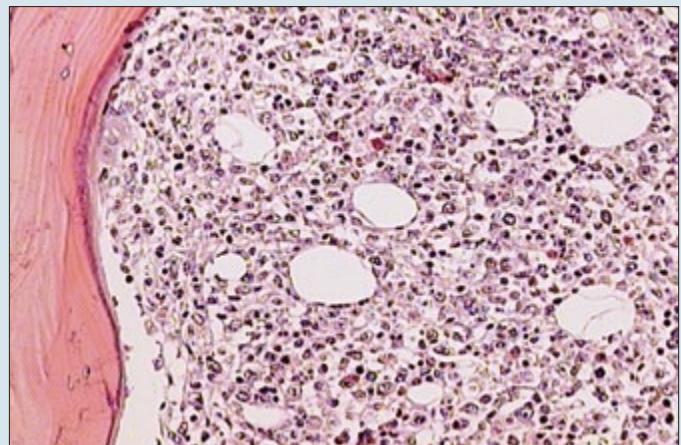
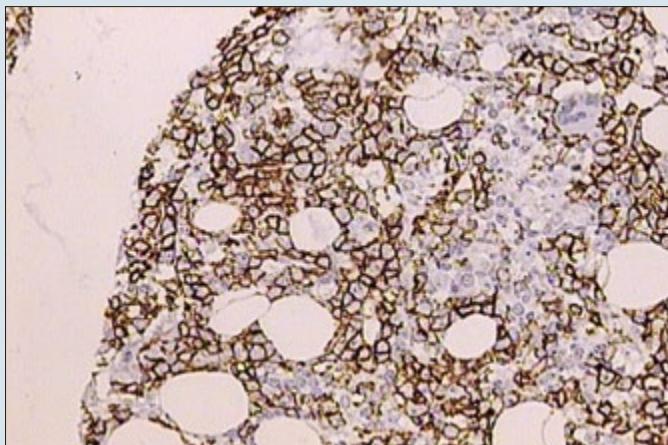
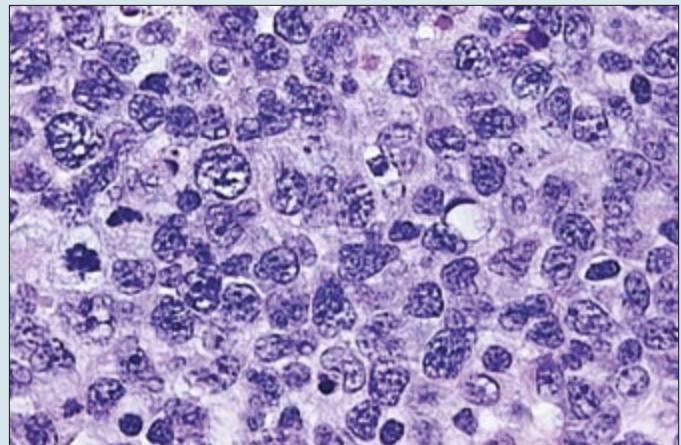
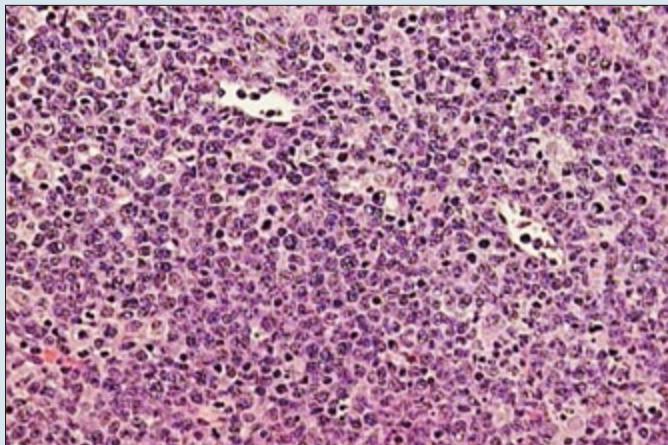


Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem



Volumen 3., Broj 2.

KroHem

Impresum

Bilten Krohema
Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem
Volumen 3., Broj 2., Listopad 2011.

Nakladnik:
Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti Krohem

Za nakladnika:
Boris Labar

Glavni urednik:
Dražen Pulanić

Tajnica Krohema:
Dijana Perčin

Autori tekstova:

Radmila Ajduković-Stojisavljević
Gorana Aralica
Igor Aurer
Emina Babarović
Renata Babok-Flegarić
Sandra Bašić-Kinda
Drago Batinić
Božena Coha
Dubravka Čaržavec
Elizabeta Čorović
Sanja Davidović
Mara Dominis
Antica Duletić-Načinović
Nadira Duraković
Slavko Gašparov
Blaženka Grahovac
Njetočka Gredelj Šimec
Velka Gverić-Krečak

Ivana Ilić
Davor Ivanković
Branimir Jakšić
Ozren Jakšić
Nives Jonjić
Bernard Kaić
Mirjana Mariana Kardum Paro
Miljenko Katunarić
Petra Korać
Marin Kursar
Rajko Kušec
Boris Labar
Ružica Lasan Trčić
Ksenija Lučin
Inga Mandac Rogulj
Mirta Mikulić
Zlatka Nemet-Lojan
Vlatko Pejša

Jasminka Petričević-Sinčić
Dražen Pulanić
Delfa Radić Krišto
Jelena Roganović
Irena Seili Bekafigo
Dubravka Sertić
Ranka Serventi-Seiwerth
Petar Šenjug
Ljubica Škare-Librenjak
Anita Škrtić
Sanja Štifter
Tajana Štoos Veić
Čedna Tomasović-Lončarić
Toni Valković
Adriana Vince
Radovan Vrhovac
Renata Zadro
Gordana Zamolo

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 slika na naslovcini:

Slika gore lijevo: limfni čvor zahvaćen agresivnim B-NHL, neklasificiranim s obilježjima između DLBCL i Burkittovog
limfoma (tzv.”double hit” limfom c-myc+, Bcl2+); hemalaun-eozin (HE), povećanje 200x.

Slika gore desno: isti tumor; HE, povećanje 630x.

Slika dolje lijevo: koštana srž infiltrirana istim agresivnim B-NHL; imunohistokemija CD20, povećanje 200x.

Slika dolje desno: koštana srž infiltrirana istim agresivnim B-NHL; HE, povećanje 200x.

Ustupljeno i priređeno ljubaznošću **dr. Snježane Dotlić**, Klinički zavod za patologiju i citologiju KBC Zagreb.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| B. Labar: | |
| Uvodnik | 3 |
| I. Aurer za limfomsku podskupinu Krohema: | |
| Novi standardi u liječenju limfoma plaštene zone | 4 |
| A. Duletić-Načinović: | |
| Održavanje rituksimabom u bolesnika s indolentnim limfomom | 5 |
| I. Mandac Rogulj: | |
| Brentuximab vedotin – novi terapijski pristup u liječenju limfoma | 7 |
| S. Bašić-Kinda: | |
| Eskalirani BEACOPP u uznapredovalom stadiju Hodgkinovog limfoma | 10 |
| M. Katunarić, B. Grahovac, G. Zamolo, N. Jonjić: | |
| Klonalnost u dijagnostici B i T limfoma | 11 |
| O. Jakšić, B. Coha, V. Gverić-Krečak, M. Kursar, P. Šenjug, V. Pejša: | |
| Istraživanje progresije/evolucije B-KLL KROHEM KLL-01 – stanje 05/2011 | 16 |
| N. Duraković, B. Labar: | |
| Liječenje akutne mijeloične leukemije (AML) temeljem prognostičkih pokazatelja: multicentrična opservacijska studija s definiranim načelima liječenja AML temeljem prognostičkih pokazatelja rizika | 18 |
| R. Serventi-Seiwerth: | |
| Alogenična transplantacija u bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom | 22 |
| D. Čaržavec, B. Labar, B. Jakšić, Lj. Škare-Librenjak, A. Duletić-Načinović, J. Petričević-Sinčić, B. Coha, V. Gverić-Krečak, E. Čorović, Z. Nemet-Lojan, R. Babok-Flegarić, T. Štoos Veić, R. Kušec: | |
| Policitemija vera - konačni prijedlog dijagnostičkih i terapijskih smjernica te kriterija odgovora na liječenje | 26 |
| B. Labar, D. Sertić, S. Davidović, R. Zadro, R. Lasan Trčić, R. Kušec, B. Jakšić, Lj. Škare-Librenjak, A. Duletić-Načinović, J. Petričević-Sinčić, D. Čaržavec, V. Gverić-Krečak, B. Coha, E. Čorović, Z. Nemet-Lojan, R. Babok-Flegarić: | |
| Dijagnostičko terapijski pristup u bolesnika s Philadelphia pozitivnom kroničnom mijeloičnom leukemijom Smjernice Hrvatske kooperativne grupe za hematoloških bolesti –KROHEM | 29 |
| D. Sertić: | |
| Hrvatski registar za kroničnu mijeloičnu leukemiju kao dio EUTOS regista ELN | 43 |
| D. Pulanić, V. Gverić-Krečak: | |
| Praćenje učestalosti venskih tromboembolijskih bolesti – preliminarni rezultati | 45 |
| Nj. Gredelj Šimec: | |
| Značaj prevencije i liječenja mučnine i povraćanja uzrokovane antitumorskim lijekovima i postupcima | 47 |

| | |
|---|----|
| T. Valković, M. Mikulić, J. Roganović, A. Vince, B. Kaić, R. Vrhovac: | |
| Krohem: preporuke o cijepljenju bolesnika sa zločudnim hematološkim bolestima | 49 |
| J. Roganović: | |
| Cijepljenje djece s malignim bolestima | 52 |
| | |
| Simpozij „Marin Nola“ | |
| I. Ilić: | |
| Morfološki i klinički aspekti in situ limfoma | 55 |
| M. M. Kardum-Paro, S. Gašparov, P. Korać, M. Dominis: | |
| Procjena klonalnosti non-Hodgkin limfoma..... | 57 |
| T. Štoos-Veić, Č. Tomasović-Lončarić, G. Aralica: | |
| Morfologija u dijagnostici kroničnih Philadelphia negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi | 60 |
| A. Škrtić, P. Korać, D. Radić Krišto, R. Ajduković-Stojisavljević, D. Ivanković, M. Dominis: | |
| Izraženost proteina NOTCH1 i JAGGED1 u monoklonalnoj gamapatiji neodređenog značenja i multiplom mijelomu | 63 |
| E. Babarović, T. Valković, S. Štifter, I. Seili Bekafigo, A. Duletić Načinović, K. Lučin, N. Jonjić: | |
| Mikrookoliš koštane srži u mijelomagenezi | 64 |
| | |
| D. Sertić: | |
| Fotografije iz Tuheljskih Toplica sa sastanka Krohema u svibnju 2011..... | 67 |
| D. Pulanić: | |
| Tri godine, šest brojeva, 110 članaka i 308 stranica Biltena Krohema | 68 |

Uvodnik

Drago mi je, prije novog sastanka u Puli ukratko sažeti naše dosadašnje aktivnosti. Ponajprije naša je aktivnost bila usmjereni na ustrojstvo Centralnog registra KROHEM-a. Kako bi Registar zaživio načinili smo nekoliko iznimno važnih predradnji. Dogovorili smo i Ugovorom zacrtali suradnju između Vams Tec-a i KROHEM-a. Za potrebe Registra primili smo dva informatičara koji bi sljedećih dana i mjeseci trebali uspostaviti vezu i unos podataka hematoloških bolesnika u Registar. Nadalje Registar kreće unatoč još uvijek prisutnih nedorečenosti koje ćemo rješavati u hodu. Nadam se da ćemo u Puli već moći raspraviti njegovo značenje i njegovu veliku potencijalnu vrijednost.

Uz već postojeće radne skupine želja nam je da pokrijemo sva područja i sve hematološke bolesti od dijagnostike i terapijskih postupnika. Većina radnih skupina trenutno je upravo u izradi smjernica i postupnika dijagnostike i liječenja, što je iznimno vrijedan projekt. Kreće prospektivna studija AML-KRO1, elektronička lista za praćenje bolesnika je gotova. Dogovor je da sve bolesnike od 01.10.2011. upisujemo u elektronički obrazac.

Treba naglasiti da su naše akcije još uvijek pomalo kampanjske; aktivnost je značajno veća pred sastanke KROHEM-a; nema potrebnog kontinuiteta u radu tijekom cijele godine. Ovo nije kritika. Kampanjski pristup radu može se opravdati mnogim objektivnim razlozima. No upravo zato smatram potrebnim održavati sastanke KROHEM-a najmanje dva puta godišnje, pri čemu svaka radna skupina unatoč kratkom vremenu treba prikazati aktivnosti i buduće planove. Tako smo zajedno i imamo kontinuitet najvažnijih informacija.

KROHEM je pobudio interes u mnogih kolega iz susjednih zemalja, koji žele sudjelovati u njegovu radu. Za sada je naš stav da su naši stručni sastanci i aktivnosti otvoreni za stručnu javnost i svatko tko želi sudjelovati može se priključiti. Jasno za sada nismo smatrali važnim definirati status naših gostiju i kolega, ali vjerujem da ćemo vrlo brzo biti u prilici, ne samo prepoznati status već i vrlo konkretno odrediti modalitete suradnje, kako s pojedincima, tako i sa sličnim strukovnim udrugama iz inozemstva. Primjer takve suradnje je inicijativa prof. Gilesa iz Irske za izradu zajedničkog Registra i praćenja Ph negativnih kroničnih mijeloproliferativnih bolesti.

Na zadnjem sastanku upravnog odbora KROHEM-a osnovana je i radna skupina za liječenje transplantacijom krvotvornih matičnih stanica. Broj kliničkih centara koje provode liječenje transplantacijom se povećava. Potreba za smjernicama i postupnicima liječenja alogenom i autolognom transplantacijom nije samo potreba onih koji liječe već i onih koji upućuju bolesnike na liječenje. To su bili razlozi koji su nas naveli da predložimo i ovu radnu skupinu.

Studija o učestalosti venskih tromboza i embolija čini se da je pun pogodak. Ne samo što pojedini centri vrlo ažurno referiraju bolesnike već su i prisutni zahtjevi novih centara koji se žele uključiti u studiju.

Naša je želja biti što djelotvorniji i konkretniji, uključiti što veći broj kolega u svakodnevni rad KROHEM-a. Vjerujem da će tako upravo KROHEM postati „stručna i znanstvena savjest“ hematologije u Hrvatskoj.

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

Novi standardi u liječenju limfoma plaštene zone

Prof. dr. sc. Igor Aurer, dr. med., za limfomsku podskupinu Krohema
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinički bolnički centar Zagreb
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: iaurer@kbc-zagreb.hr

Prošlog listopada su na godišnjem sastanku Europske mreže za limfome plaštene zone (European Mantle-Cell Lymphoma Network) održanog u Varšavi prikazani rezultati dvaju velikih kliničkih istraživanja koje je sponzorirala ova organizacija. Ti su rezultati potom prikazani na kongresima Američkog hematološkog društva (1), Europskog hematološkog društva (2) i na Međunarodnom kongresu o zločudnim limfomima održanom u Lugu (3).

Prvo istraživanje je provedeno u bolesnika mlađih od 60 godina koji su randomizirani između uvodne terapije po R-CHOP shemi i onih koji su primali naizmjenično R-CHOP i R-DHAP. Bolesnici koji su nakon terapije postigli najmanje parcijalnu remisiju su potom liječeni transplantacijom autolognih matičnih krvotvornih stanica. Rezultati istraživanja su pokazali da, iako je udio bolesnika koji odgovore na uvodnu terapiju podjednak, bolesnici liječeni R-CHOP/R-DHAP kombinacijom imaju značajno bolje preživljavanje bez progresije bolesti.

Druge istraživanje je provedeno u bolesnika starijih od 60 godina. Oni su randomizirani između uvodne terapije po R-CHOP i R-FC shemi. Potom su bolesnici, koji su postigli najmanje parcijalnu remisiju, randomizirani između terapije održavanja rituksimabom i terapije održavanja interferonom. Rezultati su pokazali da je udio bolesnika koji odgovore na uvodnu terapiju značajno veći u skupini bolesnika liječenih R-CHOP-om te da je ukupno preživljavanje bolje u skupini liječenoj uvodnom terapijom R-CHOP i terapijom održavanja rituksimabom.

Na temelju navedenih rezultata je Krohem prihvatio sljedeće promjene u Hrvatskom konsenzusu o liječenju limfoma:

1.Bolesnike s limfomom plaštene zone, mlađe od 65 godina, bez značajnijeg komorbiditeta, treba u prvoj liniji uvodne terapije liječiti protokolima koji sadrže rituksimab i visoke doze citarabina. Preporučuje se da to bude 6 (3+3) ciklusa R-CHOP/R-DHAP kombinacije. One koji postignu remisiju treba auto-transplantirati u 1. remisiji.

2.Bolesnike s limfomom plaštene zone starije od 65 godina ili koji zbog komorbiditeta ne mogu biti autotransplantirani, treba liječiti uvodnom terapijom po R-CHOP shemi ili slično, a nakon postizanja remisije terapijom održavanja rituksimabom, najmanje svaka 3 mjeseca tijekom 2 godine.

Krohem je svjestan činjenice da rituksimab nije registriran za terapiju održavanja u bolesnika s limfomom plaštene zone, no, obzirom da ovakav pristup povećava preživljavanje, smatra da se ne smije čekati na završetak administrativnog postupka da bi se promijenila klinička praksa.

Literatura:

1. Hermine O i sur. Alternating courses of 3x CHOP and 3x DHAP plus rituximab followed by a high dose ARA-C containing myeloablative regimen and autologous stem cell transplantation (ASCT) is superior to 6 courses CHOP plus rituximab followed by myeloblastic radiochemotherapy and ASCT in mantle cell lymphoma: results of the MCL younger trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net). Blood. 2010; 116: 54a.
2. Kluin-Nelemans J i sur. Rituximab maintenance significantly prolongs duration of remission in elderly patients with mantle cell lymphoma. First results of a randomized trial of the European MCL network. Haematologica. 2011; 96 (suppl.2):213.
3. Kluin-Nelemans JC i sur. R-CHOP versus R-FC followed by maintenance with rituximab or IFN: first results of a randomized trial for elderly patients with mantle cell lymphoma. Ann Oncol. 2011; 22 (suppl.4):iv86.

Održavanje rituksimabom u bolesnika s indolentnim limfomom

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

Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju

Klinički bolnički centar Rijeka i Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

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

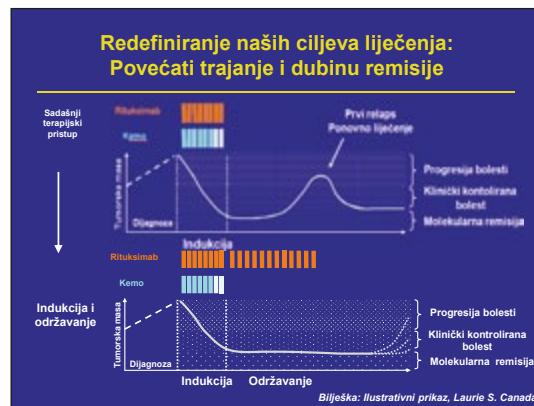
Folikularni limfom (FL) kao najčešći oblik indolentnih limfoma je neizlječiv uz standardnu terapiju. Standardna prva linija liječenja simptomatskih folikularnih limfoma je kemoterapija (COP, CHOP, fludarabin, klorambucil). Uključivanjem anti-CD20 protutijela (rituksimaba) prethodno navedenoj kemoterapiji potvrđen je značajno bolji terapijski odgovor, trajanje odgovora, preživljjenje bez progresije i ukupno preživljjenje, što je potvrđeno u više randomiziranih studija (1-3). Nažalost, bolesnici su i nakon imunkemoterapije skloni relapsu, iako su potvrđeni kasniji relapsi u odnosu na ranije liječenje samo kemoterapijom. Remisije su sve kraće kako raste broj terapijskih linija (4).

Terapija održavanja rituksimabom u indolentnih limfoma i terapija održavanja nakon relapsa

Ciljevi terapije održavanja su:

- poboljšati opseg odgovora (PR → CR)
- održati stecenu remisiju i odgoditi progresiju bolesti
- prodljiti interval do sljedeće terapije
- eradicirati minimalnu rezidualnu bolest (MRD) i tako potencijalno povećati ukupno preživljjenje (Slika 1.).

Prepostavlja se da se opravdanost terapije održavanja rituksimabom bazira na: kontroli preostalih malignih stanica i poboljšanju preživljjenja (izlječenje se smatra gotovo nemogućim u indolentnim NHL; odgoditi sljedeću terapiju što je moguće više), minimalnom remećenju svakodnevnog života (dobra dugoročna sigurnost, minimalne akutne nuspojave, prikladnost primjene). Terapija održavanja može „produbiti“ odgovor i prodljiti remisiju. Kvaliteta odgovora pretkazuje ukupno preživljjenje (5). Za bolesnike u parcijalnoj remisiji (PR), cilj održavanja je prevođenje u kompletну remisiju (CR). Za bolesnike u CR, cilj održavanja je zadržavanje i „produbljenje“ remisije (Slika 1.).



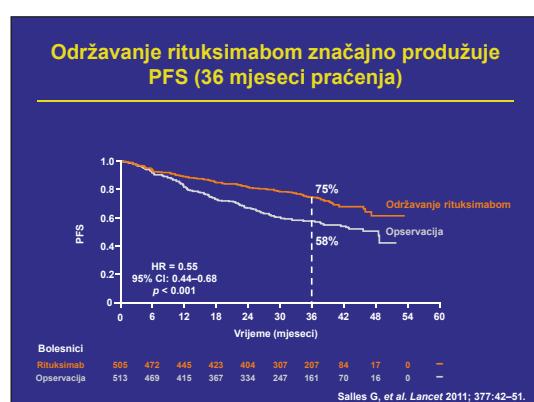
Slika 1.

