051.
- U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute, Common terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAE), May 28, 2009.

Određivanje koncentracije imatiniba u humanoj plazmi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s UV detektor (HPLC-UV)

Dr. sc. Paula Granić

Zavod za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju,
KBC Zagreb
E-pošta: pgranic@kbc-zagreb.hr

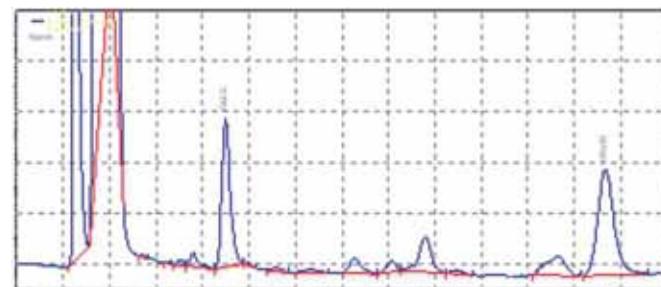
U Zavodu za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, a u sklopu kliničke studije ESSENCE – procjena djelotvornosti imatinib mezilata (Glivec, Gleevec) u bolesnika s kroničnom mieloičnom leukemijom (KML), postavljena je i validirana metoda: Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (High Pressure Liquid Chromatography – HPLC) s UV detektorom za određivanje koncentracije imatiniba u plazmi.

Imatinib je inhibitor tirozin kinaze, molekulske težine (MT) 493,6 g/mol – čisti imatinib, odnosno 589,6g/mol - imatinib mesilat. Imatinib se vrlo dobro apsorbira: bioraspoloživost je 98% s maksimumom između 2-4 sata nakon doze. Vezanje na protein: 95%. Metabolizira se primarno preko CYP3A4 i CYP3A5. Glavni metabolit je derivat N-demetyliranog piperazina. Poluvrijeme eliminacije je 18 sati za imatinib, 40 sati za glavni aktivni metabolit. Eliminacija je uglavnom stolicom (68%) i urinom (13%).

HPLC je tehnika kod koje je mobilna faza tekućina. Kromatografska separacija se odvija stvaranjem ravnoteže između mobilne i stacionarne faze, a vrijeme između započinjanja procesa separacije i izlaska tvari s kolone se naziva retencijsko vrijeme – Rf.

Uzorak plazme je određivan na HPLC aparatu s

kolonom MN EC Nucleosil 100-5-C-18 EC 250x4,6 mm. Mobilna faza je amonijev pufer (pH 6,9): metanol: acetonitrila (40:40:20). Protok je bio 0,75 ml min⁻¹. Za kvantifikaciju je korišten UV detektor s valnom duljinom od 265 nm. Supstanca imatiniba (imatinib mesilat) je od tvrtke NOVARTIS, a interni standard (IS) – clozapin tvrtke SIGMA.



Sl 1. Kromatogram imatiniba i IS-clozapina

Postavljena metoda je validirana na selektivnost, linearnost, preciznost (intra-day i inter day) i stabilnost.

Selektivnost metode pokazuje otsutnost interferirajućih pikova i Rf. Rf imatiniba je 4,6 min, Rf IS (clozapine) je 13,3 min. Kalibracijska krivulja je linearna u rasponu od 40-5000 ng/ml ($r^2 0,999$), granica detekcije (LOD) je 13,1 ng/ml, a granica kvantifikacije (LOQ) je 38,6 ng/ml. Cjelokupni RUN je ~ 20 min. U Tablici 1. su dati kriteriji prihvatljivost i rezultati validacije metode.

Tablica1. Kriteriji prihvatljivosti i rezultati validacije HPLC metode za imatinib

	Kriterij prihvatljivosti	Rezultat
Selektivnost	Informacija	odgovara
Točnost (iskorištenje)	80 – 120%	94 – 103%
Preciznost		
• repetebilnost (ponovljivost)	RSD ≤ 10	3,1%
• intermedijarna preciznost	RSD ≤ 10	3,7%
Linenarnost	k ≥ 0,999	k = 0,999
Stabilnost		
• na odmrzavanje	RSD ≤ 10	6,9%
• kroz 21 dan	RSD ≤ 10	8,2%

Koncentraciju imatiniba u plazmi potrebno je određivati u slučajevima:

1. Sumnja da se pacijent ne pridržava propisane terapije
2. Pacijent ne reagira na terapiju prema očekivanju
3. Sumnja na interakciju lijek-ljek
4. Neuobičajeno teške nuspojave.

Terapijski raspon za imatinib još nije određen, uzima se da mu je „threshold“ 1000 ng/ml, jer su studije pokazale da 76% pacijenata sa značajnim molekularnim odgovorom (MMR) imaju vrijednost iznad 1000 ng/ml, odnosno 73% pacijenata koji nemaju MMR imaju vrijednost ispod 1000 ng/ml imatiniba u plazmi.

Imatinib se metabolizira preko sustava CYP3A4/A5. Lijekovi inhibitori CYP3A4/A5 (ciklosporin, pimozid, claritromici, eritromicin i dr.) mogu po-

većati koncentraciju imatiniba u plazmi, a lijekovi induktori CYP3A4/A5 (barbiturati, karbamazepin, deksametazon, fenitoin, levetiracetam) mogu sniziti koncentraciju imatiniba u plazmi. U tim slučajevima pacijentu se može sugerirati ili promjena lijeka koji je u interakciji ili promjena doze imatiniba.

Vrlo visoke koncentracije imatiniba u plazmi izazivaju neuobičajeno teške nuspojave, no koje su to koncentracije još nije utvrđeno.

Zaključak

Postavljena i validirana HPLC metoda s UV detektorom je dovoljno osjetljiva i specifična za određivanje koncentracije imatiniba u plazbi pacijenata s kroničnom mijeločnom leukemijom.

Uputstvo za uzorkovanje

Uzorak: plazma , antikoagulans EDTA ili heparin*

Postupak: Centrifugirati 5 min na 4000ok/min (3500 ok/min 10-15 min)

Odvojiti plazmu u čistu epruvetu

Uzorak s uputnicom odmah poslati na analizu ili ga pohraniti do slanja na +4°C (do tjedan dana)

Uzorak slati DHL

*Uzimanje uzorka: neposredno prije sljedeće doze.

24±3h – jedanput dnevno; 12±2h – dvaput dnevno

Informacije, telefon: +385 (1) 2367 328

Literatura:

1. T. Velpandian, R.mathur, N. K. agarwal, B. Arora, L. Kumar, S.K. Gupta. Development and validation of a simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of imatinibe in biological samples. Jurnal of Chromatography B. 2004;804:431-4.
2. G. Guents, H. Prenen, P. Schoffski, M. highley, E. Bruijin. Simultaneous determination of AMN107 and imatinib (Gleevec, Glivec, ST1571) in cultured tumour cells using an isocratic high-perfomance liquid chromatography procedure with UV detection. Jurnal of Chromatography B. 2007; 846:341-5.
3. K. Titier, S. Picard, D. Ducint, E. Teilhet i sur. Quantification of imatinib in human plasma by high-perfomance liquid chro-
- matography-tandem mass spectrometry. Ther Drug Monit. 2005;27:634-40.
4. A. Davies, A. K. Hayes, K. Knight, S. J. Watmough. Simultaneous determination of nilotinib, imatinib and its main metabolite (CGP-74588) in human plasma by ultra-violet high perfomance liquid chromatography. Leukemia research. 2007;34:702-7.
5. RL Oostendorp, JH Beijnen, JHM Schellens, O van Tellingen. Determination of imatinib mesylate and its main metabolite (CGP74588) in human plasma and murine specimens by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. Biomed Chromatogr. 2007;21(7):747-54.

Registri za kroničnu mijeloičnu leukemiju

Zinaida Perić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: zina_peric@yahoo.com

Na sastanku Krohema u Vodicama, u studenom 2010., Radna skupina za kroničnu mijeloičnu leukemiju (KML) izvijestila je o radu dva registra; europskog registra ELN-a (EUTOS for CML), te Hrvatskog registra za kroničnu mijeloičnu leukemiju.

Članovi Krohema su na prijašnjim sastancima već upoznati s Registrom u sklopu EUTOS studije (European Treatment and Outcome Study for CML). EUTOS CML register je nastao s ciljem prikupljanja važnih epidemioloških podataka, za procjenu stvarne vrijednosti ELN smjernica u svakodnevnoj kliničkoj praksi, te za stvaranje novih prognostičkih modela, što će naposljeku otvoriti mogućnost individualizacije liječenja temeljem navedenih modela. Navedeni Registar je koncipiran tako da prospективno uključuje novodijagnosticirane bolesnike od 2009. godine u pojedinim europskim zemljama i regijama. S obzirom na poznatu incidenciju KML-a, predviđeno je uključivanje oko 1700 bolesnika u godinu dana u Europi. Hrvatska se projektu priključila u studenom 2009. godine, a u našoj se zemlji u godinu dana očekivalo oko 40 novodijagnosticiranih bolesnika.

U studenom 2010., gotovo po isteku godine dana našeg sudjelovanja, predstavili smo izvrsne rezultate u skladu s predviđenom brojkom. Novodijagnosticiranih je bolesnika u Hrvatskoj bilo 36, i to prema sljedećem rasporedu po centrima: u Zagrebu 15, u Splitu 5, u Osijeku 4, u Rijeci i Šibeniku po 3, u Zadru 2, te u Dubrovniku, Puli, Sisku i Varaždinu po jedan bolesnik (Slika 1.). Iznimnom suradnjom svih naših centara te dobrom komunikacijom hrvatskih hematologa, u studenom 2010., od novodijagnosticiranih 36 bolesnika, u EUTOS CML register bilo je upisano njih 26 (Slika 2.). Ova nas je činjenica iznova svrstala među nekoliko prvih zemalja po broju upisanih bolesnika, te pružila mogućnost za sljedeće spoznaje o našoj populaciji KML bolesnika: medijan dobi kod naših bolesnika pri dijagnozi iznosio je 52 godine (raspon 18-87 godine), s nešto većom učestalosti kod žena (54%), te je pri dijagnozi ECOG bio 0 kod većine bolesnika (61%). Dva pacijenta su

bila ozbiljnije ugroženog općeg stanja (ECOG 4), a većina pacijenata (54%) bila je posve bez simptoma. Povećanu slezenu imalo je 46% pacijenata, a dijagnoza je kod svih bolesnika postavljena u kroničnoj fazi bolesti. Svi ovi podaci svrstavali su naše bolesnike najčešće u intermedijarnu skupinu rizika i po Hasfordovom i po Sokalovom skoru rizika. Postotak izvođenja određenih citogenetskih i molekularnih pretraga pri dijagnozi nije se popravio usprkos naglašavanju ovog problema na prošlom sastanku Krohema, te je klasična citogenetika rađena kod 81% pacijenta, a kvantitativni PCR tek kod polovice pacijenata. Ova saznanja su još jednom potaknula raspravu, s ciljem napredovanja i usaglašavanja svih naših dijagnostičkih centara s ELN smjernicama.