Prva linija terapije pruža najbolju mogućnost produljenja remisije, dužeg preživljjenja i mogućeg zaliječenja. Potvrđeno je da imunološki posredovane reakcije rituksimaba (npr. ADCC - stanična citotoksičnost posredovana protutijelima) mogu biti još učinkovitije u periodu kada se kemoterapija ne primjenjuje (6). Uz to rituksimab ima dugi poluživot. Sadašnji ciljevi u liječenju indolentnih limfoma prikazani su na Slici 2.



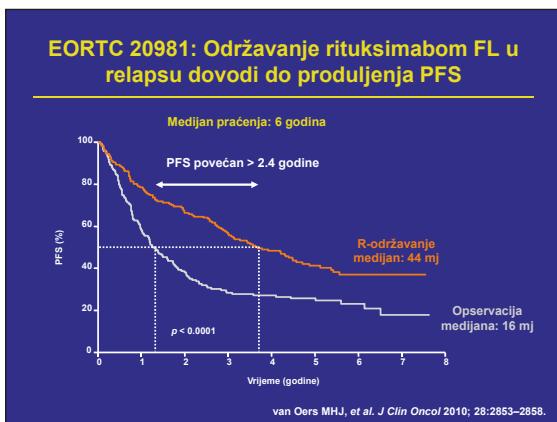
Slika 2.

Rezultati PRIMA studije potvrđuju da održavanje rituksimabom značajno produžuje preživljjenje bez progresije (medijan praćenja 36 mjeseci) u bolesnika s novodijagnosticiranim folikularnim limfomom (Slika 3.).



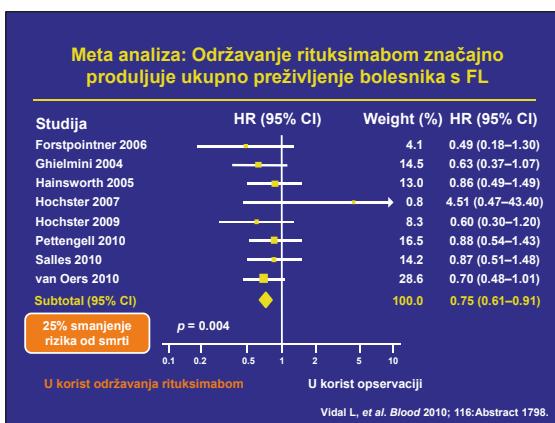
Slika 3.

Studija EORTC 20981 potvrdila je da održavanje rituksimabom u bolesnika s relapsom/rezistentnim folikularnim limfomom dovodi do produljenja preživljjenja bez progresije u odnosu na bolesnike koji su bili na opservaciji (medijan 3,7 godina: 1,3 godine; $P<0.001$) i to u obje skupine onih bolesnika koji su u indukciji primali CHOP ili R-CHOP ($P<0.003$) (Slika 4).



Slika 4.

Petogodišnje ukupno preživljjenje iznosi 74% u bolesnika koji su bili na održavanju rituksimabu, dok je u bolesnika na opservaciji ono 64% ($P<0.07$) (7). Slikom 5. prikazani su rezultati meta analize koji potvrđuju da je održavanje rituksimabom značajno produljilo ukupno preživljjenje bolesnika s FL.



Slika 5.

Zaključci:

Era rituksimaba rezultirala je produljenjem preživljjenja bolesnika s FL.

Održavanje rituksimabom aktivno „štiti“ i produljuje vrijeme dobiveno induksijskom terapijom.

Koristi održavanja rituksimabom vidljive su u prvoj liniji i relapsu bolesti.

ESMO smjernice preporučuju održavanje rituksimabom u prvoj liniji i relapsu (8).

Rituksimab se preporučuje u indukciji i terapiji održavanja kao standard liječenja za FL.

09.05.2011. MabThera je registrirana u RH za „terapiju održavanja u liječenju bolesnika oboljelih od folikularnog limfoma koji su odgovorili na početno liječenje“.

Doziranje (temeljeno na registracijskim studijama):

- prva linija - 375 mg/m^2 svaka 2 mjeseca
- relaps/refraktorni - 375 mg/m^2 svaka 3 mjeseca do progresije bolesti ili najduže u trajanju od dvije godine.

Literatura:

1. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*. 2005;105:1417-1423.
2. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Front-line therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome of patients with advanced stage follicular lymphomas as compared to CHOP alone - results of a prospective randomized study of the German low grade lymphoma study group (GLSG). *Blood*. 2005;106:3725-3732.
3. Herold M, Pasold R, Srock S, et al. Results of a prospective randomised open label phase III study comparing rituximab plus mitoxantrone, chlorambucile, prednisolone chemotherapy (R-MCP) versus MCP alone in untreated advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and mantle-cell-lymphoma (MCL). *Blood*. 2004;104 (Suppl 11):169a, Abstract 584a.
4. Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol*. 1995;1:140-147.
5. Bachy E, Brice P, Delarue R et al. Long-term follow-up of patients with newly diagnosed follicular lymphoma in the prerituximab era: effect of response quality on survival—A study from the groupe d'étude lymphomes de l'adulte. *J Clin Oncol*. 2010; 10(5):822-9.
6. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR et al. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotypic T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a “vaccinal effect” of rituximab. *Blood*. 2009;113:3809-13.
7. van Oers MH, van Glabbeke M, Giurgea L et al. Rituximab maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome of the EORTC 20981 phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol*. 2010;28(17):2853-8.
8. Dreyling M and on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010;21(suppl 5): v181-v183.

Brentuksimab vedotin - novi terapijski pristup u liječenju limfoma

Inga Mandac Rogulj, dr. med.
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
E-pošta: imandac@yahoo.com

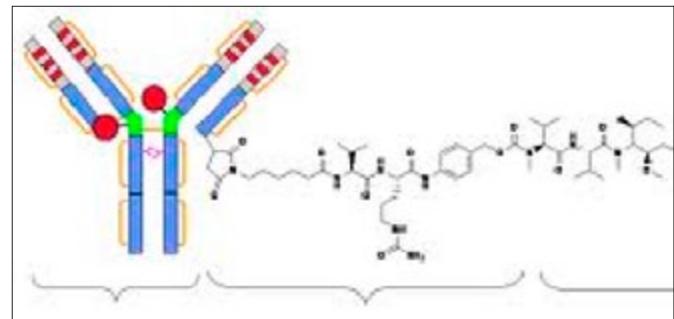
Oko 15-30% bolesnika s Hodgkinovim limfomom nema dugotrajnu remisiju sa sadašnjom konvencionalnom terapijom (1). Autologna transplantacija perifernih matičnih krvotvornih stanica kod bolesnika s relapsom Hodgkinovog limfoma može biti učinkovita terapija (kurativna) kod oko 50% bolesnika (2,3). Kod bolesnika u relapsu nakon autologne transplantacije ukupno preživljene je oko 55% kroz 2 godine, odnosno 32% nakon 5 godina (4). Unatoč brojnim pokušajima i trudu u osmišljavanju djelotvorne kemoterapije u relapsu ili refraktornom Hodgkinovom limfomu i anaplastičnom limfomu velikih stanica, rezultati su bili razočaravajući.

Zbog toga ne iznenađuje oduševljenje koje je u hematologiji izazvao novi „trojanski konj“ u borbi protiv limfoma - brentuksimab vedotin.

Predkliničke studije

Antigen CD30 je član receptorske obitelji faktora tumorskog nekroze alfa i dijagnostički biljek kod Hodgkinove bolesti, a izražen je i na stanicama anaplastičnog limfoma velikih stanica (ALCL) te nekim ne-Hodgkinovim limfoma. Na zdravim tkivima izvan imunološkog sustava nema izražaja antiga CD30. Visoki izražaj antiga CD30 uočen je i na aktiviranim limfocitima kod bolesnika s autoimnim i upalnim bolestima.

Francisco je s grupom autora iz Seattle Genetics u kolovozu 2003. godine objavio rezultate *in vitro* studije o antitumorskem učinku kimere monoklonalnog protutijela kemijski vezanog stabilnom peptidnom vezom uz citostatik monometil auristatin E (MMAE) na staničnoj kulturi CD30 pozitivnih Hodgkinovih i ALCL stanica te na ksenograftima miševa s Hodgkinovim limfomom i ALCL. Konjugat je nazvan brentuksimab vedotin (Slika 1.).



Slika 1. Struktura brentuksimab vedotina: kimerično protutijelo IgG1 Cac10 specifično za antigen CD30, citostatik monometil auristatin E (MMAE), peptidna veza koja kovalentno veže MMAE na Cac101. Na 1 molekulu monoklonalnog protutijela vezane su 4 molekule MMAE.

Brentuksimab vedotin je stabilan u fiziološkim uvjetima, a nakon vezanja na CD30 antigen i internalizacije, lizosomalne proteaze uništavaju stabilnu peptidnu vezu što dovodi do otpuštanja MMAE u citosol tumorske stanice. Vezanje MMAE na tubulin dovodi do uništenja mreže mikrotubula u stanici, zaustavljanja G2/M faze staničnog ciklusa, apoptoze i stanične smrti. Brentuksimab vedotin pokazuje izrazitu citotoksičnu aktivnost na CD30 pozitivne stanice, a oko 300 puta je manje učinkovit na stanice koje ne izražavaju CD30 antigen. Uočeno je kako oko 50% doze MMAE ostaje u stanici kroz sljedećih 16-22 sata nakon internalizacije, ali jedan dio lijeka polako difuzijom izlazi izvan stanice. Taj aktivni dio lijeka može imati citotoksičnu aktivnost i na mikrookoliš, odnosno stanice koje ne izražavaju antigen CD30. U literaturi je takav učinak opisan kao „bystander effect“ ili „učinak na promatrače“ (5,6,7).

Oflazoglu je s grupom autora pokazao kako brentuksimab vedotin ima sinergistički terapijski učinak kad se kombinira s citostaticima koji se koriste u liječenju Hodgkinovog limfoma kao što su doksorubicin, bleomicin, dakarbazin i gemcitabin. Antitumorski učinak na animalnim modelima je bio značajno bolji kada se brentuksimab kombinirao s navedenim citostaticima, osim s vinblastinom, koji poput ostalih citostatika iz grupe vinka-alkaloidea ulazi u interakcije s proteinima mikrotubula, pa je moguće da smanjuje aktivnost brentuksimab vedotina. Poboljšana učinkovitost rezultat je specifičnosti djelovanja svakog pojedinog citostatika, a autori nisu uočili značajnije povećanje toksičnosti kombinirane terapije (8).

Kliničke studije

Younes i suradnici su proveli studiju faze I na 45 bolesnika, od kojih 42 bolesnika s Hodgkinovim limfomom, 2 s ALCL i 1 bolesnik s angioimunoblastičnim CD30 pozitivnim T staničnim limfomom. Bolesnici su prije uključivanja u studiju liječeni sa sistemnom kemoterapijom (medijan 3 prethodna kemoterapijska protokola), a kod 33 bolesnika je napravljena autologna transplantacija perifernih matičnih stanica. Prosječna dob bolesnika je bila 36 godina. Bolesnici su primali brentuksimab vedotin u intravenskoj infuziji jednom tjedno svaka tri tjedna, a raspon doza je bio od 0,1 mg/kg do 3,6 mg/kg. Istraživači su htjeli odrediti maksimalnu dozu brentuksimab vedotina koja neće dovesti do neprihvatljive toksičnosti, najčešće nuspojave vezane uz lijek te antitumorski učinak. Od 44 bolesnika koja su dobivala brentuksimab vedotin neovisno o dozi, 39% bolesnika je postiglo objektivan terapijski odgovor, od kojih 25% kompletну remisiju i 14% parcijalnu remisiju. Stabilna bolest održana je kod 43% bolesnika, dok je kod 18% došlo do progresije bolesti. Kod oko 81% bolesnika je došlo do povlačenja simptoma bolesti. Najčešće nuspojave 1. i 2. stupnja su bile umor (36%), povišena tjelesna temperatura (33%), proljevi, mučnina, neutropenija, periferna neuropatija (22%). Kod 12 bolesnika koji su dobili brentuksimab vedotin u dozi 2,7 mg/kg, tri bolesnika su razvila nuspojave 3. stupnja uključujući hiperglikemiju, akutno zatajenje bubrega, febrilnu neutropeniju, prostatitis. Analizom nuspojava uz sve primijenjene doze, zaključeno je kako je maksimalna podnošljiva doza lijeka 1,8 mg/kg. Medijan trajanja terapijskog odgovora je bio 9,7 mjeseci (9).

Učinkovitost brentuksimab vedotina opisana je u studiji faze II kod bolesnika s anaplastičnim limfomom velikih stanica.

Brentuksimab vedotin je primijenjen kod 58 bolesnika s relapsnim ili refraktornim ALCL u dozi od 1,8 mg/kg svaka 3 tjedna kroz 16 ciklusa. Kod 30 analiziranih bolesnika objektivan terapijski odgovor je postignut kod njih 87%, 57% bolesnika je postiglo kompletну remisiju, a 30% parcijalnu remisiju. Postotak bolesnika u parcijalnoj ili kompletnoj remisiji nije se značajno razlikovao ovisno o ALK-1 statusu.

Kod 97% bolesnika je postignuta redukcija tumorske mase. Najčešće nefematološke nuspojave bilo kojeg stupnja po CTC kriterijima su bile mučnina (47%), proljevi (40%), periferna senzorna neuropatija (40%), pireksija (33%), zaduha (30%), umor (27%), nesanica (23%), a od hematoloških neutropenija (23%). Medijan trajanja terapijskog odgovora je

bio 12,6 mjeseci (10). Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) je na osnovi rezultata ove studije odobrila brentuksimab vedotin za liječenje bolesnika s anaplastičnim limfomom velikih stanica u relapsu nakon barem jedne linije terapije (10).

Studija nakon koje je brentuksimab vedotin одobren od FDA u liječenju bolesnika s Hodgkinovim limfomom provedena je od Chena i suradnika na 102 bolesnika s relapsom Hodgkinovog limfoma nakon autologne transplantacije perifernih matičnih stanica.

Brentuksimab vedotin je primijenjen u dozi od 1,8 mg/kg svaka 3 tjedna kroz ukupno 16 ciklusa. Prosječno su bolesnici dobili 9 ciklusa terapije, a terapijski učinak je evaluiran svakih 12 tjedana. Od ukupno 102 bolesnika, kod njih 94% je postignuto smanjenje tumorske mase, kod 34% bolesnika postignuta je kompletna remisija, a ukupan terapijski odgovor je bio 75%. Najčešća nuspojava je bila neuropatija opisana kod 43% bolesnika, koja se potpuno povukla nakon ukidanja terapije kod 2/3 bolesnika. Od 35 bolesnika koji su u trenutku uključivanja u studiju imali B simptome, kod njih 83% je došlo do povlačenja B simptoma već nakon 3 tjedna od početka terapije (11).

U tijeku su brojne studije kojima će se utvrditi učinkovitost i sigurnost primjene ovog lijeka.

AETHERA studija je randomizirana dvostruko slijepa multicentrična studija faze 3 koja uključuje bolesnike u relapsu Hodgkinovog limfoma nakon autologne transplantacije. Bolesnici su randomizirani u omjeru 1:1, a ispituje se učinkovitost i sigurnost brentuksimab vedotina u usporedbi s placebom i najboljom potpornom terapijom. Brentuksimab se primjenjuje u dozi od 1,8 mg/kg u intravenskoj infuziji kroz 30 minuta svaka 3 tjedna kroz 16 ciklusa (12).

Neke od studija bave se primjenom brentuksimab vedotina kod bolesnika s relapsom Hodgkinovog limfoma nakon prve linije kemoterapije, a prije autologne transplantacije perifernih matičnih stanica, a u tijeku su i studije u kojima se brentuksimab vedotin kombinira s citostaticima koji se najčešće koriste u liječenju Hodgkinovog limfoma ili anaplastičnog limfoma velikih stanica.

Učinkovitost ponovne terapije brentuksimab vedotinom u relapsu bolesnika s Hodgkinovim limfomom i ALCL, a koji su prethodno liječeni brentuksimab vedotinom u sklopu studija, i postigli smanjenje tumorske mase ili stabilnu bolest, opisana je kroz prikaze nekoliko bolesnika.

Kod 8 bolesnika u relapsu koji su prethodno liječeni brentuksimab vedotinom (6 s Hodgkinovim

limfomom, 1 s ALCL), ponovno je primijenjen brentuximab vedotin u dozi 1 mg/kg ili 1,8 mg/kg svaka 3 tjedna kroz 8 ciklusa. Kod 2 bolesnika je postignuta kompletan remisija, kod 4 bolesnika parcijalna remisija, a kod 1 stabilna bolest. Objektičan terapijski odgovor je uočen 5-13 tjedana nakon ponovne primjene brentuximab vedotina, a trajanje odgovora na ponovljenu terapiju je bilo duže od 52 tjedna (13).

Foyil i suradnici su opisali bolesnika s ALCL koji je u relapsu nakon prve linije terapije (R-CHOP) uključen u studiju faze I te mu je primijenjen brentuximab vedotin u dozi 2,7 mg/kg iv u ciklusima svaka 3 tjedna kroz ukupno 3 ciklusa. Postignuta je kompletan remisija te je učinjena autologna transplantacija perifernih matičnih stanica. Nakon 3 mjeseca od transplantacije došlo je do relapsa limfoma, pa je bolesnik dobio još 16 ciklusa terapije brentuximab vedotinom u pojedinačnoj dozi od 1,8 mg/kg. Oko 5 mjeseci nakon što je primijenjen posljednji ciklus terapije brentuximab vedotinom, došlo je do relapsa bolesti. Uključen je u studiju faze II, a već nakon 2 ciklusa terapije brentuximab vedotinom postignuta je kompletan remisija. Do zaključenja članka, autori su pokazali da je bolesnik dobio 40 ciklusa brentuximab vedotina bez značajnijih nuspojava, osim periferne neuropatije 1. stupnja. Nakon svakog relapsa, postignut je brz i kompletan terapijski odgovor na primjenu brentuximab vedotina, ali je isto tako bolesnik po ukidanju terapije kratko bio u remisiji. Autori ističu kako je potrebno procjenjivati učinak lijeka na većem broju bolesnika te razmotriti terapiju održavanja brentuximab vedotinom osobito kod onih s agresivnim ALCL-om (14).

Zaključak

Brentuximab vedotin je novi lijek odobren od FDA u kolovozu ove godine za liječenje bolesnika u relapsu Hodgkinovog limfoma nakon autologne transplantacije perifernih matičnih stanica ili nakon barem dvije linije kemoterapije kod bolesnika koji nisu kandidati za autolognu transplantaciju perifernih matičnih stanica, te za liječenje bolesnika u relapsu anaplastičnog limfoma velikih stanica nakon barem jedne linije kemoterapije. Preporučena doza brentuximab vedotina je 1,8 mg/kg u intravenskoj infuziji kroz 30 minuta svaka 3 tjedna do ukupno 16 ciklusa, odnosno do progresije bolesti ili neprihvataljive toksičnosti.

Dosadašnja su klinička ispitivanja potvrdila njegovu učinkovitost na odabranoj populaciji bolesnika. Možda klinička ispitivanja faze IV potvrde da je stvoren još jedan „čarobnjak“ u onkologiji.

Literatura:

1. Diehl V i sur. N Engl J Med. 2003;348:2386-95.
2. Sureda A i sur. Ann Oncol. 2005;16:625-33.
3. Majhail NS i sur. Biol Blood Marrow Transplant. 2006;12:1065-72.
4. Martinez C i sur. J Clin Oncol. 2010;28:Suppl:7s. abstract.
5. Francisco JA i sur. 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. 2003:149.abstr. R770.
6. Francisco JA i sur. Blood. 2003; 102 (4): 1458-65.
7. Okeley i sur. Clin Cancer Res. 2010;16(3):888-897.
8. Oflazoglu E i sur. Br J Haematol. 2008;142(1) 69-73.
9. Younes A i sur. N Engl J Med. 2010;363:1812-21.
10. Shustov AR i sur. Blood. 2010; 116: (Suppl) Abstract 961.
11. Chen R i sur. Proc ASH. 2010; Abstract 283.
12. AETHERA (A Phase 3 Study of Brentuximab Vedotin (SGN-35) in Patients at High Risk of Residual Hodgkin Lymphoma Following Stem Cell Transplant) Clinical Trials, NIH.
13. Bartlett i sur. J Clin Oncol. 2010;28:(15suppl). Abstract 8062.
14. Foyil KV i sur. Leuk Lymphoma. 2011;Aug 25 (Epub ahead of print).

Eskalirani BEACOPP u uznapredovalom stadiju Hodgkinovog limfoma

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

Bolesnici s uznapredovalim stadijem Hodgkinovog limfoma (HL) do prije 35-40 godina, dakle do razvoja polikemoterapije (MOPP, COPP, ABVD), imali su vrlo lošu prognozu s petogodišnjim preživljjenjem oko 5% (1). Nakon što je polikemoterapija navedenim protokolima postala standardni oblik liječenja, preživljjenje bez znakova bolesti kod ovih bolesnika varira od 61-66%, s ukupnim preživljnjem od 73-83% (2,3). Dakle, još uvijek 35-40% taktih bolesnika ulazi u relaps unutar 5 godina.

Obzirom da ishodi liječenja kod uznapredovalog stadija Hodgkinovog limfoma nisu bili zadovoljavajući, ukazala se potreba za intezivnijim i učinkovitim protokolima.

U namjeri da poboljša dosadašnje rezultate Njemačka Hodgkinova studijska grupa (GHSG) razvila je novi protokol za liječenje uznapredovalog stadija HL koji se sastoji od bleomicina, etopozida, doksorubicina, ciklofosfamida, vinkristina, prokarbazina i prednisona (BEACOPP). Pilot studije pokazale su da se doze ciklofosfamida, etopozida i doksorubicina mogu povećati do 192%, 200% i 140% (4,5). U GHSG HD9 randomiziranoj studiji je varijanta s eskaliranim dozama (eBEACOPP) uspoređena sa standardnim dozama BEACOPP-a (sBEACOPP) i standardnom terapijom za uznapredovali stadij HL, COPP/ABVD (6). Rezultati te studije nakon desetogodišnjeg praćenja pokazuju statistički značajno duže vrijeme do progresije bolesti (PFS) kao i ukupno preživljene bolesnika liječenih eBEACOPP-om u odnosu na bolesnike liječene sBEACOPP-om i COPP/ABVD-om (PFS 82% u odnosu na 70% i 64%, te OS 86% u odnosu na 80% i 75%) (7). Stoga, njemačka studija HD9 pokazala je da je liječenje eBEACOPP-om učinkovitije od liječenja sBEACOPP-om i COPP/ABVD-om (6,7). No, protokol s eskaliranim dozama pokazao je znatno veću ranu hematološku i nehematološku toksičnost, a opisane su i sekundarne maligne bolesti. No unatoč toksičnosti dobri rezultati postignuti ovim protokolom postavljaju pitanje promjene standardne terapije kod bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti.

Talijanska grupa za liječenja limfoma GISL također je provela randomiziranu studiju (HD2000) u

kojoj su uspoređivali ABVD s COPPEBVCAD-om i eBEACOPP-om, i preliminarni rezultati su pokazali značajnu razliku u preživljjenju bez znakova bolesti, iako nije bilo razlike u ukupnom preživljjenju (8).

Pored akutne toksičnosti ovog liječenja nameće se pitanje kasne toksičnosti, naročito sekundarnih mijelodisplazija i akutnih leukemija koje se javljuju u većem postotku kod bolesnika liječenih eBEACOPP nakon 10-godišnjeg praćenja, iako nije bilo razlike u kumulativnoj incidenciji svih malignih bolesti između tri ispitivana protokola u HD9 studiji. S obzirom na toksičnost protokola svakako je potrebno razmotriti koja će skupina bolesnika imati najveću korist od liječenja ovim protokolom. Imajući u vidu da je i ranije ipak znatan dio bolesnika (60-70%) bio izliječen, a da je ovaj protokol toksičniji, postoji opasnost da jedan dio bolesnika izložimo nepotrebnoj toksičnosti. U HD 2000 studiji učinjena je analiza rezultata ovisno o rizičnim čimbenicima, te se pokazalo da veću korist od liječenja ovim protokolom imaju bolesnici s tri ili više rizična čimbenika (Hasencleverov indeks (9)). Takva skupina bolesnika možda je ona koja u svakodnevnoj praksi treba biti liječena ovim protokolom. U namjeri da odgovori na pitanje koju skupinu bolesnika treba liječiti eBEACOPP-om, provedena je EORTC-ova studija u kojoj su bolesnici sa stadijem III i IV Hodgkinovog limfoma s tri ili više rizičnih čimbenika randomizirani na terapiju s 8 ciklusa ABVD-a ili na 4 ciklusa eBEACOPP-a + 4 ciklusa sBEACOPP-a. Rezultati ove studije tek se očekuju. Sve se više spominje i pitanje broja ciklusa eBEACOPP-a kod ove skupine bolesnika, kao i uloga radioterapije u tretiranju "bulky" bolesti. Preliminarni rezultati njemačkih studija HD12 pokazuju da nema razlike između bolesnika liječenih s 8 ciklusa eBEACOPP-a i onih liječenih s 4 ciklusa eBEACOPP-a i 4 ciklusa sBEACOPP-a (10), a preliminarni rezultati HD15 studije ukazuju da je 6 ciklusa terapije eBEACOPP-om dovoljno. Smanjenje broja ciklusa uz istu ili čak veću efikasnost moguće će smanjiti i kasnu toksičnost terapije. Zračenje značajno doprinosi kardijalnoj i plućnoj toksičnosti terapije, i utječe na razvoj sekundarnih maligniteta. Jedna od novijih dijagnostičkih metoda, PET (pozitronska emisijska tomografija) sve se više koristi u procjeni odgovora na terapiju i donošenju odluke o nastavku terapije. Tako se razmatra i mogućnost da bolesnike s PET-negativnim rezidualnim lezija ne treba zračiti.

U zaključku, liječenje bolesnika s uznapredova-

lim stadijem Hodgkinovog limfoma eBEACOPP-om za sada još uvijek nije standardna metoda liječenja. Rezultati sve većeg broja studija pokazuju učinkovitost ovog protokola, ali ne treba zanemariti toksičnost, te će eBEACOPP vjerojatno svoje mjesto naći kod bolesnika s uznapredovalim stadijem Hodgkinovog limfoma s više rizičnih čimbenika.

Literatura:

1. Canelos GP, Anderson JR, Propert KJ et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD or MOPP alternating with ABVD. NEJM. 1992;21:1478-84.
2. Conors JM, Klimo P, Adams G, et all. Treatment of advanced Hodgkin's disease with chemotherapy – comparison of MOPP/ABV hybrid regimen with alternating courses of MOPP and ABV. A report from the NCI of Canada clinical trials group. JCO. 1997;15:1638-45.
3. Viviani S, Bonadonna G, Santoro A, et al. Alternating versus hybrid and ABVD combinations in advanced Hodgkin's disease: Ten-year results. JCO. 1996;114:1421-23.
4. Tesh H, Diehl V, Lathan B, et al. Moderate dose escalation for advanced stage Hodgkin disease using bleomycin, etoposide, adriamycin, cyclophosphamide, vincristine and prednisone schema and adjuvant radiotherapy: A study of the German Hodgkin Study Group. Blood. 1998;92:4560-67.
5. Diehl V, Franklin J, Hasenclever D, et al. BEACOPP, a new dose-escalated regimen, is at least as effective as COPP/ABVD in patients with advanced-stage Hodgkin Lymphoma: Interim report from trial of the German Hodgkin Study Group. JCO. 1998;16:3810-21.
6. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, et al. Standard and Increased-Dose BEACOPP Chemotherapy Compared with COPP-ABVD for Advanced Hodgkin's Disease. NEJM. 2003;348:2386-95.
7. Engert A, Volker D, Franklin J, et al. Escalated-Dose BEACOPP in the Treatment of Patients With Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma: 10 Years of Follow-Up of the GHSG HD9 Study. JCO. 2009;27:4548-54.
8. Federico M, Luminari S, Iannito E, et al. ABVD compared with BEACOPP compared with CEC for the initial treatment of patient with advanced Hodgkin lymphoma: results from the HD2000 Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfoni Trial. JCO. 2009;27(5):805-11.
9. Hasenclever D, Diehl V, for the International Prognostic Factor Project on Advanced Hodgkin Disease. A prognostic score to predict tumour control in advanced Hodgkin disease. NEJM. 1988;319:1506-14.
10. Engert A, Franklin J, Muller R.P et al. HD12 randomized trial comparing 8 dose-escalated cycles of BEACOPP with 4 escalated vs 4 baseline cycles in patients with advanced stage Hodgkin lymphoma (HL): An analysis of the German Hodgkin Lymphoma Study Group (GHSG), University of Cologne. Blood. 2006;108:33a (abstr 99).

Klonalnost u dijagnostici B i T limfoma

**Mag. mol. biol. Miljenko Katunarić,
prof. dr. sc. Blaženka Grahovac,
prof. dr. sc. Gordana Zamolo,
prof. dr. sc. Nives Jonjić**

Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Adresa autora za kontaktiranje:

Mag. mol. biol. Miljenko Katunarić

Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: miljenko23@gmail.com

Uvod

Limfoproliferativne bolesti pokazuju specifičnu citomorfologiju i histomorfologiju na temelju kojih se najčešće postavlja odgovarajuća dijagnoza. Osnovna dijagnostika temelji se na određivanju specifične kombinacije površinskih antigena, tzv. antigena diferencijacije (CD klasteri). Međutim, u određenom broju slučajeva postavljanje dijagnoze je otežano budući da je ekspresija površinskih antigena u proliferirajućim stanicama nedovoljno specifična (tzv. promiskuitetne stanice). Postavljanje točne dijagnoze pomaže kliničarima u pravilnom odabiru terapijskih algoritama. Dijagnoza se može znatno unaprijediti metodom dokazivanja klonalne prolife-

racije populacija tumorskih stanica, tzv. metodom dokazivanja klonalnosti. Ova metoda temelji se na činjenici da maligno promijenjeni limfociti imaju zajedničko klonalno podrijetlo, tj. potječe od jedne mutirane stanice B ili T limfocita. Ako se dokaže da većina populacije, ili pak cijela populacija limfocita potječe od jedne stanice, može se s visokim stupnjem sigurnosti zaključiti da pacijent ima limfom. Međutim, samo dokaz klonalnosti nije dovoljan za definitivnu dijagnozu, jer sliku klonalne proliferacije može prouzročiti i tzv. »reaktivna proliferacija« koja u podlozi ima odgovor na jedan infektivni antigen. Također, iako je metoda vrlo specifična, osjetljivost metode, izražena kao donja granica postotka limfomskih stanica u uzorku potrebnih za uspješnu analizu (periferna krv, citološki ili histološki materijal) kreće se u većini laboratorija od 1 do 10%. Zato je važno da se nalaz klonalnosti interpretira u kontekstu ukupne kliničke slike pacijenta.

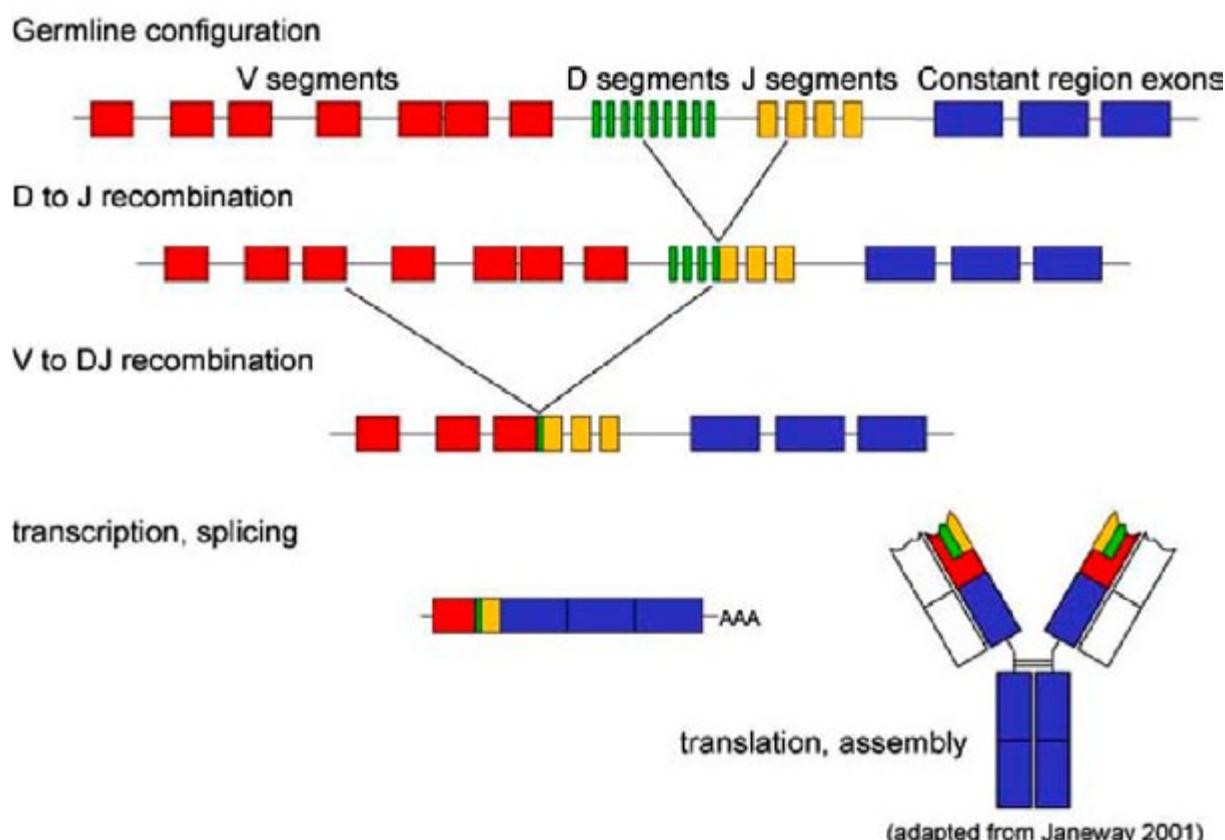
Geni za T stanični receptor i teški lanac imunoglobulina

T stanični receptori (TCR) i imunoglobulini (Ig) su specijalizirani proteini koji sudjeluju u imunološkoj reakciji prepoznavanja stranih antigena. Kako

je broj mogućih antigena u organizmu ogroman (bakterijski, virusni, tumorski antigeni), ovi proteini moraju biti jednakobrojni kako bi prepoznavali i neutralizirali antigene. B i T limfociti su specijalizirane stanice imunološkog sustava koje mogu sintetizirati ukupno oko 10^{12} različitih proteina koji služe za prepoznavanje stranih antigena. Međutim, na raspolaganju im nije toliki broj gena, nego je specifičnost ovih sustava da su regulirani grupama gena, tzv. obitelji supergena koji se tijekom diferencijacije

stanica preuređuju u veliki broj kombinacija, što im omogućuje superstruktura genske regije, građene iz segmenata gena, odgovornih za varijabilnost (V), diferencijaciju (D), vezne segmente (J) i konstantnu regiju (C), Slika 1.

Kako se antigenom stimulirani B limfocit diferencira, supergeni se preuređuju nasumično, bираjući različite segmente V, D i J regija, režući ih i ponovno lijepeći u različitim kombinacijama.



Slika 1. VDJ preuređenje imunoglobulinskog lanca u B limfocitima tijekom razrjevanja stanica. Varijabilni segmenti (V); segmenti različitosti (D); povezujući segmenti (J); konstantna regija (C). (Preuzeto iz Janeway i sur. 2001. Immunobiology, 5th edition.)

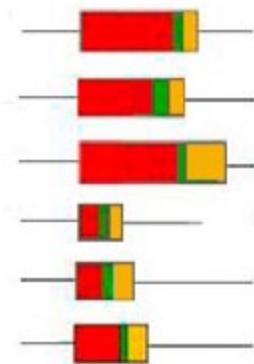
U normalnim stanicama VDJ regije su različite, a u klonalnim iste dužine. Ta dužina se mjeri u parovima baza i služi kao osnova za dokazivanje klonalnosti. Tijekom razvoja timocita T stanični receptor (TCR) prolazi proces preuređenja koji je sličan gore opisanom preuređenju imunoglobulina.

Metode

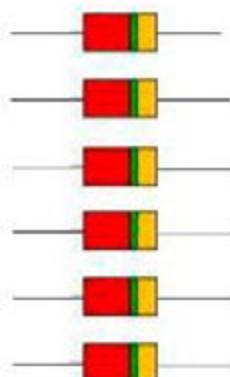
Za dokazivanje klonalnosti u B i T limfocitnim populacijama standardno se koriste dva osnovna modela. Kod B stanica je to preuređenje teškog lanca imunoglobulina (**IGH**), a kod T limfocita je to gama lanac T staničnog receptora (**TCRG**), a može se kao dopuna koristiti i beta lanac (**TCRB**). Metoda koja se najčešće koristi u dijagnostičkom postup-

ku je polimerazna lančana reakcija (PCR), pomoću koje se DNA iz različitih materijala (periferna krv, biopsati, arhivsko tkivo uklopljeno u parafin) umnožava pomoću primera koji osiguravaju specifičnost umnoženih fragmenata za daljnje analize. PCR proizvodi se dalje analiziraju pomoću kapilarne elektroforeze na uređaju ABI Prism 310 Genetic Analyzer, metodom fragmentarne analize. Jedna od početnica je obilježena fluorescentnom bojom te se tako obilježava svaki pojedinačni PCR produkt. PCR produkt se analizira na mikrokapilari ispunjenoj polimerom koja razdvaja produkte s razlikom u tek jednom paru baza. Laser pobuđuje fluorescenciju pojedinog obilježenog produkta, a senzor analizira intenzitet pojedinog signala. Veličina produkata se određuje

VDJ segments in normal cells



VDJ segments in lymphoma clone



(Adapted from Janeway 2001)

Slika 2. VDJ preuređenje Ig gena u normalnim stanicama i klonovima limfoma. (Preuzeto iz Janeway i sur. 2001. Immunobiology, 5th edition.)

relativno prema tvorničkim standardima koji sadrže molekule različite veličine.

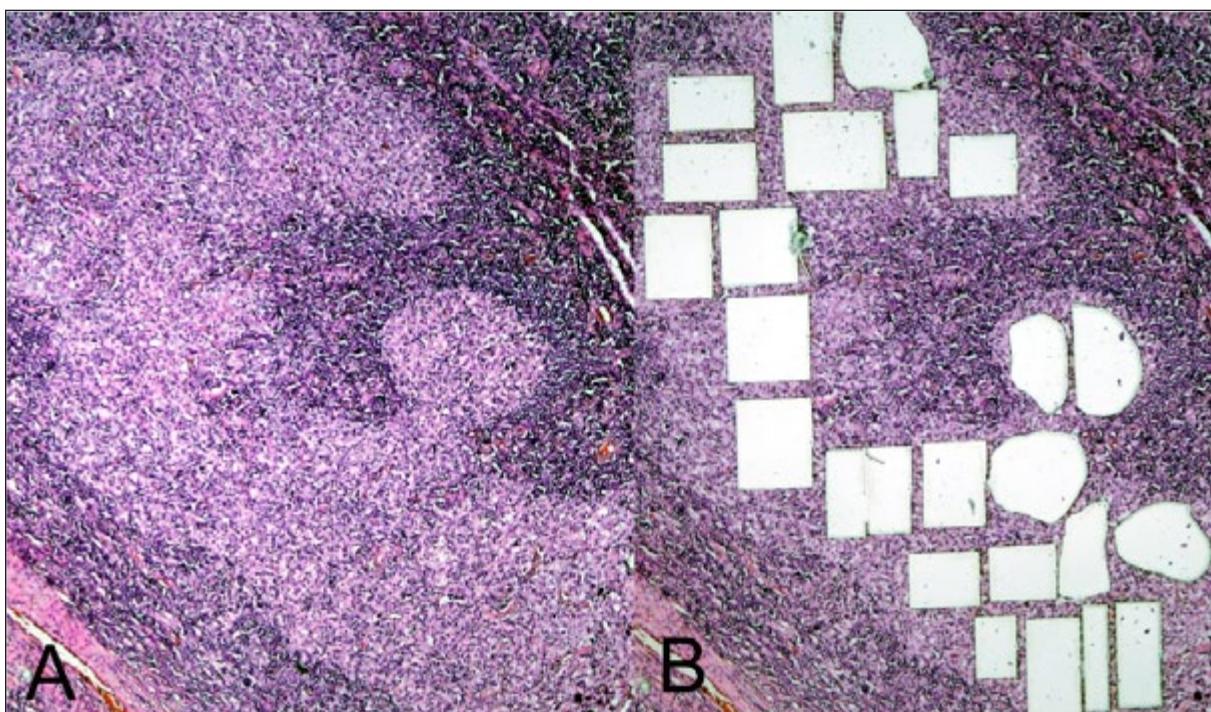
Nakon softverske analize rezultati se izražavaju u pikovima čiju visinu određuje količina u komercijalnog standardnog produkta (y os), a položaj na x osi je dužina PCR produkta.

Uzorkovanje dijagnostičkog materijala

Patolog evaluira uzorak tkiva na predmetnom

staklu, te označi suspektnu regiju. Uzorkovanje tkiva iz parafinske kocke može se vršiti na više načina:

1. Puni rez - ukoliko je područje interesa homogeno, te zauzima veći dio bioptata.
2. Struganje sa stakla - ukoliko je područje interesa homogeno i makroskopski vidljivo
3. Laserska mikrodisekcija - ukoliko su u tkivu infiltrirane pojedinačne stanice ili gnijezda unutar normalnih stanica.