Budući da se uključivanje bolesnika u ovu studiju bliži kraju, prikazom dosadašnjih rezultata nastojali smo hrvatske hematologe potaknuti na prijavu preostalih pacijenata, čime bi naš zadatak prijave svih novodijagnosticiranih bolesnika bio izvršen. U skoroj budućnosti čeka i upisivanje podataka o liječenju i praćenju uključenih bolesnika po isteku godine dana od postavljenе dijagnoze.

Krohemov KML register

Na sastanku u Splitu ponovno je bio predstavljen i Hrvatski register za KML, koji je nastao s ciljem dobivanja epidemiološke slike naše populacije pacijenata, te unaprjeđenja dijagnostike, liječenja i praćenja ove bolesti u skladu s postojećim smjernicama.

Između dva sastanka Krohema svi liječnici su dobili korisnička imena i lozinke za upisivanje bolesnika u Krohemov register. Navedeni podaci im omogućuju pregled svih bolesnika koji su u register upisani od liječnika njihove ustanove, a da pritom mogu mijenjati samo podatke koje su sami unijeli. Dogovoren je da se u register upisuju bolesnici kojima je dijagnoza KML postavljena unutar posljednje četiri godine, kao i novodijagnosticirani bolesnici. Samo se upisivanje podataka vrši putem nekoliko obrazaca: Opći podaci (koji podrazumijeva osnovne podatke o pacijentu); Značajke KML-a (koji se odnosi na demografske, kliničke, hematološke, citološke, patološke podatke, te skor rizika pri dijagnozi; Citogenetski i molekularni nalaz (koji se upisuju višestruko); Liječenje (obrazac podijeljen u liječenje kronične faze, ubrzane faze te blastične krize); i Ishod liječenja (obrazac stvoren u skladu s ELN smjernicama).

Liječnici su zamoljeni da do sastanka Krohema u

Vodicama upisu barem po pet svojih bolesnika (ukupno 5 u svakoj ustanovi), kako bismo mogli uvidjeti kako tehničke tako i logičke nedostatke registra, te ih na sastanku raspraviti. Većina je naših hematologa to i učinila, te su brojni nedostatci riješeni "u hodu" prije sastanka u Vodicama. Do samog je sastanka u Hrvatski registar bilo upisano čak 79 bolesnika, prema sljedećem rasporedu po ustanovama (Slika 3.); iz KBC Zagreb 24 bolesnika, iz KBC Split 13, iz OB Šibenik 10, iz OB Zadar 6, iz KBC Osijek 5, iz

KBC Rijeka, KB Sestre Milosrdnice i KB Sveti Duh po 4 bolesnika, iz OB Slavonski Brod 3 bolesnika, iz KB Dubrava i KB Merkur po 2 bolesnika te OB Koprivnica i OB Sisak po jedan bolesnik. Većina liječnika je izrazila zadovoljstvo izgledom registra, te nije bilo većih primjedbi na sam rad u registru, pa se nadamo da će u skoroj budućnosti Krohemov registar u potpunosti zaživjeti, a u planu je i umreživanje s ostalim registrima Krohema.

Slika 1. Hrvatski pacijenti upisani u EUTOS CML registar



Slika 2. Pregled novodijagnosticiranih i upisanih bolesnika u EUTOS CML registar

	dijagnosticirani 36	upisani 26	nisu upisani 10
DUBRAVA	3	2	1
DUBROVNIK	1	1	0
MERKUR	4	4	0
OSIJEK	4	3	1
PULA	1	1	0
REBRO	6	6	0
RIJEKA	3	0	3
SISAK	1	1	0
SPLIT	5	2	3
SV DUH	1	1	0
ŠIBENIK	3	3	0
VARAŽDIN	1	0	1
VINOGRADSKA	1	1	0
ZADAR	2	1	1

Slika 3. Pregled upisanih bolesnika u Krohemov KML registar

USTANOVU	UPISANI
KBC Zagreb	24
KBC Split	13
OB Šibenik	10
OB Zadar	6
KBC Osijek	5
KBC Rijeka	4
KB Sestre Milosrdnice	4
KB Sveti Duh	4
OB Slavonski Brod	3
KB Dubrava	2
KB Merkur	2
OB Koprivnica	1
OB Sisak	1
OB Varaždin	0
OB Virovitica	0
OB Čakovec	0
OB Karlovac	0
OB Dubrovnik	0
UKUPNO	79

Paroksizmalna noćna hemoglobinurija

Zinaida Perić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: zina_peric@yahoo.com