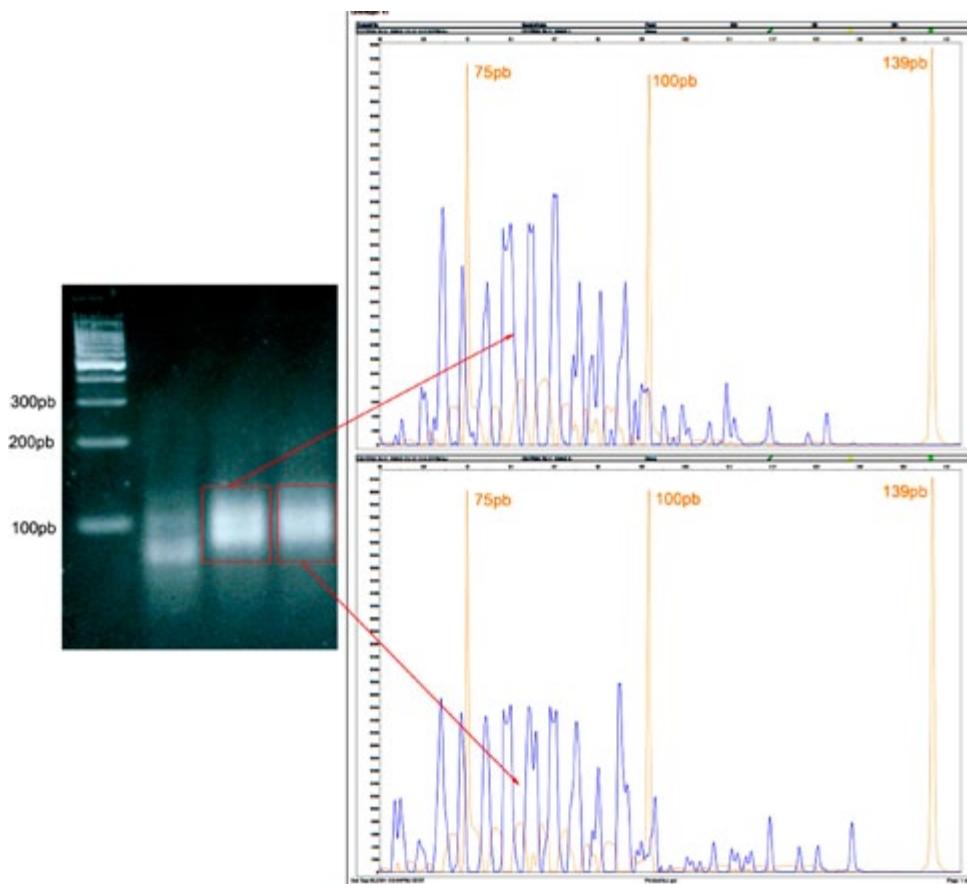


Slika 3. Patolog je odabrao folikul koji sadrži B-limfocite. Prije (A) i poslije (B) mikrodisekcije.

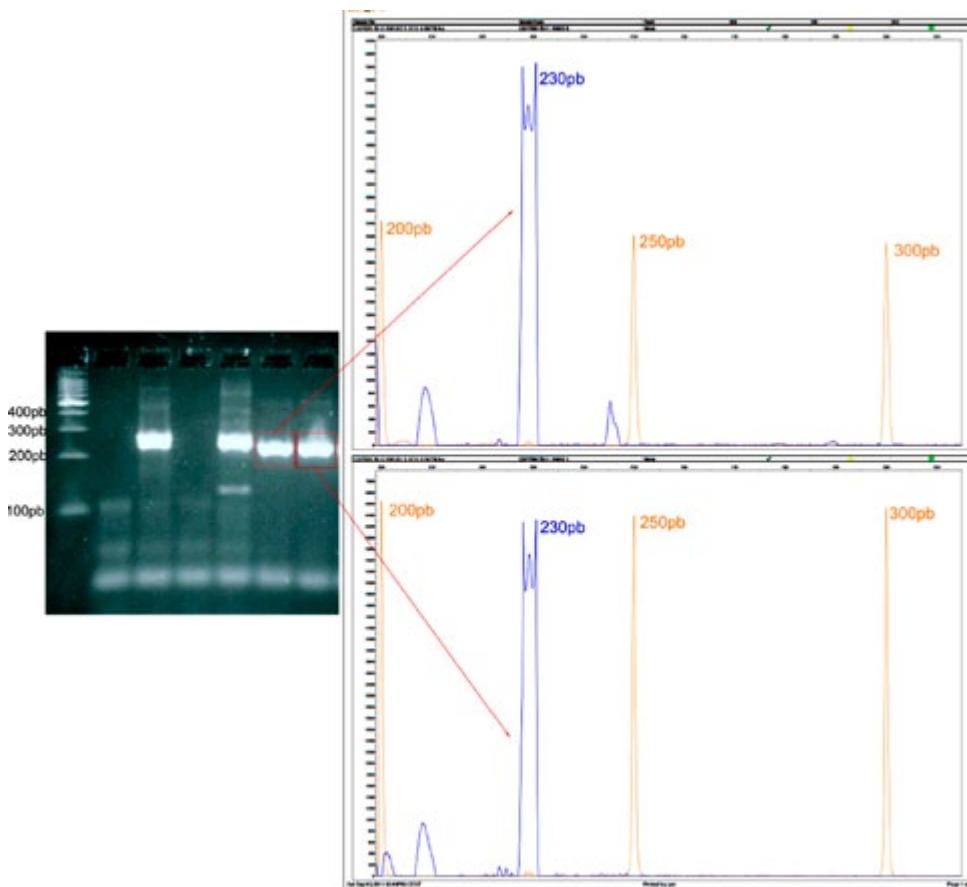
Kriteriji za procjenu klonalnosti

POLIKLONALNOST: U normalnom tkivu populacija B i T limfocita ima veliki broj različito pre-

uređenih gena. Raspodjela je normalna, te se distribuirala po Gaussovoj krivulji.



Slika 4. Analiza PCR produkta FR3A regije teškog lanca imunoglobulina. Korišten je tvornički standard veličine GeneScan™ 500® LIZ (AppBio, SAD). Ispitani uzorak pokazuje poliklonalnost.

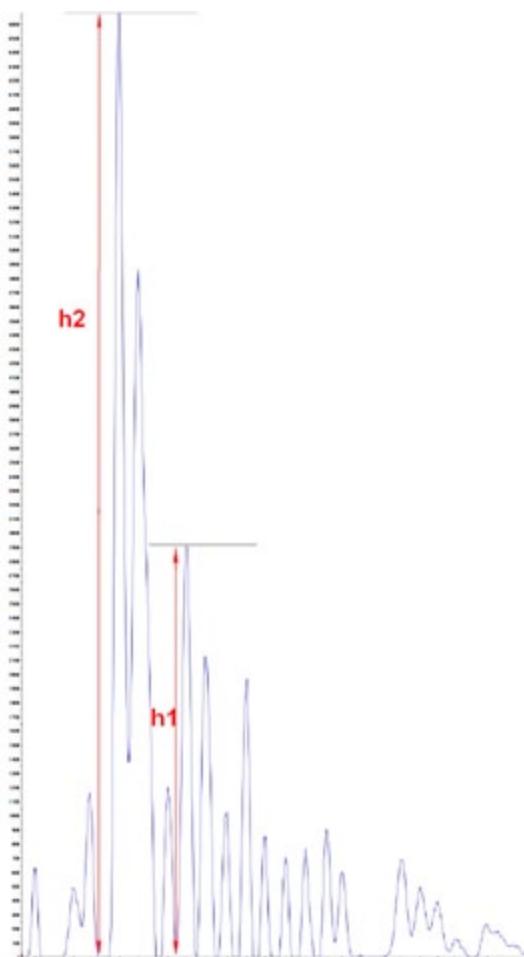


Slika 5. Analiza PCR produkta FR3A regije teškog lanca imunoglobulina. Korišten je tvornički standard dužine GeneScan™ 500® LIZ (AppBio, SAD). Uzorak pokazuje samo jedan pik te pokazuje monoklonalnost.

Ako su limfociti snažno aktivirani određenim antigenima iz poliklonalne pozadine će se izdvojiti 2 ili više pikova. Tu raspodjelu zovemo OLIGOKLONALNOST. U slučaju da je jedna zločudna stanica neograničeno proliferirala kao rezultat čemo dobiti jedan pik- MONOKLONALNOST.

Ukoliko se pik izdvaja iz poliklonalne pozadine dolazi do dvojbe između dijagnoze oligo- ili monoklonalnosti. Da bi se te odluke standardizirale ra-

zvio se algoritam procjene. Prvi uvjet je da pik mora nadmašiti 1500 jedinica florescencije. Također visina pika (h_2) mora nadmašiti visinu poliklonalne pozadine (h_1) te imati koeficijent veći od 3.0. (h_2/h_1). Ukoliko je pik pored poliklonalne pozadine onda se njegova visina (h_3) dodaje visini h_1 da bi se dobilo visina h_2 . ($h_3+h_1)/h_1$). Ukoliko se izdvajaju bialjni pikovi mjeri se najviši pik.

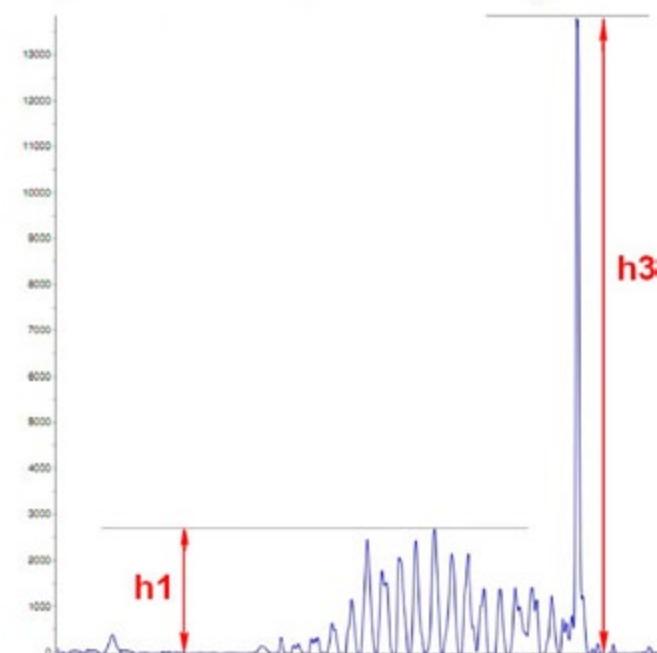


Slika 6. Koeficijent omjer pikova je 2.2 te se pik ne može proglašiti klonalnim.

Sve analize klonalnosti se vrše minimalno u duplikatu od koraka PCR amplifikacije, te je za dijagnozu potrebno podudaranje rezultata.

Literatura:

- van Dongen JJM, Langerak AW, Brueggeman M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia. 2003;17(12):2257-2317.
- Foedinger M, Buchmayer H, Schwarzinger I, Simonitsch I, Winkler K, Jaeger U et al. Multiplex PCR for rapid detection of T-cell receptor-gamma chain gene rearrangements in patients with lymphoproliferative diseases. British J Haematology. 1996;94:136-139.
- The concept of Clonality <http://www.ped-onc.org/diseases/MRD/clonal.html>
- Market E, Papavasiliou FN. V(D)J Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System. PLoS Biol. 2003;1(1):e16. doi:10.1371/journal.pbio.0000016
- Janeway CA, Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Immunobiology, 5th edition, Garland Science 2001, New York, USA.
- Sandberg Y, van Gastel-Mol EJ, Verhaaf B, Lam KH, van Dongen JJM, Langerak AW. BIOMED-2 Multiplex Immunoglobulin/T-Cell Receptor Polymerase Chain Reaction Protocols can reliably replace Southern Blot Analysis in routine clonality diagnostics. J Mol Diagnos. 2005;7(4):495-503.



Slika 7. Koeficijent pikova je 6,18 te se pik proglašava monoklonalnim.

Istraživanje progresije/evolucije B-KLL KROHEM KLL-01 – stanje 05/2011

Ozren Jakšić¹, Božena Coha², Velka Gverić-Krečak³, Marin Kursar⁴, Petar Šenjug¹, Vlatko Pejša¹

¹ KB Dubrava, ² OB Slavonski Brod, ³ OB Šibenik,

⁴ ŽB Čakovec

Adresa autora za kontaktiranje:

doc. dr. sc. Ozren Jakšić, dr. med

Odjel za hematologiju, Klinička bolница Dubrava,

Zagreb

E-pošta: ojaksic@kbd.hr

Na prethodnim sastancima KROHEM-a i u pret-hodnim biltenima predstavljen je prijedlog istraživanja progresije/evolucije B-KLL KROHEM KLL-01 (1,2). U svibnju 2010. prikazani su rezultati pilot istraživanja koje je uključivalo 10 bolesnika (3).

S obzirom da je pilot istraživanje pokazalo izvedivost istraživanja koje bi uključivalo više hemato-loških centara različitih kategorija te iz različitih di-jelova RH nastavljeno je s uključivanjem bolesnika (registracijom). U nastavku projekta uz KB Dubrava (O. Jakšić, V. Pejša), OB Šibenik (V. Gverić-Krečak) i ŽB Čakovec (M. Kursar) pridružio se i četvrti cen-tar OB Slavonski Brod (B. Coha).

Do svibnja 2011. „registrirano“ je 39 bolesnika koji su zadovoljavali uključujuće kriterije (neliječe-ni B-KLL), a praćenjem do rujna 2011. kod 12 bo-lesnika je započeta prva linija liječenja (primarni „ishod“), odnosno 29 novih bolesnika uz 9 ishoda. Obilježja bolesnika registriranih do svibnja 2010. godine u usporedbi s bolesnicima registriranim do

svibnja 2011. godine prikazana su na Tablici 1.

Usporedbom obilježja bolesnika vidljivo je da su novouključivani bolesnici u ranijim fazama bolesti (Rai 0-II 70% naprema 93%) i s manjom tumorskom masom (TTM), brojem leukocita i limfocita, ma-njim beta-2 mikroglobulinom, uz kraće vrijeme od dijagnoze do registracije. Odnos ukupne tumorske mase (TTM) odnosno uznapredovalosti bolesti pri registraciji u odnosu na vrijeme od dijagnoze prika-zan je na Slici 1. Prisutni trendovi su poželjni naro-čito obzirom na poželjni cilj registriranja bolesnika pri dijagnozi.

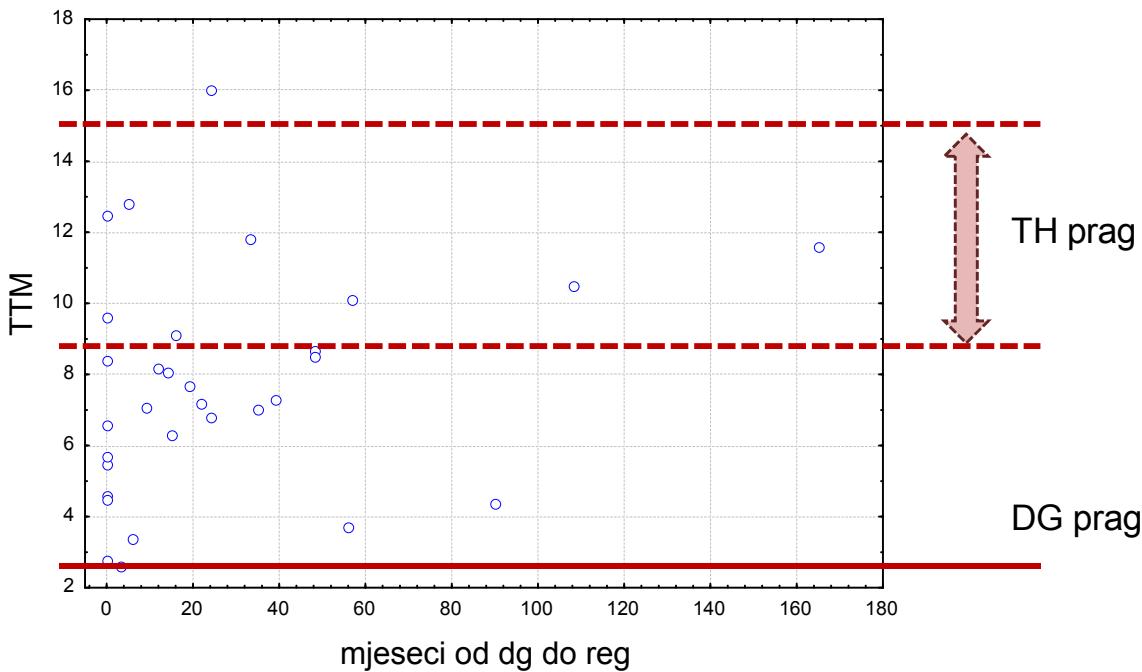
Medijan praćenja bolesnika je 17 mjeseci (raspon 0-37 mjeseci). Medijan vremena do početka liječe-nja nije dosegnut, dok je 25. percentil na 10,5 mjeseci što je prikazano na Slici 2.

U skladu s iskustvima iz dosadašnjeg tijeka istraživanja i s predloženim preporukama KROHEM-a za KLL (4) pripremljen je i nacrt protokola (5). Uključivanjem bolesnika u istraživanje KROHEM KLL-01 omogućuje se široka primjena preporuka KROHEM-a za KLL (standardizirana i kvalitet-na obrada svih uključenih bolesnika pri dijagnozi i prije početka liječenja) u svim centrima u RH te standardizirano praćenje. Zbog komplementarno-sti istraživanja s registrom KROHEM-a u tijeku je njihovo usklađivanje. U dosadašnjem tijeku istraži-vanja podaci su prikupljeni i obradivani u KB Du-brava (P. Šenjug), no zbog uključivanja većeg broja

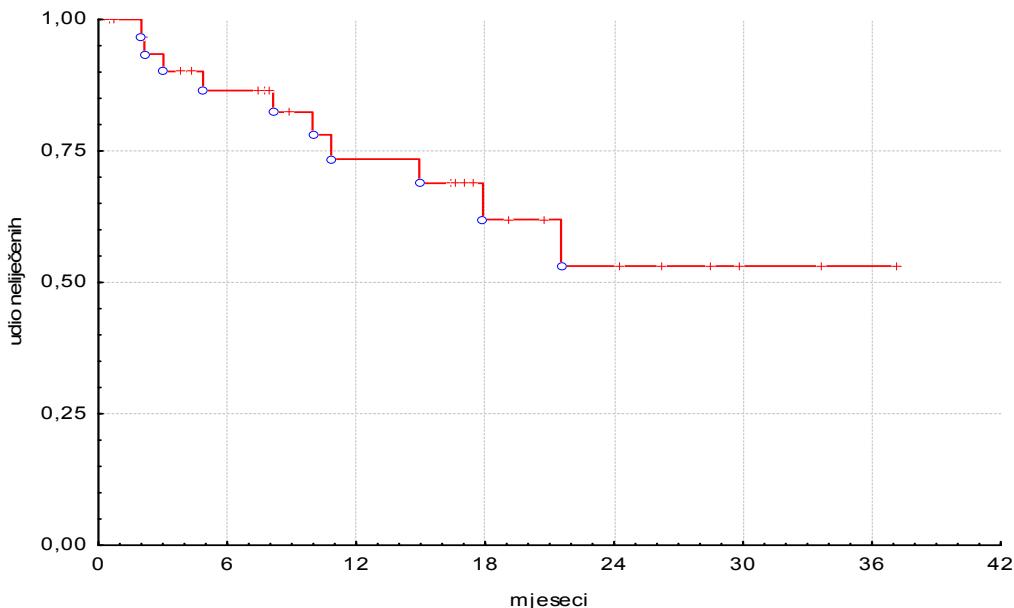
Tablica 1. Obilježja bolesnika.

| | 5/2010 | 5/2011 |
|--|-----------------|-----------------|
| Broj | 10 | 39 |
| Spol M/Z | 7/3 | 21/18 |
| Dob (medijan, raspon) | 70,5 (47-78) | 68,5 (47-82) |
| Vrijeme od dg. do reg. | 24 (0-108) | 15 (0-165) |
| TTM | 8,45 (5,5-16,0) | 7,15 (2,6-16,0) |
| Rai stadiji | | |
| 0 | 2 | 9 |
| I+II | 5 | 27 |
| III+IV | 3 | 3 |
| Leukociti | 43,1 (26,7-122) | 31,4 (7,8-147) |
| Beta-2 mikroglobulin | 2,7 (1,6 -5,7) | 2,7 (1,2-5,7) |
| CD38+/Zap-70+ (%) | 50/50 | 48/51 (n=32) |
| FISH (11q/17p) | 1/0 (n=7) | 2/0 (n=24) |
| <i>*CT nije detektirao veće LČ, splenomegaliju u odnosu na klinički pregled ili UZ</i> | | |

Slika 1. Uznapredovalost/vrijeme od dijagnoze.



Slika 2. Vrijeme do početka liječenja (TTT).



centara i bolesnika također se nameće potreba da se na osnovi informatičke platforme koja prati registar razvije i platforma koja će kvalitetno pratiti i klinička istraživanja.

Literatura:

1. O. Jakšić: Prijedlog istraživanja progresije/evolucije B-KLL-a KROHEM KLL01. Bilten Krohema vol. 1., br. 2., str. 34-35.
2. O. Jakšić: KROHEM KLL01. Bilten Krohema vol. 2., br. 1., str. 22-23.
3. O. Jakšić i sur. Istraživanja progresije/evolucije B-KLL-a KROHEM KLL01 – prikaz pilota. Bilten Krohema vol. 2., br. 2., str. 3.
4. http://www.krohem.hr/images/documents/SMJERNICE_KLL_v%201_2011_beta.pdf
5. <http://www.ttm-cll.org/krohem1/protokoli>

Liječenje akutne mijeloične leukemije (AML) temeljem prognostičkih pokazatelja: multicentrična opservacijska studija s definiranim načelima liječenja AML temeljem prognostičkih pokazatelja rizika

**Dr. sc. Nadira Duraković, dr. med.,
prof. dr. sc. Boris Labar, dr. med.**

Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti,
KBC Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: nadira@mef.hr,
boris.labar@inet.hr

Na prethodnom sastanku Krohema u Tuheljskim Toplicama predstavljen je prijedlog opservacijske studije Radne skupine za akutnu leukemiju. Voditelj navedene studije bit će prof. dr. sc. Boris Labar, dok predloženi istraživački odbor čine prof. dr. sc. Drago Batinić, prof. dr. sc. Antica Duletić-Načinović, dr. sc. Sanja Davidović, prof. dr. sc. Damir Nemet, dr. sc. Koraljka Gjadrov-Kuvedžić, dr. Mario Piršić, prof. dr. sc. Branimir Jakšić, dr. Ranka Serventi-Seiwerth, doc. dr. sc. Ika Kardum-Skelin, dr. Jasminka Sinčić Petričević, prof. dr. sc. Rajko Kušec, prof. dr. sc. Radovan Vrhovac, mr. sc. Ružica Lasan-Trčić, prof. dr. sc. Renata Zadro, dr. Dominik Ložić. Administrativni voditelji studije su dr. sc. Mirta Mikić i dr. sc. Nadira Duraković.

Trenutno se u Hrvatskoj oboljeli od akutnih leukemija koji su kandidati za liječenje intenzivnom kemoterapijom odnosno transplantacijom upućuju na liječenje u jedan od većih centara, dok se stariji bolesnici uglavnom nastavljaju liječiti u lokalnim ustanovama. Kako do sada nisu sustavno sakupljeni podaci o oboljelima od akutnih leukemija u Hrvatskoj, nepoznato je kolika je incidencija ove bolesti, kakvo je preživljenje svih oboljelih kao niti pojedinih subpopulacija bolesnika.

Također, ne postoji niti jedinstveni stav kako liječiti ove bolesnike, te koje čimbenike rizika uzimati u obzir kada razmišljamo o vidu liječenja najboljim za pojedinog bolesnika.

Suvremena podjela AML se temelji na morfološkim, citogenetskim i molekularnim značajkama leukemijskih stanica, te dijeli akutne mijeloične leukemije u podtipove prema prognostičkim značajkama, čime se onda rukovodimo u kreiranju strategije liječenja individualnog bolesnika. Svi bolesnici uključeni u ovu studiju bit će klasificirani temeljem prvenstveno nove podjele Svjetske zdravstvene organizacije (SZO). Osim prognostičkih pokazatelja vezanih uz leukemiju, ova studija inkorporira i prognostičke pokazatelje vezane i uz bolesnikove biološke osobitosti, te ih postavlja kao bitne kod oda-

bira terapije odnosno razine agresivnosti liječenja. U procjeni biološke sposobnosti predleže se koristiti dvije bodovne tablice; prva je ECOG (od engl. Eastern Cooperative Oncology Group) bodovna skala psihofizičkog stanja bolesnika koja se bavi općim stanjem i psihofizičkom sposobnošću bolesnika, te bodovnom skalom pridruženih bolesti HCT-CI (od engl. Hematopoetic Cell Transplantation – Comorbidity Index) koja se temelji na procjeni postojanja odnosno težine pridruženih bolesti.

Kao primarni ciljevi ovog ispitivanja istaknuti su:

- utvrditi kriterije primjene pojedinog terapijskog programa u RH;
- procijeniti njegovu provedivost i uspješnost u RH;
- utvrditi prognostičku vrijednost imunofenotipizacije;
- utvrditi vrijednost imunofenotipizacije u praćenju minalne ostatne bolesti.

Navedeni su i sekundarni ciljevi ispitivanja:

- utvrditi broj KR – dobne i rizične skupine;
- odrediti broj bolesnika s ranom smrтi i refraktornom bolesti;
- odrediti ukupno preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti;
- ispitati učestalost relapsa i smrtnosti zbog drugih razloga;
- ispitati toksičnost i smrtnost zbog liječenja
 - uvodnom terapijom
 - konsolidacijom
 - autolognom transplantacijom
 - allogenom transplantacijom;
- procijeniti kvalitetu života liječenih bolesnika.

Kako bi postigli sve navedene ciljeve potrebno je sakupiti podatke o svim oboljelim bolesnicima u Republici Hrvatskoj. Upravo stoga su kriteriji za uključenje bolesnika u ovu studiju doista široki:

- bolesnici s neliječenom AML (temeljem kriterija SZO i s $>20\%$ blasta u koštanoj srži);
- bolesnici stariji od 18 godina života;
- potpisani informirani pristanak.

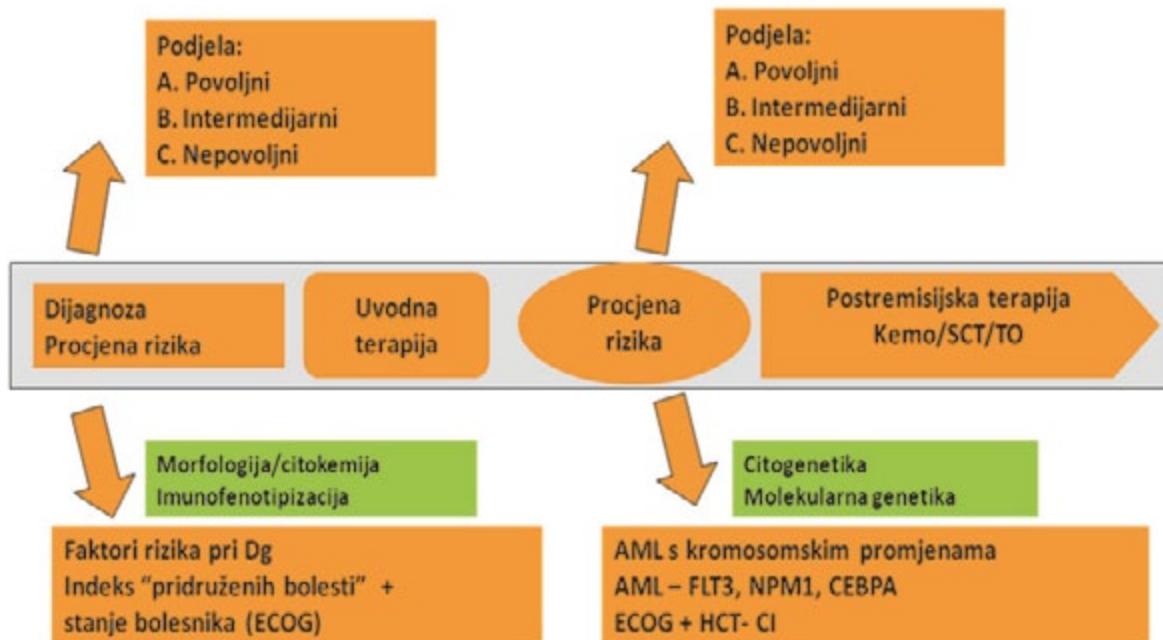
U studiju neće moći biti uključeni bolesnici s akutnom promijelocitnom leukemijom (AML-M3), bolesnici s mijeloidnom blastičnom krizom

Ph+KML, te naravno bolesnici mlađi od 18 godina i bolesnici koji ne dadu pismeni pristanak za sudjelovanje u studiji.

Studija je dizajnirana na način da postoje dvije točke u kojima se procjenjuje rizik bolesti, te se bolest svrstava u povoljnu, intermedijarnu i nepovoljnu skupinu; prva točka je kod same dijagnoze, dok se druga procjena rizika čini nakon dovršene uvodne terapije (Slika 1). Kod dijagnoze, odnosno prije uvodne terapije podjela se temelji na podjeli SZO (prema tada dostupnim podacima), broju leukocita i imunofenotipskim značajkama blasta. Povoljnu sku-

pinu čine oboljeli koji imaju AML-M2, M4, morfološki nemaju značajke mijelodisplazije, nisu pret-hodno liječeni kemoterapijom, a broj leukocita kod dijagnoze je manji od $100 \times 10^9/L$. U intermedijarnu skupinu pripadaju oboljeli koji imaju AML-M0, M1, M5, M6, M7; broj leukocita kod dijagnoze $>100 \times 10^9/L$, te CD34⁺ blasti, dok se u nepovoljnu skupinu svrstavaju oboljeli koji imaju leukemiju koja ima morfološke značajke mijelodisplazije, koji imaju sekundarnu leukemiju te leukemiju imunofenotipski neodređene krvotvorne loze (MPAL).

Slika 1. Hodogram studije AMLI



Kod postizanja kompletne remisije čini se ponovna procjena rizika, sada uglavnom temeljeno na citogenetskim i molekularnim značajkama, te se ponovno oboljeli svrstavaju u tri skupine. Povoljnu skupinu čine oboljeli koji su imali AML-M2, M4, te nisu imali morfološki značajke mijelodisplazije kod dijagnoze, a broj leukocita kod dijagnoze bio je manji od $100 \times 10^9/L$, u kojih je kompletna remisija postignuta jednim ciklusom terapije, te imaju neku od navedenih citogenetskih promjena: t(8;21) (q22;q22); RUNX1-RUNX1T1; inv(16)(p13.1q22) ili t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11; NPM1 mutacija bez FLT3-ITD (normalni kariotip); CEBPA mutacija (normalni kariotip). U intermedijarnu skupinu pripadaju bolesnici koji su pri dijagnozi imali AML-M0, M1, M5, M6, M7; broj leukocita kod dijagnoze $>100 \times 10^9/L$, te CD34⁺ blaste, te sljedeće citogenetske i molekularne promjene: NPM1 mutacija i FLT3-ITD

(normalni kariotip); divlji-tip NPM1 i FLT3-ITD (normalni kariotip); divlji-tip NPM1 bez FLT3-ITD (normalni kariotip); t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL; citogenetske promjene koje nisu drugdje uključene, te bolesnici u kojih se nije uspio dobiti nalaz citogenetike kod dijagnoze. U nepovoljnu skupinu svrstani su oboljeli koji imaju leukemiju koja ima morfološke značajke mijelodisplazije, koji imaju sekundarnu leukemiju te oboljeli koji imaju sljedeće molekularne odnosno citogenetske promjene: inv(3)(q21q26.2) ili t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVIL; t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214; t(v;11)(v;q23); MLL rearanžman; -5 ili del(5q); -7; promjena(17p); kompleksni kariotip.

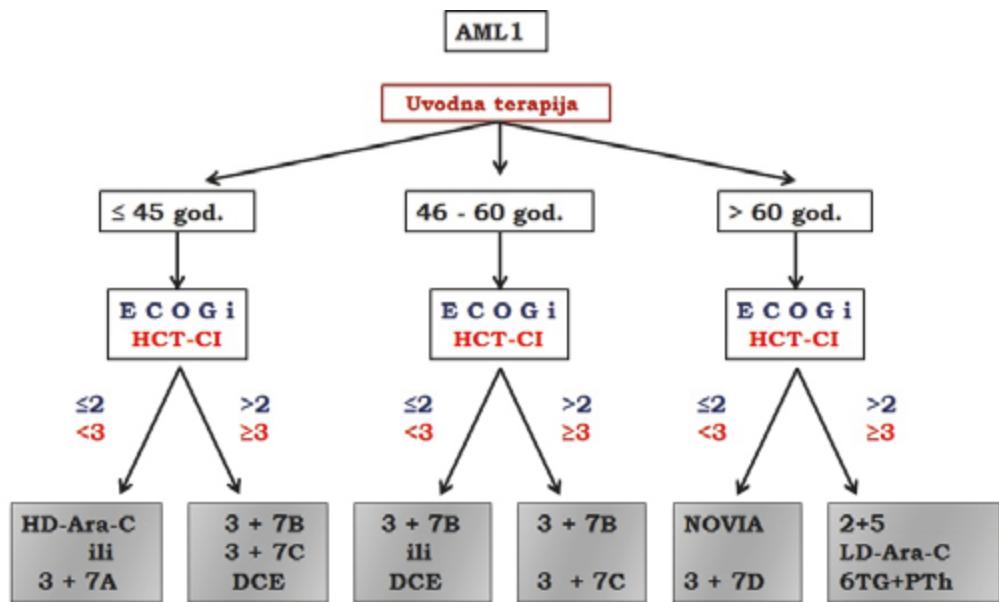
Studija je opservacijska i neintervencijska no predlaže vidove liječenja za svaku skupinu bolesnika određenu karakteristikama leukemije, te karakteristikama bolesnika. Predložene strategije prikazane su shematski. Slika 2. prikazuje uvodnu terapiju pre-

ma dobi bolesnika te indeksu komorbiditeta odnosno ECOG indeksu, dok Slika 3. prikazuje konsolidaciju terapiju. Postkonsolidacijska terapija podijeljena je prema dobi bolesnika na one mlađe od 60 godina (Slika 4.), te starije od 60 godina (Slika 5.).

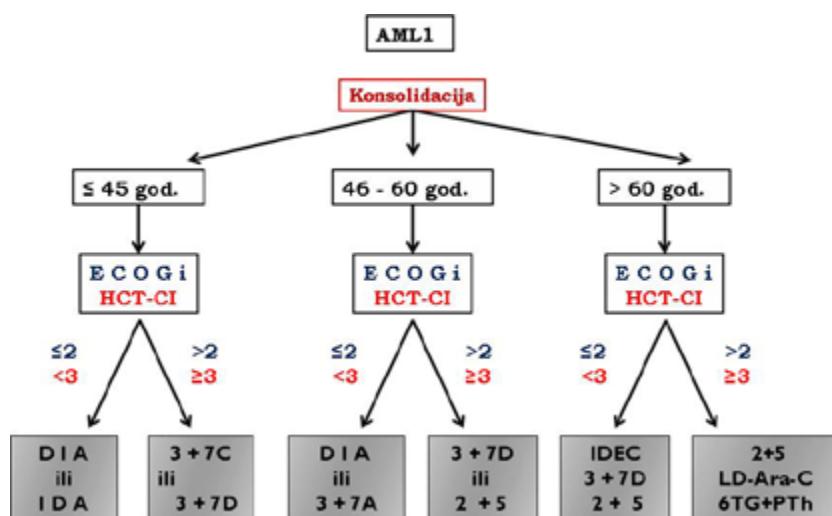
Za registraciju bolesnika odnosno bilježenje karakteristika bolesti, odnosno detalje vezane uz liječenje i preživljjenje, planira se koristiti već postojeće formulare Krohemovog registra, uz male preinake koje će se u dogledno vrijeme učiniti. Centar za registraciju i administraciju bit će u KBC Zagreb.

Detaljni protokoli su osigurani i dostavljeni svim centrima u Hrvatskoj a baš pred samo zaključenje ovoga broja u rad na realizaciji ovog projekta uključena su i dva analitičara podataka čiji će posao, između ostaloga, biti pomoći liječnicima u centrima s prikupljanjem i upisivanjem podataka u registar. Uz njihovu pomoć, te pomoći svih hematologa koji su uključeni u skrb bolesnika oboljelih od akutnih leukemija, nadamo se prikupiti što detaljnije i što točnije podatke o oboljelima od ove bolesti u Republici Hrvatskoj.

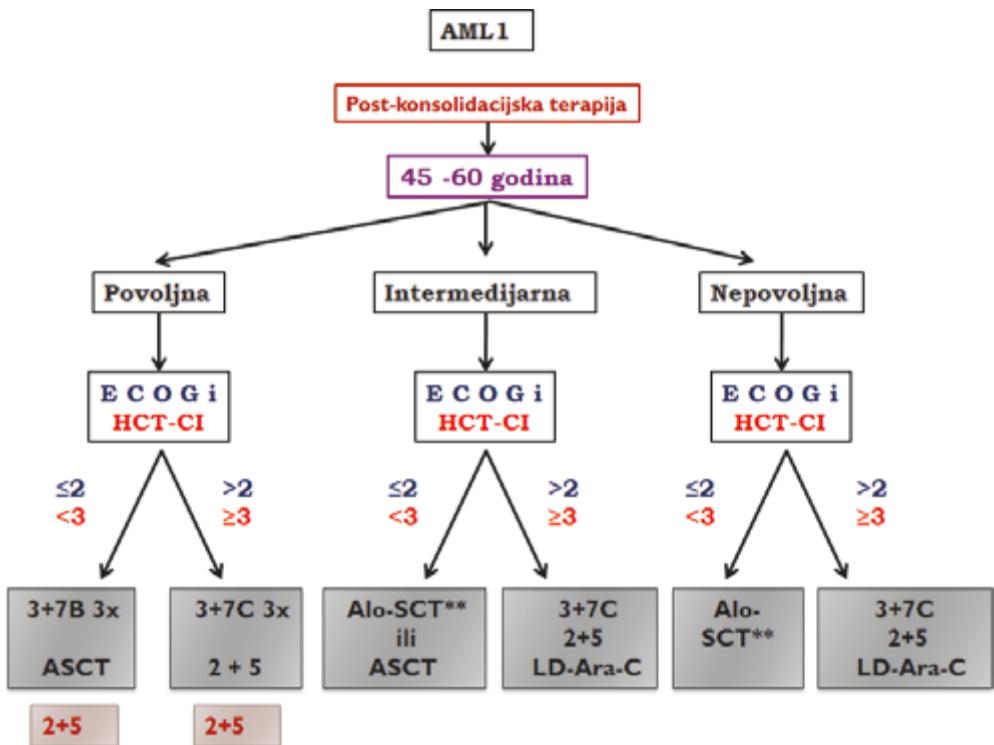
Slika 2. Uvodna terapija.



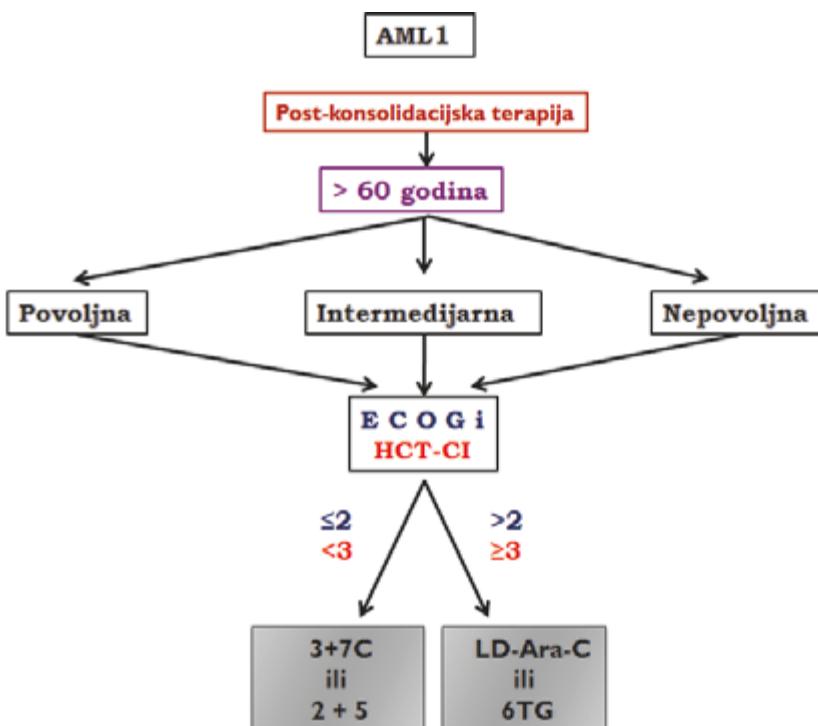
Slika 3. Konsolidacijska terapija.



Slika 4. Post-konsolidacijska terapija – mlađi bolesnici.



Slika 5. Post-konsolidacijska terapija – stariji bolesnici.



Alogenična transplantacija u bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom

Ranka Serventi-Seiwerth, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
KBC Zagreb
E-pošta: serventi_seiwerth@hotmail.com

1. Uvod

Indukcijskom kemoterapijom postiže se remisija u oko 70%-80% bolesnika s novo-dijagnostičanom akutnom mijeloičnom leukemijom (AML). Postremisijska terapija ovisi o karakteristikama same bolesti, ali i o psihofizičkom stanju bolesnika, pridruženim bolestima te o njegovoj životnoj dobi. Alogenična transplantacija matičnih krvotvornih stanica je najdjelotvornija terapija. No zbog velike toksičnosti i smrtnosti terapija je izbora za bolesnike nepovoljnog rizika u kojih se ponovna pojava leukemije ne može dobro kontrolirati drugim načinima liječenja. To se u prvom redu odnosi na bolesnike s akutnom mijeloičnom leukemijom intermedijarnog i visokog rizika. Čimbenike rizika moguće je podjeliti na one povezane s bolešću ili bolesnikom.

2. Rizični čimbenici bolesti

Rizični čimbenici bolesti određuju intenzitet terapije, vrijeme kada primijeniti agresivnu terapiju, ponajprije alogeničnu transplantaciju. U rizične čimbenike bolesti ubrajaju se:

2.1. Morfološki pokazatelji AML temeljem podjele po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), broja CD34+ stanica i broja leukocita.

Prije samog početka liječenja moguće je bolesnika s AML svrstati u jednu od tri prognostičke skupine:

- **Povoljni:** AML sa sazrijevanjem, akutna mijelomonocitna leukemija, AML bez znakova mijelodisplazije (MDS) ili prethodne kemoterapije, leukociti $<100 \times 10^9/L$;
- **Intermedijarni:** AML bez sazrijevanja, akutna monocitna leukemija, akutna eritroleukemija, akutna megakariocitna leukemija, leukociti $>100 \times 10^9/L$, CD34+ blasti;
- **Nepovoljni:** AML iz MDS, AML nakon kemoterapije, AML neodređene krvne loze.

2.2. Rizični pokazatelji temeljem genetskih biljega ili poremećaja poznati su prije započinjanja konsolidacijske terapije:

- **Povoljni:** t(8;21)(q22;22), RUNX1-RUNX1T, inv 16, t(16;16), NPM mut + FLT wt + CN AL uz

pokazatelje za povoljni rizik prije samog početka liječenja.