Paroksizmalna noćna hemoglobinurija (PNH) je rijetka klonalna bolest krvotvorne matične stanice koja je stekla somatsku mutaciju u genu pig-A (1,2). Pig-A gen je nužan za sintezu glikozil-fosfati-dil-inozitola (GFI) koji veže mnoge proteine na stanici površinu, poput CD59 (membranski inhibitor reaktivne lize) i CD55 (faktor ubrzane razgradnje). Zbog nedostatka ovih proteina eritrociti u PNH podliježu intravaskularnoj hemolizi posredovanom komplementom, što rezultira kliničkom slikom anemije i hemoglobinurije, te otpuštanjem slobodnog hemoglobina u plazmi. Slobodni hemoglobin je izvor dušičnog monoksida koji se povezuje s čitavim spektrom dodatnih kliničkih manifestacija kao što su umor, bolovi u trbuhu, glavobolja, spazam jednjaka, erektilna disfunkcija, plućna hipertenzija i tromboza. Tromboza se javlja u do 40% pacijenata, najčešće zahvaća trbušne i moždane vene i vodeći je uzrok smrtnosti u ovoj bolesti (2-4). Uz hemolizu i trombozu, treća glavna klinička manifestacija je pancitopenija uzrokovana određenim stupnjem aplazije koštane srži.

Podjela koja objedinjuje raznolikost u kliničkim manifestacijama i tijeku ove bolesti dijeli PNH na 3 podtipa; klasičnu PNH, PNH u sklopu drugog poremećaja koštane srži, te subkliničku PNH (5). Klasična PNH ima jasne kliničke znakove hemolize (retikulocitozu, povišene vrijednosti LDH i indirektnog bilirubina u serumu te niske vrijednosti serumskog haptoglobina), a bez znakova drugih abnormalnosti koštane srži. Bolesnici s PNH u sklopu drugog poremećaja koštane srži imaju jasne kliničke i laboratorijske znakove hemolize, ali i istovremeno pronađenu ili otprije poznatu aplastičnu anemiju, mijelodisplastični sindrom (MDS) ili neku drugu mijelopatiju (kao npr. mijelofibrozu). Subklinička PNH se također pojavljuje u sklopu poremećaja koštane srži, najčešće aplastične anemije i refraktorne anemije - MDS-a, ali kod ovih bolesnika nisu prisutni znaci hemolize. Ipak, i kod ovih se bolesnika može pronaći mala populacija stanica s mutacijom kojoj nedostaju GFI vezani površinski proteini.

Protočna citometrija je metoda izbora za dijagnozu PNH, te se danas rutinski određuje prisustvo CD59 i CD55 na eritrocitima (5). Probir na PNH preporučljivo je učiniti kod bolesnika s izraženim znakovima Coombs negativne hemolize, kod bolesnika s trombozom na neuobičajenim mjestima, kod bolesnika s aplastičnom anemijom, te kod bolesnika s povremenom pojavom disfagije i bolova u abdomenu uz prisutne znakove hemolize (5). Još precizniju procjenu prisutnosti i postotka populacije PNH stanica pruža mogućnost određivanja nedostatka CD 59 i CD 55 na granulocitima, jer se oni ne razgrađuju hemolizom, te su neovisni o transfuziji eritrocita (6,7).

Anemija kod bolesnika s PNH je složenog porijekla, budući da često nastaje i zbog određenog stupnja aplazije koštane srži, pa hemoliza može biti samo dijelom uzrok anemije kod ovih bolesnika. Također, eritrociti kod bolesnika koji boluju od PNH su mosaik normalnih i promijenjenih stanica, a postotak stanica kojima nedostaju površinski proteini varira među bolesnicima (8,9). Osim toga, u PNH postoje 3 populacije eritrocita, one s potpunim nedostatkom GFI-vezanih površinskih proteina, one s djelomičnim nedostatkom, te normalne stanice (obično se nazivaju redom PNH III, PNH II i PNH I stanice) (9,10). Zbog svega navedenog, pri donošenju odluke od liječenju, važno je procijeniti koliko je anemija kod pojedinog bolesnika posljedica hemolize a koliko smanjene hematopoeze.

Tijek ove bolesti je raznolik, s medijanom preživljjenja od petnaest godina bez liječenja. U dijelu bolesnika s dovoljno dugim prirodnim tijekom bolesti opisivana je pojava spontane remisije, kao i leukemijske transformacije. (3)

Za PNH s kliničkom slikom hemolize, djelotvorna je terapija kortikosteroidima, posebice u tijeku hemolitičke krize (11-14). Kortikosteroidi djeluju putem inhibicije komplementa, kao i androgeni, koji se mogu davati samostalno ili u kombinaciji s kortikosteroidima (14). Često je potrebno i suportivno liječenje transfuzijama koncentrata eritrocita, koje može također ublažiti hemolizu, supresijom eritropoeze. Na isti način djeluje i nadoknada željeza, a preporuča se i nadoknada folata (11,15).