- **Intermedijarni:** NPM1 mutacija i FLT3-ITD (CN AL), wt NPM1 i FLT3-ITD (CN AL), wt NPM1 i FLT3 wt (CN AL), t(9;11) (p22;q23), MLLT3-MLL. Citogenetske promjene koje nisu drugdje uključene, uz pokazatelje za intermedijarni rizik prije samog početka liječenja.
- **Nepovoljni:** inv(3) ili t(3;3), RPNI-EVII, t(6;9), DEK-NUP214, t(v;11)(v;q23), MLL preuredba, -5 ili del(5q), -7, promjena(17p), kompleksni kariotip uz pokazatelje za nepovoljni rizik prije samog početka liječenja.

Temeljem navedenih čimbenika rizika:

Bolesnici povoljnog rizika liječe se alogeničnom transplantacijom u II kompletnoj remisiji bolesti.

Bolesnici intermedijarnog rizika liječe se alogeničnom transplantacijom u I kompletnoj remisiji ukoliko imaju:

- HLA identičnog obiteljskog darivatelja (HLA podudarnost 6/6)
- HLA podudarnog nesrodnog darivatelja (HLA podudarnost 10/10 metodom visoke rezolucije na razini alela).

Bolesnici visokog rizika liječe se alogeničnom transplantacijom u prvoj kompletnoj remisiji ako imaju:

- HLA identičnog donora u obitelji (HLA 6/6) ili obiteljskog donora HLA podudarnosti 5/6, što se tada potvrđuje HLA tipizacijom visoke rezolucije (HLA podudarnost 9/10) ili
- HLA podudarnog nesrodnog darivatelja 10/10, 9/10 (odnosno u iznimnim situacijama 8/10) metodama visoke rezolucije.

3. Rizični čimbenici ovisni o bolesniku

Rizični čimbenici ovisni o bolesniku određuju intenzitet liječenja, ponajprije intenzitet pripreme za transplantaciju, tj. je li moguće primjeniti standarnu mijeloablativnu pripremu ili pripremu smanjenoj intenzitetu.

U ovu skupinu ubrajaju se sljedeći rizični čimbenici:

3.1. Dob bolesnika

Priprema bolesnika mlađih od 45 godina provodit će se primjenom standardne mijeloablativne pripreme.

Priprema bolesnika od 45 – 60 godina provodit će se primjenom pripreme smanjenog intenziteta.

Iznimno će se bolesnici stariji od 60 godina liječiti alogenom transplantacijom uz pripremu smanjenog intenziteta, ako su odličnog psihofizičkog stanja i bez pridruženih bolesti.

3.2. Psihofizičko stanje bolesnika

Psihofizičko stanje bolesnika određeno je ECOG skalom.

Bolesnici dobrog psihofizičkog stanja (ECOG 0-1) liječiti će se standardnom mijeloablativnom pripremom ako su mlađi od 45 godina.

Bolesnici lošijeg psihofizičkog stanja (ECOG 2-3) liječiti će se nemijeloablativnom pripremom smanjenog intenziteta, bez obzira na dob.

3.3. Pridružene bolesti

Bolesnici koji prema bodovnoj skali pridruženih bolesti za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (HCZ-CI) imaju bodovni skor 0-2 liječit će se standardnom mijeloablativnom pripremom.

Bolesnici koji prema bodovnoj skali pridruženih bolesti za transplantaciju krvotvornih matičnih stanica imaju bodovni skor 3 liječit će se nemijeloablativnim pristupom smanjenog intenziteta bez obzira na kalendarsku dob.

4. Prijetransplantacijska obrada bolesnika i darivatelja

Prije liječenja alogeničnom transplantacijom potrebno je provesti sljedeću kliničku i laboratorijsku obradu:

4.1. Prijetransplantacijska obrada bolesnika

- Pregled i razgovor s bolesnikom.
- KKS, biokemijske pretrage i klirens kreatinina.
- Pregled koštane srži (citomorfologija, imunofenotipizacija, citogenetika koštane srži, molekularna analiza).
- Testiranje na zarazne bolesti (HBV, HCV, EBV, CMV, toksoplazma, VZV, HSV , HIV serologija).
- EKG, UZV srca.
- Spirometrija i difuzija plinova.

- Pregled stomatologa.
- Rtg paranasalnih sinusa.
- Ginekolog (+ test na trudnoću za žene u fertilnoj dobi).

4.2. Prijetransplantacijska obrada darivatelja

- Razgovor i pregled darivatelja.
- KG i Rh faktor.
- Laboratorijska obrada.
- Testiranje na zarazne bolesti (HBV, HCV,HIV, CMV, EBV, Toksoplazma, HSV, VZV, sifilis - serologija).
- EKG.
- Rtg pluća i srca.
- Pregled anesteziologa.

5. Priprema za transplantaciju

Priprema za transplantaciju uključuje:

5.3. Standardna mijeloablativna priprema

5.3.1. Priprema Busulfanom i Ciklofosfamidom (Bu/Cy)

Busulfan 4 x 1 mg/kg per os (ili 4 x 0.8 mg/kg i.v.) -8., -7., -6., -5. dan (ukupno 16 doza);

Ciklofosfamid 60 mg/kg -3. i -2. dan u infuziji tijekom 2 sata

Dva dana prije početka primjene busulfana neuroprofilaksa fenobarbitonom.

Profilaksa hemoragijskog cistitisa: trajno ispiranje mokraćnog mjejhura – prije ciklofosfamida sve do 24 sata nakon prekida primjene ciklofosfamida ili uromiteksan 25 mg/kg u bolusu prije ciklofosfamida i potom 75 mg/kg u trajnoj infuziji -3., -2., i -1. dan.

5.3.2. Ciklofosfamid + ozračenje cijelog tijela (TBI)

Ciklofosfamid 60 mg/kg -5. i -4. dan u infuziji tijekom dva sata i uz prevenciju hemoragijskog cistitisa.

TBI 12 Gy u 3 do 6 frakcija -2., -1. i 0. dan.

5.4. Nemijeloablativna priprema/priprema smanjenog intenziteta:

5.4.1. Fludarabin + male doze TBI (nemijeloablativna priprema)

Fludarabin 30 mg/m²/dan -4.,-3. i -2. dan (3 dana)

TBI 2 Gy 0. dan nekoliko sati prije infuzije matičnih stanica

5.4.2. Fludarabin+Busulfan+ATG (priprema smanjenog intenziteta)

Fludarabin 30 mg/m² –10. do -5. dan (6 dana)

Busulfan per os ukupna doza 8 mg/kg primjenju- na u 4 doze od 1 mg/kg u dane -6. i -5. ili Busulfex i.v. – ukupna doza je 6.4 mg/kg primjenjena u dvije doze od 3.2 mg/kg svaka u 3-satnoj infuziji u dane -6. i -5.

ATG – Timoglobulin 2.5 mg/kg/dan kroz 3-4 dana u dane -4., -3., -2., (i -1.).

5.4.3. Fludarabin + Ciklofosfamid + ATG (nemije- loablativna priprema)

Ciklofosfamid 60 mg/kg tjelesne težine u dane – 7. i – 6. (uz prevenciju hemoragijskog cistitsa)

Fludarabin 25 mg/ m² u dane – 5., -4., -3., -2., -1.

ATG – Timoglobulin 2.5 mg/kg/dan kroz 3-4 dana u dane -4., -3., -2., (i -1.)

6. Prevencija reakcije transplantata protiv primaoca

6.1. **Ciklosporin i metotreksat** u standardnoj mijeloablativnoj pripremi.

6.2. **Ciklosporin i mofetil mikofenolat** u pripremi smanjenog intenziteta (RIC, mini allo)

CSP od dana – 3 do dana +90;

MMF od dana 0 - + 28 d 2 x 15 mg/kg u srodnjoj transplantaciji;

0 - + 45 d 3 x 15 mg/kg u ne- srodnjoj transplantaciji.

7. Izvorište stanica za transplantaciju

Izvorište stanica za transplantacije su:

7.1. Koštana srž

> 2,0 x 10⁸ stanica s jezgrom/ kg tjelesne težine bolesnika.

7.2. Periferna krv

> 3,0 x 10⁶ CD34+ stanica/kg tjelesne težine bolesnika (standardna priprema);

5 x 10⁶ CD34+ stanica/kg tjelesne težine bolesnika (u nemijeloablativnoj pripremi).

7.3. Krv iz pupkovine

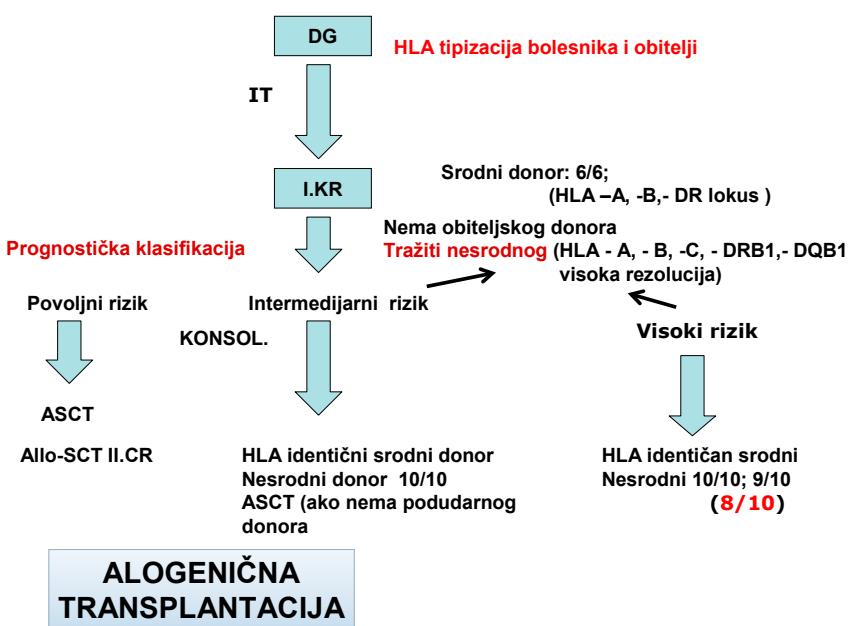
> 2,0 x 10⁷ stanica s jezgrom/kg tjelesne težine bolesnika;

> 1,2 x 10⁵ CD34+stanica /kg tjelesne težine bolesnika.

8. Vrijeme liječenja alogeničnom transplantacijom bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom

Za bolesnike s intermedijarnim ili nepovoljnim rizikom AML optimalno vrijeme liječenja alogenom transplantacijom je prva kompletna remisija, nakon konsolidacije. Za bolesnike s povoljnim rizikom liječenje se provodi u drugoj k ompletnoj remisiji. Slika 1. prikazuje slijed obrade i pretraživanja podobnog davatelja krvotvornih matičnih stanica. Odmah nakon što se postavi dijagnoza potrebno je u svih bolesnika s AML koji su kandidati za liječenje alogenom transplantacijom načiniti pretragu HLA tipizacije (bolesnik i članovi uže obitelji – roditelji, braća i sestre). Vrijeme od 4 tjedna koliko u prosjeku traje liječenje uvodnom terapijom dostatno je da se sazna rezultat HLA tipizacije bolesnika i njegove obitelji. Ako bolesnik ima srodnog podudarnog davatelja, liječenje alogenom transplantacijom se provodi, kako je već navedeno, nakon konsolidacije za bolesnike s nepovoljnom i intermedijarnom prognozom. Bolesnici s povoljnom prognozom liječiti će se alogenom transplantacijom u drugoj remisiji bolesti. Podobni srodnji davatelj je: 1. brat ili sestra oboljelog podudarni u 6/6 HLA antiga; 2. brat ili sestra oboljelog podudarni u 5/6 HLA antiga (u tom slučaju predlaže se načiniti i HLA tipizaciju visoke rezolucije da se potvrdi podudarnost u 9/10 ili 8/10 HLA antiga). 3. roditelji koji su fenotipski srodnici s bolesnikom u 6/6 HLA antiga (u tom slučaju predlaže se načiniti i HLA tipizaciju visoke rezolucije da se potvrdi podudarnost u 8/10 ili 9/10 HLA antiga). Ako u obitelji nema podudarnog davatelja u slučaju intermedijarnog ili nepovoljnog rizika odmah se pokreće (na kraju uvodne terapije, a prije konsolidacije) postupak pretraživanja nesrodnog darivatelja. Istodobno se u bolesnika načini i HLA tipizacija visoke rezolucije. U prosjeku pretraživanje traje oko 3 mjeseca. Za bolesnike s intermedijarnom prognozom i nesrodnim darivateljem koji je podudaran u 10/10 antiga provodi se liječenje alogeničnom transplantacijom. Za bolesnike nepovoljne prognoze podobni nesrodnji darivatelj treba biti podudaran u 10/10 ili 9/10 antiga. Iznimno se može koristiti davatelj podudarnosti u 8/10 antiga (bolesnici s vrlo nepovoljnom prognozom).

Slika 1. Slijed obrade bolesnika i liječenje alogeničnom transplantacijom.



Legenda: DG – dijagnoza, ASCT – autologna transplantacija, Allo-SCT – alogenična transplantacija, CR – kompletna remisija, KONSOL. - konsolidacija

9. Zaključak

Alogeničnom transplantacijom matičnih krvotvornih stanica u postremisijskom liječenju bolesnika s akutnom mijeloičnom leukemijom postiže se najbolja kontrola bolesti. Međutim, učinak alogenične transplantacije na preživljjenje ovih bolesnika kompromitiran je toksičnošću postupka s još uvijek visokim morbiditetom i mortalitetom najčešće vezanim za reakciju transplantata protiv primaoca (GvHD, engl. Graft versus Host Disease) u kombinaciji s teškim infekcijama. Konična reakcija transplantata protiv primaoca značajno utječe na kvalitetu života bolesnika i veliki je rizik njihova morbiditeta i mortaliteta. Zbog toga je nužno prepoznati bolesnike koji od alogenične transplantacije mogu dobiti najveći protuleukemijski učinak uz najmanju toksičnost.

Transplantacijom od HLA podudarnog nesrođnog darivatelja značajno se povećao broj bolesnika koji se mogu liječiti alogeničnom transplantacijom. Rezultati nesrodne transplantacije još uvijek su nešto lošiji od rezultata obiteljske transplantacije. Uvođenjem HLA tipizacije tehnikom visoke rezolucije rezultati su jednaki onima obiteljske transplantacije. Pripremom za transplantaciju smanjenog intenziteta, dobna granica za alogeničnu transplantaciju pomaknuta je prema starijim životnim skupinama, a alogenična transplantacija je moguća i kod bolesnika s bolestima drugih organskih sustava bez pove-

ćanja toksičnosti samog postupka.

Rezultati liječenja alogeničnom transplantacijom u akutnoj mijeloičnoj leukemiji najbolji su ako se liječenje primjeni u prvoj kompletnoj remisiji bolesti. Zbog toga je nužno već kod postavljanja dijagnoze načiniti HLA tipizaciju bolesnika i njegove obitelji. U slučaju da ne postoji HLA podudarni srođni darivatelj, u bolesnika intermedijarnog i visokog rizika odmah se pokreće postupak pretraživanja svjetskih registara dobrovoljnih darivatelja matičnih krvtovornih stanica kako bi se što prije pronašao podudarni darivatelj i time pružila mogućnost liječenja alogeničnom transplantacijom u optimalnoj fazi bolesti.

Literatura:

- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson LA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppole GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115:453-474.
- Gupta V, Tallman MS, Weisdorf DJ. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia: myths, controversies, and unknowns. *Blood*. 2010 Nov 22. [Epub ahead of print]
- Blaise D, Farnault L, Faucher C, Marchetti N, Fürst S, El Cheikh J, Ladaique P, Vey N, Bouabdallah R, Stoppa AM, Lemerle C, Calmels B, Prebet T, Castagna L, Chabannon C, Mohty M, Esterni B. Reduced-intensity conditioning with Fludarabin, oral Busulfan, and thymoglobulin allows long-term disease control and low transplant-related mortality in patients with hematological malignancies. *Exp Hematol*. 2010; 38:1241-50.
- Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40:373-383.
- Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106:2912-2919
- Suciù S, Mandelli F, de Witte T, Zittoun R, Gallo E, Labar B, De Rosa G, Belhabri A, Giustolisi R, Delarue R, Liso V, Mirto S, Leone G, Bourhis JH, Fioritoni G, Jehn U, Amadori S, Fazi P, Hagemeyer A, Willemze R. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. *Blood*. 2003; 102:1232-1240.
- Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Gratwohl A, Masszi T. Haematopoietic Stem Cell Transplantation, The EBMT Handbook, 2008.

Policitemija vera - konačni prijedlog dijagnostičkih i terapijskih smjernica te kriterija odgovora na liječenje

Dubravka Čaržavec¹, Boris Labar², Branimir Jakšić³, Ljubica Škare-Librenjak⁴, Antica Duletić-Načinović⁵, Jasminka Petričević-Sinčić⁶, Božena Coha⁷, Velka Gverić-Krečak⁸, Elizabeta Čorović⁹, Zlatka Nemet-Lojan¹⁰, Renata Babok-Flegarić¹¹, Tajana Štoos Veić¹², Rajko Kušec¹³, za Radnu skupinu KROHEMA za Ph^{neg} mijeloproliferativne neoplazme

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

² Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, 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, Split

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

⁶ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, KBC Osijek, Osijek

⁷ Internistički odjel, OB Josip Benčević, Slavonski Brod

⁸ Internistički odjel, OB Šibenik, Šibenik

⁹ Internistički odjel, OB Dubrovnik, Dubrovnik

¹⁰ Internistički odjel, OB Koprivnica, Koprivnica

¹¹ Internistički odjel, OB Varaždin, Varaždin

¹² Odjel za citologiju i protočnu citometriju,

KB Dubrava, Zagreb

¹³ Odjel za hematologiju, Klinika za unutrašnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Dubrava, Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Dubravka Čaržavec, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti,

Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: dubravka.carzavec@zg.t-com.hr

Prof. dr. sc. Rajko Kušec, dr. med.

Odjel za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Dubrava

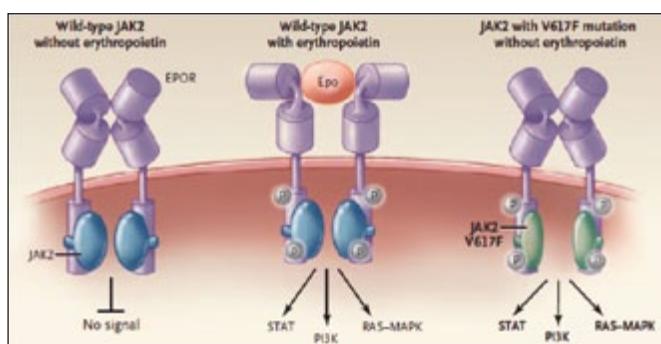
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: rkusec@kdb.hr

Policitemija vera je kronična mijeloproliferativna neoplazma (MPN) karakterizirana povišenom pro-dukcijom eritrocita neovisno o mehanizmima koji normalno reguliraju eritropoezu (1).

Fundamentalni napredak u razumijevanju molekularne patogeneze klasičnih bcr-abl negativnih MPN ostvaren je 2005.g. otkrićem JAK2V617F mutacije u većine bolesnika.

Stečenom mutacijom tirozin kinaza je stalno ak-tivna te dovodi do fosforilacije unutarstaničnih gla-nnika i proliferacije stanice (Slika 1.).



Slika 1. JAK2 se sastoji od dvije simetrične podjedinice od kojih jedna posjeduje inhibitornu aktivnost a druga aktivacijsku aktivnost. V617F mutacija je locirana na pseudokinaznoj domeni JAK2 koja sprječava aktivaciju kinazne domene.

Još uvijek je nejasno kako jedna V617F mutacija može biti baza za različite kliničke poremećaje, a vjerojatno se radi o učinku različite količine i opterećenju mutiranim alelima u pojedinim entitetima. Tako esencijalna trombocitemija ima manji postotak homozigotnih mutacija odnosno mutirane mase DNA u odnosu na stanje policitemije vere ili primarne mijelofibroze.

Procjenjuje se da je JAK2V617F mutacija prisutna u oko 96% bolesnika s policitemijom verom, 55% bolesnika s esencijalnom trombocitemijom (ET) i 65% s primarnom mijelofibrozom (PMF) (2). Približno 3% bolesnika s PV koji su JAK2V617F negativni ima mutaciju u eksonu 12 gena JAK2, koja dovodi do autonomne stanične proliferacije na sličan način kao JAK2V617F mutacija, a udružena je češće s izoliranom eritrocitozom i mlađom dobi pri dijagnozi (3).

Dijagnoza PV tradicionalno je predstavljala izazov zbog sličnosti s raznim reaktivnim stanjima i značajnog fenotipskog preklapanja različitih MPN. Detekcija mutacija nedvojbeno dokazuje klonsku proliferaciju i isključuje mogućnost reaktivne eritrocitoze, trombocitoze ili mijelofibroze. Ipak, postoja-

nje mutacija ne određuje jednoznačno koji od MPN entiteta, osim što JAK2 exon 12 mutacija još nije evidentirana izvan PV.

Tablica 1. WHO kriteriji za dijagnozu PV.