Ekulizumab je humano monoklonsko protutijelo koje inhibira aktivaciju terminalnog komplementa na C5 te tako blokira kako stvaranje anafilotsinske C5a, tako i kompleksa koji napada membranu C5b-9 (16). Na temelju dvije velike multicentrične kliničke

studije ekulizumab je 2008. odobren od Američke agencije za hranu i lijekove (eng. Food and Drug Administration - FDA) za liječenje PNH (17,18). U Hrvatskoj se ovaj lijek nalazi na listi posebno skupih lijekova. Ekulizumab smanjuje intravaskularnu hemolizu, smanjuje potrebu za transfuzijama koncentrata eritrocita, te značajno smanjuje rizik tromboze (19). Također, dosad objavljene studije opisuju značajno poboljšanje kvalitete života u bolesnika liječenih ekulizumabom (20-22), čak i kod bolesnika s nepromijenjenim vrijednostima ukupnog hemoglobina. Ove se spoznaje objašnjavaju smanjenjem hemolize, nestankom simptoma koji potječu od hemolize, te posljedičnim smanjenjem potrebe za transfuzijama.

Danas je ekulizumab lijek izbora kod bolesnika s klasičnom PNH, sa simptomima koji potječu od izražene intravaskularne hemolize, a koji se ne mogu kontrolirati transfuzijama eritrocita (razina preporuke IA) (23).

Bolesnici s trombozom u anamnezi trebaju doživotno uzimati antikoagulantnu terapiju. Neki autori

preporučuju profilaktičko antikoagulantno liječenje kod bolesnika kod kojih se pronađe više od 50% granulocita s manjkom površinskih proteina zbog vrlo visokog rizika razvoja tromboze u takvih bolesnika (24).

Kod bolesnika s nefhemolitičkom anemijom koja je posljedica aplazije koštane srži, liječenje se započinje imunosupresivnom terapijom ciklosporinom ili antitimocitnim globulinom. Alogenična transplantacija i dalje predstavlja jedinu terapiju izlječenja za ove bolesnike, a to je postupak povezan s visokom stopom morbiditeta i mortaliteta. Studije koje su kao terapiju pripreme za alogeničnu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica koristile kondicioniranje reduciranih inteziteta (RIC, prema engl. reduced-intensity conditioning) su pokazale da mijeloablativni pristup nije nužan za eradijaciju PNH klona (25-31). Zato je za mlađe bolesnike s PNH, koji u kliničkoj slici imaju tešku pancitopeniju, osobito ako u obitelji imaju srodnog davatelja krvotvornih matičnih stanica, optimalna terapijska mogućnost RIC alogenična transplantacija. (32)

Literatura:

1. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the physiology of complement-related hemolytic anemia. *Ann Intern Med.* 2008;148:587-595.
2. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol.* 2004;126:133-138.
3. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 1995;333:1253-1258.
4. Socie' G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, i sur. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: longterm follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet.* 1996;348:573-577.
5. Charles Parker, Mitsuhiro Omine, Stephen Richards, Jun-ichi Nishimura, Monica Bessler, Russell Ware, i sur. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005; 106: 3699-3709.
6. Rosse WF. The life-span of complement-sensitive and -insensitive red cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1971;37:556-562.
7. Brubaker LH, Essig LJ, Mengel CE. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1977;50:657-662.
8. Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria—present status and future prospects. *West J Med.* 1980;132:219-228.
9. Endo M, Ware RE, Vreeke TM, Singh SP, Howard TA, Tomita A, i sur. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1996;87:2546-2557.
10. Holguin MH, Wilcox LA, Bernshaw NJ, Rosse WF, Parker CJ. Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest.* 1989;84:1387-1394.
11. Rosse WF. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1982;60:20-23.
12. Zhao M, Shao Z, Li K, i sur. Clinical analysis of 78 cases of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria diagnosed in the past ten years. *Chin Med J (Engl).* 2002;115:398-401.
13. Bourantas K. High-dose recombinant human erythropoietin and low-dose corticosteroids for treatment of anemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Acta Haematol.* 1994;91:62-65.
14. Issaragrisil S, Piankijagum A, Tang-nairisora Y. Corticosteroids therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol.* 1987;25:77-83.
15. Hartmann RC, Jenkins DE Jr, McKee LC, Heyssel RM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine (Baltimore).* 1966;45:331-363.
16. Rother RP, Rollins SA, Mojcić CF, Brodsky RA, Bell L. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol.* 2007;25:1256-1264.
17. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie' G, Muus P, i sur. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 2006;355:1233-1243.
18. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrenzenmeier H, Schubert J, i sur. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2008;111:1840-1847.
19. Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, i sur. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2007;110:4123-4128.
20. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, i sur. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 2004;350:552-559.
21. Hill A, Elebute M, Marsh JC, Richards SJ, McNutt B, Petro BE, i sur. Sustained control of hemolysis and symptoms and reduced transfusion requirements over a period of 2 years in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with eculizumabtherapy (Abstract) *Blood.* 2004;104, 772a.