Dostupnost novih molekularnih biljega olakšava potvrdu dijagnoze te su uključeni u **dijagnostičke kriterije WHO za PV**, iz 2008. godine (Tablica 1.).

| <i>Kriteriji za dijagnozu policitemije vere (PV)</i> | |
|--|---|
| <i>VELIKI kriteriji</i> | I. Hemoglobin >185 g/L za muškarce, >165 g/L za žene ili drugi dokaz povisene mase eritrocita II. Postojanje JAK2 V617VF ili druge funkcionalno slične mutacije (kao što je JAK2 exon 12 mutacija) |
| <i>mali kriteriji</i> | 1. Biopsija koštane srži koja pokazuje hipercelularnost za dob, s trilinijskom proliferacijom. 2. Koncentracija eritropoetina ispod referalnog raspona. 3. Spontani rast eritroidnih kolonija <i>in vitro</i> . |

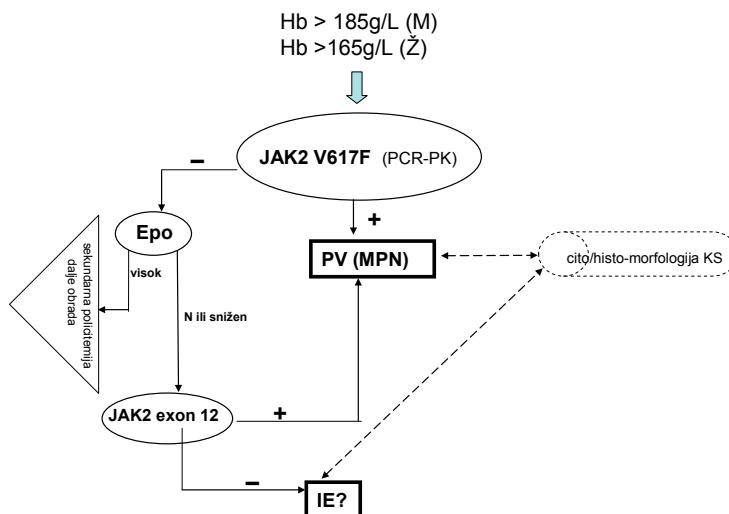
$$PV = I + II + 1/3 \quad ili \quad I + 2/3$$

prema Tefferi A, Vardiman JW. Leukemia 2008;22:14, Swerdlow SH. WHO classif. 4th Ed. IARC, 2008

U kliničkoj hematološkoj praksi za obradu eritrocyoze moguće je izdraditi praktični **dijagnostički algoritam** (Slika 2.) koji počinje s određivanjem JAK2V617F mutacije iz stanica periferne krvi. Detekcija JAK2V617F mutacije je visoko senzitivna (97%) i gotovo 100% specifična za razlikovanje PV od drugih uzroka povišenog hematokrita (4). Da se izbjegne mogućnost lažno pozitivnog ili negativnog mutacijskog testa paralelno se preporučuje odrediti i serumsku razinu eritropoetina koja je snižena u 85% pacijenata s PV.

Slika 2.

Postupnik za obradu policitemije/poliglobulije



Budući da je liječenje PV-a usmjereno na snižavanje rizika od tromboze, **stupnjevanje rizika** je zasnovano na procjeni vjerojatnosti trombotskih

Kod JAK2V617F negativnih bolesnika s normalnim i sniženim vrijednostima eritropoetina treba učiniti molekularnu analizu JAK2 exon 12 mutacije (metodološki zahtjevnije od dokazivanje V617F mutacije), a ako je ona nedostupna preporučuje se učiniti biopsiju kosti s patohistološkom analizom kao i citološku analizu s mijelogramom. Današnji je stav hematološke struke da pregled koštane srži nije neophodan za dijagnozu PV kod bolesnika koji ispunjavaju dijagnostičke kriterije, prevenstveno pozitivan molekularni test mutacije JAK2V617F.

komplikacija. Dob iznad 60 godina i anamneza kardiovaskularnih događaja su dva rizična faktora koja svrstavaju bolesnike u skupine niskog i visokog ri-

zika. Jasna povezanost između broja trombocita i vaskularnih incidenata nije dokazana, no zbog mogućeg stečenog deficit-a von Wilebrandovog faktora i potencijalnog rizika krvarenja, bolesnici niskog rizika s ekstremnom trombocitozom ($\text{trombociti} > 1000 \times 10^9/\text{L}$) promatraju se izdvojeno (5). Leuko-citoza i anemija također imaju negativan učinak na preživljjenje, ali još nisu prospektivno vrednovane. Pušenje je povezano s povиšenim rizikom arterijske tromboze i treba savjetovati prestanak, a kod žena izbjegavati hormonsku terapiju (6).

Liječenje bolesnika s PV je usmjereni na kontrolu eritrocitoze putem flebotomija, samih ili uz dodatak citoreduktivnih lijekova. Indikacije za terapiju ovise o rizičnim kategorijama bolesnika (Tablica 2.). Bolesnici niskog rizika liječe se samo flebotomijama, dok se kod visokorizičnih bolesnika savjetuje i citoreduktivna terapija. Ciljne vrijednosti hematokrita su 45%, no kod bolesnika na terapiji acetilsalicilnom kiselinom može se tolerirati hematokrit do 50% (7). Niske doze acetilsalicilne kiseline (50-100 mg dnevno) propisuju se neovisno o rizičnoj kategoriji uz oprez kod visoke trombocitoze ili drugih kontraindikacija. Citoreduktivna terapija se ponekad propisuje i kod bolesnika niskog rizika zbog ne-podnošenja ili prečestih (više od 1x mjesечно) flebotomija, simptomatske splenomegalije, progresivne mijeloproliferacije koja se manifestira leukocitozom i ekstremnom trombocitozom te teškim općim simptomima uključujući svrbež.

U prvu liniju citoreduktivne terapije ulaze hidroksigure i interferon- α u bilo kojoj dobi. Hidroksigure se treba koristiti s oprezom kod mlađih osoba (dob < 40 god.), a busulfan (eventualno) dolazi u obzir kod starijih (dob > 70 god.) (8).

Tablica 2. Konvencionalno liječenje PV ovisno o rizičnim čimbenicima.

Liječenje

| Kategorija rizika | Rizični čimbenici | Liječenje* |
|--|--|---|
| niski | dob < 60 g i bez ranijih kardiovaskularnih dogadaja | ✓ Flebotomija i niske doze ASK |
| niski s $\text{trb} > 1000 \times 10^9/\text{L}$ | | ✓ Niske doze ASK ako je aktivnost kofaktora ristocetina $> 30\%$ |
| visoki | dob > 60 g i /ili raniji kardiovaskularni dogadaji | ✓ mijelosupresija: HYU \pm flebotomija ✓ IFN α (i pegilirani) ✓ Niske doze ASK |

* za očekivati je promjene u dostupnosti lijekova u smislu moguće primjene pegiliranih oblika interferona te skoru registraciju oralnih inhibitora JAK2.

Za praćenje odgovora na konvencionalnu citoreduktivnu terapiju bolesnika s PV treba koristiti European LeukemiaNet preporuke koji definiraju **kliničko-hematološke kriterije terapijskog odgovora** (Tablica 3.). Izvan kliničkih studija ne savjetuje se praćenje molekularnog odgovora (kvantitativno određivanje opterećenja JAK2V617F mutacijom) kao niti serijske evaluacije koštane srži.

Tablica 3.

Kriteriji kliničko-hematološkog terapijskog odgovora

Kompletan odgovor

- 1) Hematokrit $< 45\%$ bez flebotomije i
- 2) Trombociti $\leq 400 \times 10^9/\text{L}$ i
- 3) Leukociti $\leq 10 \times 10^9/\text{L}$ i
- 4) normalna veličina slezene (UZVom/CT-om) i
- 5) bez simptoma vezanih za bolest*

* mikrovaskularne smetnje, svrbež i glavobolja

Parcijalni odgovor

Bolesnici koji ne ispunjavaju kriterije za kompletan odgovor,

- hematokrit $< 45\%$ bez flebotomije ili
- odgovor u 3 ili više drugih kriterija.

Bez odgovora

Bilo koji odgovor koji ne zadovoljava Parcijalni odgovor

ELN MPN Working group, Blood 2009

Literatura:

- WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008.
- Vannucchi AM, Antonioli E, Gugliemelli P, et al. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: A critical reappraisal. Leukemia. 2008;22:14-22.
- Scott LM, TongW, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med. 2007;356:459-468.
- James C, Delhommeau F, Marzac C, et al. Detection of JAK2V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. Leukemia. 2006;20:350-353.
- Budde U, Schaeler G, Mueller N, et al. Acquired von Wilebrand's disease in myeloproliferative syndrome. Blood. 1984;64:981-985.
- Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: pathogenetic mechanisms and prevention. Best Pract Res Clin Hematol. 2006;19:617-633.
- Di Nisio M, Barbui T, Di Gennaro L, Borelli G, Finazzi G, Landolfi R, et al. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. Br J Haematol. 2007;136:249-259.
- Barbui T, Barosi G, Burgegard G, et al., Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2011;29:761-770.

Dijagnostičko terapijski pristup u bolesnika s Philadelphia pozitivnom krovičnom mijeloičnom leukemijom

Smjernice Hrvatske kooperativne grupe za hematoloških bolesti –KROHEM*

Boris Labar¹, Dubravka Sertić¹, Sanja Davidović², Renata Zadro³, Ružica Lasan Trčić², Rajko Kušec⁴, Branimir Jakšić⁵, Ljubica Škare-Librenjak⁶, Antica Duletić-Načinović⁷, Jasmina Petričević-Sinčić⁸, Dubravka Čaržavec⁹, Velka Gverić-Krečak¹⁰, Božena Coha¹¹, Elizabeta Čorović¹², Zlatka Nemet-Lojan¹³, Renata Babok-Flegarić¹⁴

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

² Citogenetski laboratorij, Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb

³ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb

⁴ Odjel za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Dubrava, Zagreb

⁵ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Merkur, Zagreb

⁶ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, KBC Split

⁷ Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, KBC Rijeka

⁸ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, KBC Osijek, Osijek

⁹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Sestre Milosrdnice, Zagreb

¹⁰ Internistički odjel, OB Šibenik, Šibenik

¹¹ Internistički odjel, OB Josip Benčević, Slavonski Brod

¹² Internistički odjel, OB Dubrovnik, Dubrovnik

¹³ Internistički odjel, OB Koprivnica, Koprivnica

¹⁴ Internistički odjel, OB Varaždin, 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

1.0. Uvod

Philadelphia pozitivna krovična mijeloidna leukemija (Ph+ KML) je klonalna bolest matičnih krvotvornih stanica i/ili prethodnih nezrelih stanica mijeloidne loze. Ubraja se prema podjeli Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) u mijeloproliferativne zločudne tumore. Najčešća je u srednjoj i starijoj dobi no pojavljuje se i u mlađih ljudi. Godišnja incidencija iznosi oko jedan slučaj na 100 000 stanovnika. Čini oko 20% svih slučajeva leukemije (1).

Temeljna značajka bolesti je postojanje kromosomalne promjene, Philadelphia (Ph) kromosoma, nazvane po američkom gradu u kojem su je otkrili znanstvenici (2). Tehnikama pruganja dokazano je da Ph kromosom nastaje kao posljedica balansirane translokacije genetskog materijala između kromosoma 9 i 22, pa se označuje kao t(9;22) (q34.1;q11.21).

Ph kromosom je prisutan u krvotvornim stanicama bolesnika s KML ali ne i u stanicama drugih tkiva (3). Ta stečena somatska mutacija zapravo uzrokuje promjenu pozicije dva proto-onkogena: c-abl i c-sis. C-sis je normalno smješten na kromosomu 22 te u formiranju Ph1 kromosoma biva premješten na kromosom 9. Obratno c-abl koji se normalno nalazi na kromosomu 9 biva prebačen u tzv. bcr (engl. *break cluster region*) područje na kromosomu 22 stvarajući tamo novi kimerični gen bcr/abl. Novi gen prepisuje se u mRNA koji stvara protein od 210-kD, nazvan p210^{BCR-ABL} onkoprotein (4). Novonastali hibridni gen može se dokazati molekularnim tehnikama određivanjem BCR-ABL prijepisa. To je danas najobjektivniji i najosjetljiviji dijagnostički postupak za otkrivanje i praćenje Ph+ KML.

Klinički Ph+KML prolazi više faza od tzv. sta-

* Napomena: Ovaj tekst će biti primarno tiskan u časopisu "Medicina Fluminensis", časopisu Hrvatskog liječničkog zbora – Podružnica Rijeka, te Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, u prosincu 2011. godine, volumen 47, broj 4.

bilne kronične faze (može trajati više godina), preko ubrzane faze (traje od 6-12 mjeseci), do blastične krize, koja ako se ne lijeći zavrašava letalnim ishodom za svega 1-3 mjeseca (5).

U ovom su radu prikazane smjernice dijagnostičkog i terapijskog pristupa Ph+KML Hrvatske koooperativne grupe za liječenje hematoloških bolesti - KROHEM.

2.0. Metode

2.1. Podjela mijeloproliferativnih zločudnih tumora i Ph+KML

Dijagnoza Ph+KML polazi od podjele mijeloidnih zločudnih tumora SZO (6). Načela i preporuka SZO kako i kada uzimati uzorak za analizu, na kojim uzorcima provoditi koje analize, kako se odre-

đuje broj, postotak ili tip blasta, te na koji način se određuju genske promjene navedeni su u smjernica KROHEM-a „Dijagnostičko-terapijski pristup u bolesnika s esencijalnom trombocitemijom“ (7).

2.2. Razina terapijske preporuke

Razina terapijskih preporuka temelji se na kriterijima koje su predložili urednici elektronskog informativnog izvora poznatog pod imenom UpToDate. UpToDate je dostupan preko WEB stranice (8). Razina preporuke se dijeli temeljem snage preporuke na jaku i slabu, a temeljem međuodnosa prednosti i rizika, određena je kakvoća dokaza i njihova klinička prihvatljivost odnosno određena je velika, umjerena i mala razina dokaza (Tablica 1.).

2.3. Izrada i prihvatanje smjernica

Radna skupina koja potpisuje ovaj rad izradila je

Tablica 1. Razina preporuke prema UpToDate (8).

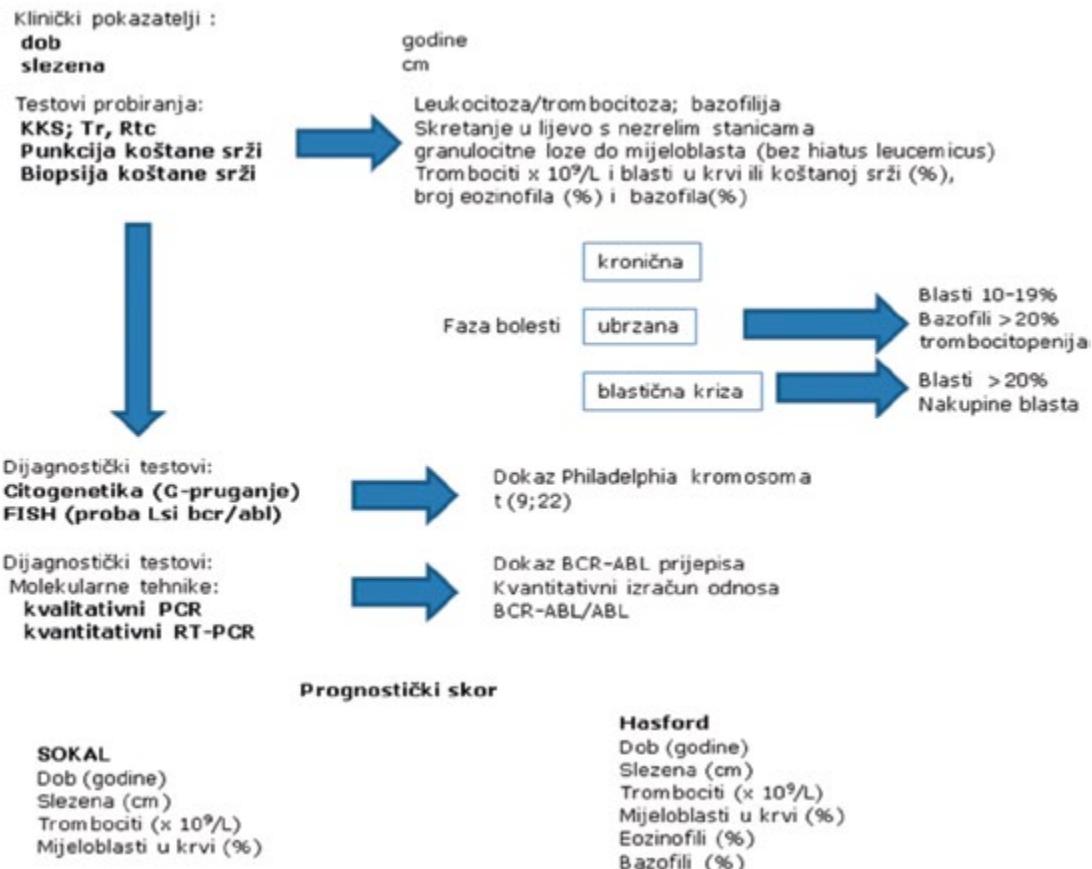
| RAZINA PREPORUKE | JASNOĆA MEĐUODNOSA PREDNOST/RIZIK | KAKVOĆA DOKAZA | IMPLIKACIJE |
|--|--|--|---|
| 1A. Jaka preporuka, velika razina dokaza | Prednosti se jasno razlikuju i znatno su veće od rizika i izdataka ili obrnuto. | Čvrsti dokazi temeljem dobro provedenih randomiziranih, kontroliranih kliničkih 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 velika razina 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 umjerena razina 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 bolje za 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. |

prijedlog smjernica koji je predstavljen na sastanku radne skupine za KML KROHEMA (Zagreb, ožujak, 2011). Smjernice su prihvaćene na redovitom sastanku KROHEM-a dana 13. 05. 2011. u Tuheljskim Toplicama.

3.0. Dijagnoza Ph+ KML

Dijagnostički pristup Ph+ KML temelji se na dokazu postojanja Ph+ kromosoma. U dijagnostičkom pristupu razlikujemo testove probiranja koji ukazuju na bolest i dijagnostičke testove koji dokazuju Ph+ kromosom (citogenetika) ili BCR-ABL prijepis (molekularne tehnike). Uz dijagnozu važno je procijeniti i prognozu (rizik) bolesti (9,10) iako rizik ne mijenja inicijalni terapijski pristup. Dijagnostički pristup prikazuje Slika 1.

Dijagnostički pristup:



Slika 1. Dijagnostički pristup u bolesnika s Ph+KML.

Nalaz krvne slike upućuje na Ph+ KML ako je prisutna leukocitoza sa skretanjem u lijevo i pojmom nezrelih stanica granulocitne loze bez *hiatus leucemicus** (prisutne vrlo nezrele, prijelazne i zrele stanice granulocitopoeze), uz povećani broj bazofilnih i eozinofilnih granulocita, te povećani broj trom-

bocita. Rijetko se bolest pri dijagnozi očituje slikom ubrzane faze ili blastičnom krizom (vidi Tablicu 2.). U slučaju sumnje na Ph+KML od ostalih testova probiranja potrebno je načiniti punkciju koštane srži (pokazuje % blasta). Sama biopsija koštane srži pri dijagnozi nema veliku vrijednost.

Tablica 2. Dijagnostički pokazatelji ubrzane faze i blastične krize Ph+ KML.

| Kriteriji SZO | Ostali kriteriji |
|---|--|
| Kronična faza | |
| <ul style="list-style-type: none"> Nepostojanje kriterija ubrzane faze i blastične krize | <ul style="list-style-type: none"> Nepostojanje kriterija ubrzane faze i blastične krize |
| Ubrzana faza | |
| <ul style="list-style-type: none"> Blasti u krvi ili koštanoj srži 10%-19% Bazofili u krvi $\geq 20\%$ Trajna trombocitopenija (tromobociti $< 100 \times 10^9/L$) neovisno o liječenju Trombocitoza ($> 1000 \times 10^9/L$) rezistentna na liječenje Povećanje slezene i broja leukocita rezistentnih na liječenje Citogenetski dokaz klonalne evolucije (pojava nove/dodatne genske promjene koja nije postojala kod dijagnoze) | <ul style="list-style-type: none"> Blasti u krvi ili koštanoj srži 10%-19% Bazofili u krvi $\geq 20\%$ Trajna trombocitopenija (tromobociti $< 100 \times 10^9/L$) neovisno o liječenju |
| Blastična kriza | |
| <ul style="list-style-type: none"> Blasti u krvi ili koštanoj srži $> 20\%$ Ekstramedularna proliferacija blasta Velika žarišta/nakupine blasta u koštanoj srži | <ul style="list-style-type: none"> Blasti u krvi ili koštanoj srži $> 30\%$ |

Ako se testovima probiranja postavi sumnja na Ph+KML nužno je citogenetikom i molekularnim tehnikama dokazati Ph kromosom. Od citogenetskih tehnika prvenstveno se koristi klasični kariogram (G-pruganje). Citogenetikom se u većine bolesnika (u više od 95% bolesnika) dokaže tipična translokacija, t(9;22) odnosno Ph kromosom (11). Kariogram je vrijedan i u procjeni prisustva drugih kromosomske promjene koje često ukazuju ili na povećani rizik progresije bolesti ili su znak ubrzane faze ili blastične krize. Kariogram je potrebno odrediti u najmanje 20 staničnih metafaza koštane srži (12). Primjena fluorescentne *in-situ* hibridizacije (FISH) u otkrivanju Ph kromosoma pri dijagnozi nema veće vrijednosti, jer s jedne strane potvrđuje već „poznati“ nalaz kariograma, pri čemu za razliku od kariograma ne otkriva dodatne kromosomske promjene. Kako Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje (HZZO) u svojim preporukama procjenju terapijskog odgovora temelji na nalazu FISH-a, preporuka je određivati FISH pri dijagnozi (bazična vrijednost s kojom se uspoređuju kontrolni nalazi i procjenjuje terapijski uspjeh – vidi Tablicu 8.). Za in-

terfazni FISH koristi se dvostruko obojena dvostruka fuzijska proba s kojom se ispituje najmanje 200 staničnih jezgara (13). Molekularne tehnike koje koriste metodu polimerazne lančane reakcije (PCR) ponajprije obrnutom transkriptazom (RT-PCR) danas su standardni dijagnostički postupak kako pri dijagnozi tako i u praćenju terapijskog odgovora. Kvantitativni RT-PCR gotovo je u potpunosti potisnuo kvalitativni zbog mogućnosti procjene veličine leukemijskog klena a time i procjene terapijskog odgovora. Dijagnostička vrijednost molekularnih tehnika ogleda se u dokazu BCR-ABL prijepisa u onih bolesnika u kojih citogenetikom nije utvrđena translokacija t(9;22). Veća je vrijednost ovog testa u procjeni terapijskog odgovora. Razina BCR-ABL prijepisa pri dijagnozi početna je vrijednost s kojom se uspoređuju kontrolni nalazi tijekom liječenja (14).