22. Hill A, Rother RP, Hillmen P. Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2005; 90(11):111-113.
23. Haspel RL, Hillmen P. Which patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) should be treated with eculizumab? ASH evidence-based review 2008. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:35.
24. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2003;102:3587-3591.
25. Saso R, Marsh J, Cevreska L, Szer J, Gale RP, Rowlings PA, i sur. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 1999;104(2):392-396.
26. Antin JH, Ginsburg D, Smith BR, Nathan DG, Orkin SH, Rappeport JM. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment. *Blood*. 1985;66(6):1247-1250.
27. Cho SG, Lim J, Kim Y, Eom HS, Jin CY, Han CW, Kim CC. Conditioning with high-dose cyclophosphamide may not be sufficient to provide a long-term remission of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria following syngeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28(10):987-988.
28. Suenaga K, Kanda Y, Niiya H, Nakai K, Saito T, Saito A, i sur. Successful application of nonmyeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol*. 2001;29(5):639-642.
29. Brodsky RA, Luznik L, Bolaños-Meade J, Leffell MS, Jones RJ, Fuchs EJ. Reduced intensity HLA-haploididentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in non-malignant hematologic diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42(8):523-527.
30. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, i sur. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008;112(8):3099-3106.
31. Santarone S, Bacigalupo A, Risitano AM, Tagliaferri E, Di Bartolomeo E, Iori AP, i sur. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*. 2010;95:993-998.
32. Brodsky A. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2010; 95(6):855-856.

Radna skupina za laboratorijsku hematologiju i morfologiju STANDARDNI PRISTUP LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI AKUTNIH LEUKEMIJA

**Drago Batinić, Ika Kardum-Skelin,
Ružica Lasan Trčić, Sanja Davidović, Renata Zadro**

Za Pododbor za laboratorijsku hematologiju i morfologiju:
prof. dr. sc. Drago Batinić i prof. dr. sc. Renata Zadro, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb;
doc. dr. sc. Ika Kardum-Skelin, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, Klinička bolnica Merkur, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;
mr. sc. Ružica Lasan Trčić i mr. sc. Sanja Davidović, Klinika za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb.

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Drago Batinić, dr. med.
 Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
 Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu KBC Zagreb
 E-pošta: drago.batinic@zg.t-com.hr

Na zadnjem sastanku Krohema (Vodice, 06. 11. 2010.) u okviru sekcije „Akutne leukemije“ prezentiran je i od svih nazočnih članova Krohema prihvaćen „Postupnik laboratorijske dijagnostike akutnih leukemija“. Izvjestitelji postupnika bili su Ika Kardum-Skelin, Ružica Lasan Trčić, Renata Zadro i Drago Batinić.

Budući da je u tijeku priprema članka pod nazivom „Postupnik dijagnostike akutnih leukemija“

čije je objavlјivanje predviđeno u nacionalnom liječničkom glasilu (Liječničkom vjesniku), to ćemo na ovom mjestu istaknuti samo uporišta suvremene dijagnostike akutnih leukemija.

Nova razdioba Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine povezuje genetske promjene leukemijskih stanica i kliničku sliku s citomorfološkim i imunofenotipskim značajkama leukemijskih stanica. Ključna ideja nove razdiobe AL jest prepoznati bolest(i) temeljem **prognostičkih** pokazatelja, što je izuzetno važno s kliničkog stajališta vođenja i liječenja bolesnika. Drugim riječima, suvremeni pristup dijagnostici akutnih leukemija polazi od medicinskih pokazatelja koji se temelje na činjenicima, uvažava dijagnostičke pristupe i postupke koji se rutinski primjenjuju u medicinskoj praksi i koji zadovoljavaju minimalne kriterije dijagnostike.

Citomorfologija je temeljna dijagnostička metoda kojom se postavlja dijagnoza akutne leukemije i indiciraju smjernice za odabir dodatnih metoda analize leukemijskih stanica na citološkim razmazima (citokemija i imunocitokemija, određivanje biljega proliferacije). Uzorci za citomorfološko ispitivanje su koštana srž, periferna krv, likvor, maligni izljev i tkivo limfnog čvora.

Imunofenotipizacija je dijagnostička metoda kojom se prema SZO utvrđuje podrijetlo, odnosno

loza leukemijskih stanica (mijeloidna vs. B-limfoidna vs. T-limfoidna), otkrivaju i potvrđuju neki oblici AL (npr. AML-M0, AML-M7 i leukemije nejasnog/mješovitog podrijetla) te otkrivaju imunofenotipske aberacije važne za praćenja minimalne ostatne bolesti (MOB). Uzorci za imunofenotipsku analizu su koštana srž, periferna krv, likvor, maligni izljev i tkivo limfnog čvora.

Citogenetičke analize (konvencionalna citogenetika i molekularna citogenetika) su, prema SZO, ključne za prepoznavanje prognostički relevantnih skupina akutnih leukemija. Uzorci za ispitivanje su koštana srž, periferna krv, likvor, maligni izljev i tkivo limfnog čvora.

Molekularna dijagnostika je dijagnostička metoda kojom se određuju promjene genoma leukemijskih stanica u vidu mutacija ili preuredbi gena. Pri tome se koriste metode molekularne biologije kao što je lančana reakcija polimeraze (PCR). Kao i citogenetika, molekularna analiza je važna za prepoznavanje relevantnih prognostičkih skupina akutnih leukemija i praćenje minimalne ostatne bolesti. Uzorci za ispitivanje su koštana srž, periferna krv, likvor, maligni izljev i tkivo limfnog čvora.

Dijagnostički postupnik

Dijagnostički postupnik definira sve postupke i aktivnosti, kao i slijed njihova izvođenja. Prema SZO, postupnik prepostavlja primjenu hematoloških pretraga, citomorfologije s citokemijom i imunocitokemiju (Tablica 1.), imunofenotipizacije protočnom citometrijom (Tablica 2.), klasične i molekularne citogenetike (Tablica 3.) i molekularnih tehnika (Tablica 4.). Radi se o detaljnem protokolu za uzimanje, pripremu i analizu preparata za svaku laboratorijsku metodu, uključujući i detaljan opis analitičkih postupaka, opreme i reagencija, kao i kriterija za interpretaciju rezultata.

Dijagnostički postupnik također definira i vremenske točke uzimanja uzoraka:

- pri dijagnozi
- za procjenu terapijskog uspjeha
- pri sumnji na relaps bolesti

Referentni centri

Za našu zajednicu je izuzetno važno definirati referentne centre za pojedinu dijagnostičku metodu, kao i dijagnostičku razinu do koje pojedina zdravstvena ustanova u Republici Hrvatskoj može samostalno obavljati određenu pretragu. Stoga u nastavku predlažemo sljedeće referentne centre za laboratorijsku dijagnostiku akutnih leukemija.

Referentni centar za citomorfologiju: do dalnjeg će funkciju referentnog centra preuzeti radna skupina za citomorfologiju u sastavu: Karđum-Skelin Ika (KB Merkur, Zagreb), Sučić Mirna (KB Sveti Duh, Zagreb), Ries Sunčica (KBC Zagreb), Gjadrov Kuveždić Koraljka (KBC Zagreb), Kaić Gordana (KB Dubrava, Zagreb), Štoos-Veić Tajana (KB Dubrava, Zagreb), Jelić Puškarić Biljana (KB Merkur, Zagreb), Seili-Bekafigo Irena (KBC Rijeka), Šundov Dinka (KBC Split) i Lončar Branka (KBC Osijek). U tijeku je revizija do sada dijagnosticiranih akutnih leukemija (pilot projekt) uz usaglašavanje citomorfoloških kriterija na zajedničkim sastancima uz mikroskop.

Referentni centar za imunofenotipizaciju: KBC Zagreb (Rebro) jest referentni centar za sve centre u RH koji nemaju vlastite dijagnostičke kapacitete, dok neki centri (KB Merkur, Zagreb i KB Dubrava, Zagreb) imaju vlastite kapacitete. Međutim, suradnja između navedenih centara je dobrodošla, posebice u kontekstu budućih projekata Krohema koji zahtijevaju uniformni dijagnostički pristup. Drugim riječima, potrebno je definirati panele koje te ustanove rade samostalno, a koje bi dodatne analize eventualno tražile od referentnog centra.

Referentni centar za citogenetiku: KBC Zagreb (Rebro) jest referentni centar za većinu hematoloških centara u RH.

Referentni centar za molekularnu dijagnostiku: KBC Zagreb (Rebro) jest referentni centar za većinu hematoloških centara u RH; neke ustanove (kao npr. KB Merkur, KB Dubrava, KBC Split i KBC Rijeka) imaju vlastite kapacitete, ali je potrebno definirati do koje mjere te ustanove samostalno rade određene analize, a koje se šalju u referentni centar.

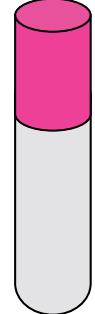
PRILOZI:

Tablica 1. Dijagnostički postupnik za citološke uzorke koji se upućuju u referentni centar.

VRIJEME	UZORAK		
	KOŠTANA SRŽ	PERIFERNA KRV	LIMFNI ČVOR
DIJAGNOZA	1 obojeno stakalce po MGG* + 6 neobojenih	1 obojeno stakalce po MGG + 3 neobojena	1 obojeno stakalce po MGG
REMISIJA	1 obojeno stakalce po MGG + 2 neobojena	1 obojeno stakalce po MGG + 1 neobojeno	
RELAPS	1 obojeno stakalce po MGG + 6 neobojenih	1 obojeno stakalce po MGG + 3 neobojena	1 obojeno stakalce po MGG

* ukoliko se u citološkoj jedinici radi citokemijska i imunocitokemijska analiza, u referentni centar se mogu poslati i citokemijski obrađeni uzorci koštane srži

Tablica 2. Dijagnostički postupnik za uzorke koji se u referentni centar upućuju na imunofenotipizaciju.

 Lavender				
STANDARDNI UZORCI	koštana srž	>0,5 mL u sterilni vacutainer s EDTA		
	periferna krv	>5,0 mL u sterilni vacutainer s EDTA		
UZORCI PREMA POTREBI	maligni izljev i likvor	>1 mL u sterilni vacutainer s EDTA		
	punktat ili bioptat čvora	sterilni vacutainer s EDTA i 1 mL medija RPMI1640		
Dostava materijala u referentni centar				
<ul style="list-style-type: none"> ambijentalna temperatura, ljeti na +4°C materijal treba stići unutar 24 sata od uzimanja 				

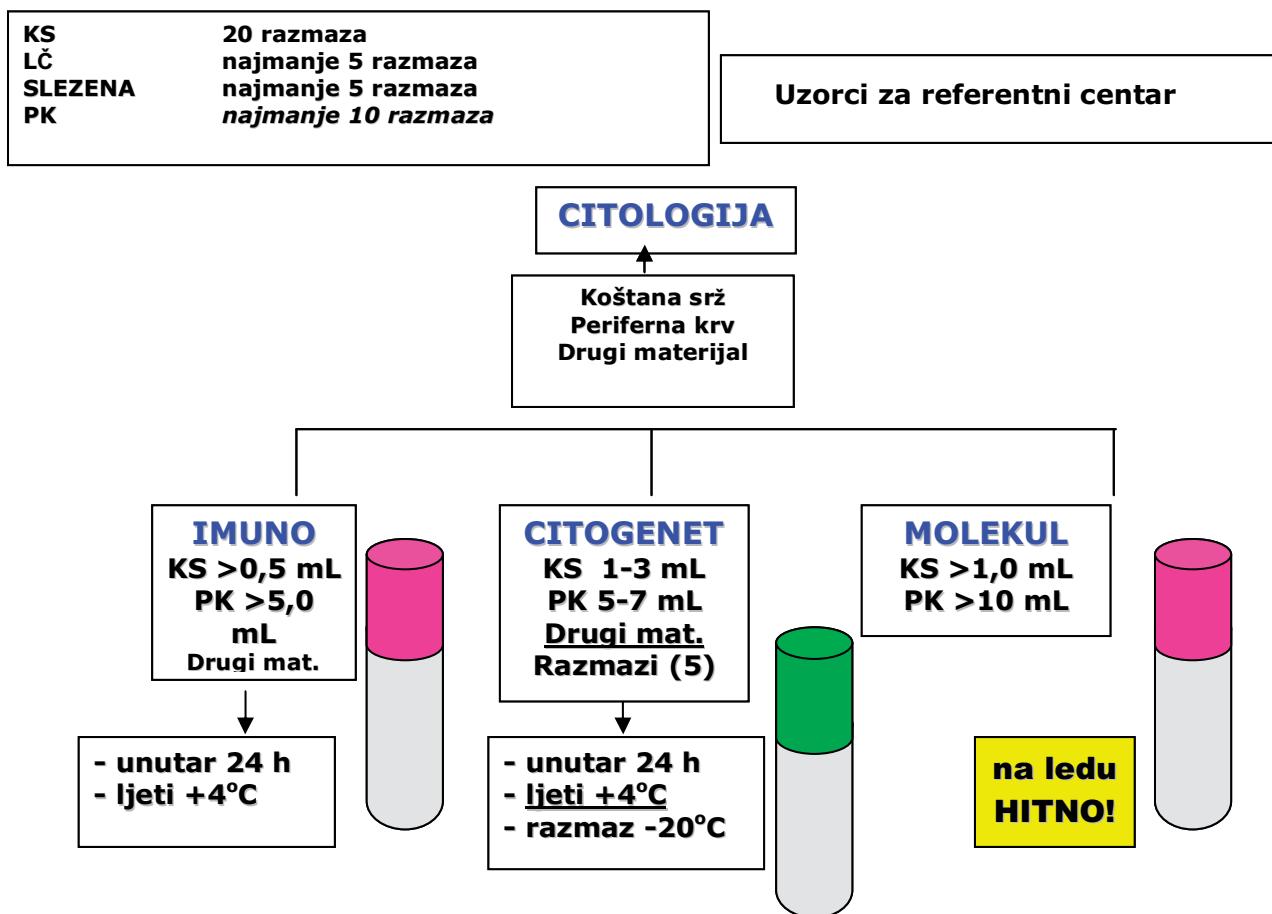
Tablica 3. Dijagnostički postupnik za uzorke koji se u referentni centar upućuju na citogenetičke analize.

 Green						
UZORCI	koštana srž	1-3 mL, vacutainer s litij-heparinom				
	periferna krv	5-7 mL, vacutainer s litij-heparinom				
	punktat ili bioptat čvora	u vacutainer litij-heparinom i 2 mL medija RPMI1640				
	razmazi (PK/KS)	najamanje 5 stakalca				
METODE	klasične tehnike pruganja (G-pruganje)					
	FISH					
Dostava materijala u referentni centar						
<ul style="list-style-type: none"> • za sve osim razmaza <ul style="list-style-type: none"> – transport na ambijentalnoj temperaturi – ljeti na +4°C • materijal treba stići unutar 24 sata od uzimanja • razmazi – čuvati na -20°C do transporta 						

Tablica 4. Dijagnostički postupnik za uzorke koji se u referentni centar upućuju na molekularne analize.

 Lavender						
UZORCI	koštana srž	1 mL, vacutainer s EDTA				
	periferna krv	10 mL, vacutainer s EDTA				
STERILNOST!						
METODE	kvalitativni PCR					
	kvantitativni PCR					
Dostava materijala u referentni centar						
<ul style="list-style-type: none"> • pohraniti na led i ODMAH dostaviti u laboratorij (na ledu!) 						

Tablica 5. Zbirni prikaz postupaka za uzimanje i slanje biološkog materijala za dijagnostiku i praćenje akutnih leukemija.



Fotografije iz Vodica i Šibenika sa sastanka Krohema u studenom 2010.

Dubravka Sertić, dr. med.