Dijagnostičke kriterije za ubrzani fazu bolesti i blastičnu krizu prikazuje Tablica 2. U Smjernicama se za blastičnu krizu a prema SZO predlaže kvantitativni pokazatelj broja blasta od $\geq 20\%$, slično kao i za akutne leukemije. U literaturi će se još uvijek naći i kriterij od $\geq 30\%$ blasta.

* hiatus leucemicus je nalaz diferencijalne bijele krvne slike u perifernoj krvi s vrlo nezrelim stanicama granulocitopoeze (blasti) uz poneki granulocit, a bez prijelaznih nezrelih oblika (npr. mijelociti, metamijelociti).

Tablica 3. prikazuje način izračuna Sokalovog i Hasfordovog (Europskog) prognostičkog rizičnog skora pri dijagnozi. Rizični skor ima prognostičku

Tablica 3. Izračun prognostičkog rizičnog skora za KML.

| Naziv | Izračun | Rizik |
|---|--|---|
| Sokal skor ⁹ | $0.0116 \times (\text{dob/god} / + 0.0345 \times \text{slezena/cm} / - 7.51) + 0.188 \times (\text{tr} / 700)^2 - 0.563 / + 0.0887 \text{ b}$ (blasti – 2.10) | Mali rizik < 0.8 Srednji rizik 0.8 – 1.2 Veliki rizik > 1.2 |
| Hasfordov (Europski) skor ¹⁰ | $0.666 \text{ za } \text{dob} \geq 50 \text{ god.} + (0.042 \times \text{slezena}) + 1.0956 \text{ ako su tr.} > 1500 \times 10^9/\text{L} + (0.0584 \times \text{blasti}) + 0.20399 \text{ ako su bazo} > 3\% + (0.0413 \times \text{eozinofili}) \times 100$ | Mali rizik ≤ 780 Srednji rizik 781 – 1480 Veliki rizik > 1480 |

4.0. Terapija Ph+ KML

4.1. Liječenje u prvoj kroničnoj fazi bolesti

U prvoj liniji terapije Ph+KML kronične faze terapija izbora je jedan od tri inhibitora tirozin kinaze (TKI): imatinib (Glivec), dasatinib (Sprycel) ili nilotinib (Tasigna). Inhibitori druge generacije dasatinib i nilotinib pokazuju bolji antileukemijski učinak u usporedbi s imatinibom (17–22). Za očekivati je da će ovaj povoljniji antileukemijski učinak dovesti i do duljeg preživljjenja. Temeljem tih pokazatelja i dobre podnošljivosti lijekova oba su lijeka registrirana od strane FDA i EMEA za prvu liniju terapije. Kako je praćenje liječenja imatinibom najdulje, i u sadašnjem trenutku preko 8 godina kriteriji uspješnosti liječenja temelje se na procijeni terapijskog odgovora primjene imatiniba u kroničnoj fazi Ph+KML (23,24) (Tablica 4.). U bolesnika s dobrim terapijskim odgovorom imatinib se trajno primjenjuje, dobro se podnosi, a kvaliteta života liječenih bolesnika usporediva je s kvalitetom zdravih osoba slične dobi.

Ostali terapijski postupci koriste se sporadično. Hidroksireja se inicijalno primjenjuje u bolesnika s vrlo visokim brojem leukocita i u bolesnika u kojih još nije odobrena primjena imatiniba (25). U projektu liječenje hidroksirejom malokad traje dulje od 4 tjedna. Interferon je do pred 10-ak godina bio inicijalna terapija ponajprije u bolesnika koji se nisu mogli liječiti alogenom transplantacijom (stariji bolesnici i bolesnici bez HLA-podudarnog davatelja) (26). No zbog svoje značajno manje učinkovitosti i veće toksičnosti danas se u usporedbi s imatinibom praktički ne koristi u liječenju Ph+ KML. Istodobna primjena interferona i imatiniba čini se da može po-

vrijednost i kod primjene inhibitora tirozin kinaze (15,16).

lučiti bolji početni terapijski odgovor. Uz primjenu pegiliranog interferona pojavnost nuspojava je prihvatljiva i značajnije ne mijenja kvalitetu života bolesnika (27). Međutim treba reći da za sada ne postoje uvjerljivi dokazi kako je dugotrajno liječenje s ova dva skupa lijeka bolje od primjene samog imatiniba s obzirom na dugotrajno preživljjenje. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica od HLA-podudarnog darivatelja svakako je najučinkovitiji terapijski pristup jer u značajnog broja bolesnika može dovesti do izliječenja (28). No zbog brojnih ozbiljnih komplikacija smrtnost je velika i neprihvatljiva u usporedbi s rezultatima liječenja inhibitorima TKI. Stoga se transplantacija danas primjenjuje u bolesnika u kojih je došlo do progresije bolesti i/ili u bolesnika koji su razvili rezistenciju na inhibitore TKI (29–31).

4.2. Praćenje i procjena terapijskog odgovora

Procjena terapijskog odgovora od ključne je važnosti za uspjeh liječenja, jer terapijski odgovor određuje svrsishodnost dalnjeg liječenja TKI odnosno ukazuje na potrebu promjene terapije. Već je navedeno da se pri dijagnozi nastoji utvrditi terapijski rizik. Tijekom liječenja procjena se temelji na metodama koje određuju veličinu ili postotak stanica leukemijskog klona. Važan parametar procjene je i brzina smanjenja broja leukemijskih stanica. Danas postoji konsenzus ekspertnih skupina koja razina veličine leukemijske mase za većinu liječenih pretpostavlja dugotrajno dobar terapijski učinak: normalan život s minimalnom leukemijskom masom. U posljednje je vrijeme razvijeno nekoliko sustava koji objektiviziraju terapijski odgovor. Terapijski odgovor je određen kao optimalan, suboptimalan i neuspješan (Tablica 4.) (32).

Tablica 4. Definicija razine terapijskog odgovora (32).

| |
|---|
| 1. Optimalan odgovor: Nema pokazatelja da će se promjenom terapije poboljšati preživljenje koje u sadašnjem trenutku nakon 7-8 godina iznosi preko 90%. |
| 2. Suboptimalan odgovor: Dugotrajno se u bolesnika može postići dobar odgovor nastavkom istog liječenja, ali su šanse za optimalan odgovor smanjene, pa je bolesnik kandidat za drugi vid liječenja. |
| 3. Neuspjeh liječenja: Dobar terapijski odgovor je malo vjerojatan. Bolesniku kad god je to moguće i ako je provedivo treba preporučiti drugi vid liječenja. |

Uz definiciju terapijskog odgovora ponajprije na liječenje inhibitorima TKI, KROHEM prihvaca kliničke, citogenetske i molekularne pokazatelje terapijskog odgovora predložene od radne skupine kronične mijeloične leukemije, Europske mreže za leukemiju (*European leukemia net – ELN*) (Tablica 5.) (32).

Tablica 5. Definicija terapijskog odgovora – KML kronična faza bolesti (32).

| Hematološki odgovor | Citogenetski odgovor | Molekularni odgovor |
|--|--|---|
| Kompletan: Trombociti < 450 x10 ⁹ /L Leukociti < 10 x 10 ⁹ /L DKS bez nezrelih granulocita < 5% bazofilnih granulocita Slezena normalne veličine | Kompletan: Ph+ = 0% Parcijalni: Ph+ = 1%-35% Mali: Ph+ = 36%-65% Minimalni: Ph+ = 66%-95% Bez odgovora: Ph+ = >95% | Kompletan: negativan (kvantitativni RT-PCR 2x)* Veliki: BCR/BCR-ABL ≤ 0.1% IS |

DKS – diferencijalna bijela krvna slika

* negativan nalaz kvantitativnog PCR mora se potvrditi u dva navrata u razmaku od mjesec dana

Vremenski slijed laboratorijskog praćenja i objektivizacije terapijskog odgovora, kao i kriterije koji upozoravaju na slabiji terapijski odgovor ili neuspjeh terapije prikazuje Tablica 6.

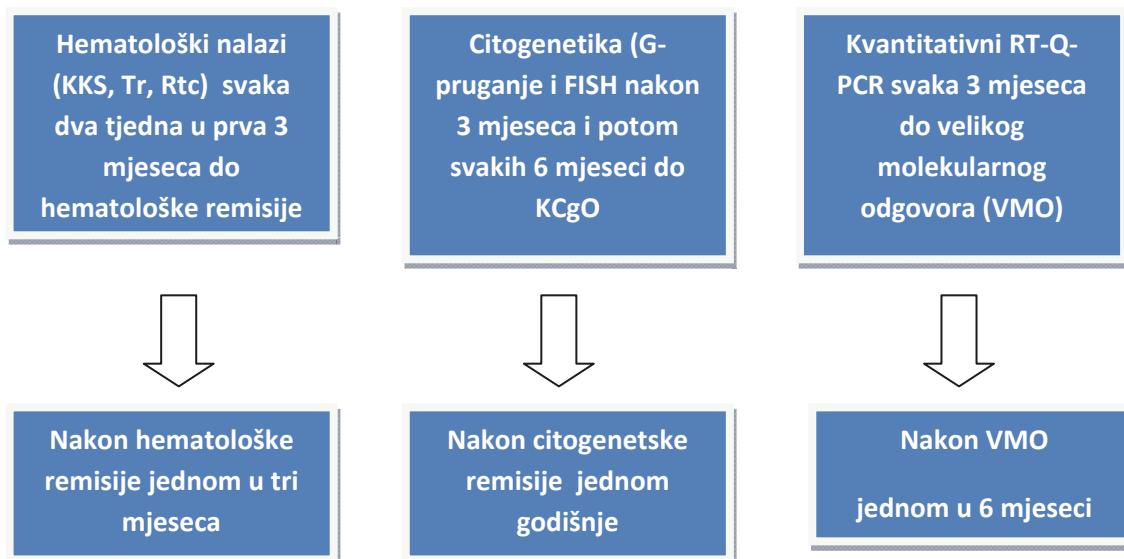
Tablica 6. Procjena terapijskog odgovora na imatinib – kronična faza KML (32).

| | Optimalni odgovor | Suboptimalni odgovor | Neuspjeh | Upozoravajući znaci |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---|--|
| Pri dijagnozi | 0 | 0 | 0 | Visoki rizik Dodatne kromosomske promjene u Ph+ stanicama |
| 3 mjeseca terapije | KHO + najmanje mali CgO (Ph+ ≤65%) | Bez CgO (Ph>95%) | Nije postignut KHO | 0 |
| 6 mjeseci terapije | Najmanje PCgO (Ph+<35%) | Mali ili minimalni CgO | Bez CgO (ph+>95%) | 0 |
| 12 mjeseci terapije | KCgO | PCgO (Ph+<35%) | Mali ili minimalni CgO (Ph+>35%) | Nije postignut veliki MolO |
| 18 mjeseci terapije | Veliki MolO | Nije postignut veliki MolO | Nije postignut KCgO | 0 |
| U bilo koje vrijeme terapije | Stabilan/bolji veliki MolO | Gubitak velikog MolO Mutacije | Gubitak KHO Gubitak KCgO Mutacije | Porast bcr-abl prijepisa Dodatne kromosomske promjene u Ph- stanicama |

0 = bez osobitosti; KHO = kompletan hematološki odgovor; CgO = citogenetski odgovor; PCgO = Parcijalni citogenetski odgovor; KCgO = kompletan citogenetski odgovor; MolO = molekularni odgovor;

Laboratorijsko praćenje i primjena hematoloških, citogenetskih i molekularnih metoda za procjenu terapijskog odgovora ponajprije ovisi o terapijskom odgovoru. Učestalost kontrola i laboratorijskog praćenja prikazuje Slika 2.

Slika 2. Laboratorijsko praćenje tijekom liječenja inhibitorima TKI (KKS – kompletna krvna slika, Tr – trombociti, Rtc – retikulociti, KCgO – kompletan citogenetski odgovor, VMO – veliki molekularni odgovor).



Praćenje terapijskog odgovora u našim uvjetima polazi i od preporuka Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje za liječenje imatinibom u bolesnika s Ph+ KML (Tablica 7.).

Tablica 7. Kriteriji HZZO za liječenje imatinibom.

| HZZO – Indikacije za liječenje imatinibom |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> Bolesnici s kroničnom mijeloičnom leukemijom u kojih je dokazan Philadelphia kromosom u prvoj kroničnoj fazi bolesti. Potrebita je citogenetska ili molekularna potvrda postojanja Philadelphia kromosoma u potvrđnom citogenetskom laboratoriju. Liječenje odobrava Zavod na prijedlog Bolničkog povjerenstva za lijekove, po preporuci specijalista internista hematologa do najviše 12 mjeseci. Daljnje liječenje odobrava se ukoliko je utvrđeno smanjenje udjela Philadelphia kromosoma za više od 50% od početne vrijednosti. Za liječenje odraslih bolesnika s neoperabilnim i /ili metastazirajućim malignim gastrointestinalnim stromalnim tumorima (GIST). Liječenje odobrava Zavod, na prijedlog Bolničkog povjerenstva za lijekove, a na prijedlog internističkog onkologa ili specijalista radioterapije i onkologije u KBC i KB do najviše 6 mjeseci. Za bolesnike s kroničnom mijeloičnom leukemijom kojima je dijagnoza postavljena u ubrzanoj fazi ili blastičnoj transformaciji. <p>Liječenje pod 1. i 2. odobrava se isključivo u dozi do 400 mg dnevno iz sredstava posebno skupih lijekova, a liječenje pod 3. odobrava se u početnoj dnevnoj dozi do 600 mg iz sredstava posebno skupih lijekova, najduže do 3 mjeseca.</p> |

Iz tablica je vidljivo da hematološki odgovor određuje krvna slika, koja u većine bolesnika nakon tri mjeseca liječenja zadovoljava kriterije kompletног odgovora. Postignut kompletni citogenetski odgovor prognostički je važan pokazatelj dugotrajne kontrole bolesti i dobrog terapijskog odgovora (33).

Iako postoje pokazatelji da se u manjem broju bolesnika odgovor može postići i nakon liječenja od godine dana bilo istom ili povećanom dozom imatiniba za sada nije sasvim jasno je li taj odgovor dugotrajan (34). Veliki i posebice kompletni molekularni odgovor praćen je također dugotrajnom kontrolom

bolesti bez znakova njene progresije uz normalnu kvalitetu života (35, 36). Prednost molekularnih tehnika za samog bolesnika očituje se dijelom u manjoj agresivnosti njihova izvođenja (dovoljno je kontrolirati bcr-abl prijepis u perifernoj krvi), kao i subjektivnom ali čini se opravdanom iščekivanju bolje procjene kontrole veličine leukemijske mase. No za sada nema dokaza da je veliki ili kompletan molekularni odgovor bolji pokazatelj od kompletног citogenetskog odgovora u procjeni terapijskog odgovora Ph+KML. Daleko veći problem je procjena suboptimalnog odgovora, jer za sada ne postoje čvrsti stavovi kako dugo provoditi liječenje imatinibom, je li uputno povećati njegovu dozu ili je li bolje odnosno kada započeti s inhibitorima TKI 2. generacije. Odgovor u ovom trenutku ovisi više o „paramediminskim kriterijima“ kao npr. raspoloživosti inhibitorima TKI, ekonomskim mogućnostima, dostupnosti kliničkih istraživanja i tako dalje.

4.3. Terapijski neuspjeh/promjena terapije u prvoj kroničnoj fazi bolesti ili druga linija terapije kronične faze Ph+ KML

Već je navedeno da je prva linija terapije jedan od tri TKI. U bolesnika s optimalnim terapijskim odgovorom liječenje se nastavlja istim lijekom u istoj dozi. U pravilnim vremenskim razmacima trajno se prati hematološki, citogenetski i molekularni odgovor. Nema pokazatelja je li moguće i kada prekinuti terapiju, pa ju treba trajno primjenjivati.

U slučaju neuspjeha na liječenje (obično nakon 6 mjeseci od početka terapije) ili u slučaju citogenetskog/molekularnog relapsa prijedlog je prekinuti terapiju prvom linijom i primjeniti drugi lijek iz skupine TKI u slučaju liječenja imatinibom. U različitim fazama liječenja primjenjuje se ili dasatinib ili nilotinib. Ne postoje pokazatelji koji je od ova dva TKI djelotvorniji. Izbor više ovisi o profilu toksičnosti, podnošljivosti i možda prisutnim mutacijama abl proteina (37, 38). Ako se primjenjuje jedan od dva TKI druge generacije kao prva linija terapije predlaže se nastaviti liječenje drugim lijekom (npr. ako je dasatinib prva linija treba primjeniti nilotinib i obrnuto).

U bolesnika u kojih se postigne suboptimalni odgovor nakon 6 mjeseci primjene imatiniba kao prve linije terapije potrebno je odrediti koncentraciju lijeka u serumu (39). Ako je koncentracija imatiniba unutar referentnih vrijednosti potrebno je promjeniti terapiju i nastaviti liječenje jednim od TKI druge generacije. Ako je koncentracija niža ne treba zanemariti mogućnost bolesnikove nesuradljivosti. U tim se slučajevima može povisiti doza imatiniba

(600 mg/dan) i bolesniku objasniti važnost redovitog uzimanja lijeka.

Prije bilo koje promjene terapije ponajprije u bolesnika koji u prvoj liniji primaju imatinib predlaže se ispitati postojanje rezistencije na TKI određivanjem točkastih mutacija abl proteina. Za sada se zna da postoji nešto više od 50 mutacija (40-42). Vrijedna je njihova podjela temeljem inhibicijske koncentracije imatiniba (IC_{50}) (43). Većina mutacija se inhibira koncentracijom koja je jednaka ili manja od 150 nM imatiniba. Relativno su rezistentne 4 mutacije (Y253F/H i E255 K/V) (44) koje se inhibiraju kod koncentracije iznad 150 nM, a T315I mutacija pokazuje izrazitu rezistenciju i inhibira se pri koncentraciji većoj od 10,000 nM. Naš laboratorij mjeri navedenih 5 mutacija srednje i visoke rezistencije. Preporuka je prvo odrediti T315I mutaciju. Njen dokaz ukazuje na postojanje rezistencije za sva tri TKI (imatinib, dasatinib i nilotinib) (45-47). U slučaju negativnog nalaza indicirano je liječenje TKI druge generacije. Pozitivan nalaz na prisustvo jedne od 4 ostale mutacije ukazuje na rezistenciju na imatinib pa daljnje liječenje imatinibom nije indicirano. U bolesnika koji se liječe nilotinibom ili dasatinibom u prvoj liniji u slučaju neuspjeha liječenja kao i citogenetskog relapsa ili prijelaza u uznapredovalu fazu bolesti treba odrediti T315I mutaciju. U slučaju njenog postojanja daljnja terapija s TKI nije indicirana već se što prije treba provesti liječenje alogenom transplantacijom matičnih krvotvornih stanica.

Indikacija za prekid liječenja prvoj linijom terapije je nepodnošenje odnosno toksičnost TKI. Treba naglasiti da u slučaju optimalnog odgovora samo nuspojave stupnja 3-4 zahtijevaju promjenu liječenja. Većina nuspojava su umjerenog do blagog stupnja, reverzibilne su i lako se kontroliraju kratkotrajnim smanjenjem doze lijeka.

4.4. Liječenje uznapredovale faze bolesti (ubrzane faze i blastične krize)

Terapijski pristup u ubrzanoj fazi i blastičnoj krizi određuje prethodno liječenje Ph+KML. Kako se ove faze najčešće javljaju nakon kronične faze u kojoj su bolesnici ponajprije liječeni imatinibom predlaže se primjena TKI druge generacije (dasatinib ili nilotinib). Nema dokaza koji je od ova dva TKI druge generacije uspješniji. Za blastičnu krizu postoji veći broj pokazatelja o djelotvornosti dasatiniba, pa se preporuča njegova primjena kao prva opcija (48-50). U bolesnika koji nisu liječeni imatinibom predlaže se početi liječenje imatinibom u dozi od 600 – 800 mg/dan. Razložno je prije početka liječenja

odrediti mutacijski status abl proteina, te u slučaju dokaza mutacija rezistentnih na imatinib primjeniti TKI druge generacije. Čini se opravdanim bez obzira na terapijski odgovor u tih bolesnika provesti liječenje alogenom transplantacijom. U bolesnika koji su u prvoj liniji terapije liječeni jednim od TKI druge generacije treba započeti liječenje TKI koji nije primijenjen, npr. u bolesnika koji su liječeni dasatinibom primjenjuje se nilotinib u dozi od 2x400 mg i obrnuto u bolesnika na nilotinibu daje se dasatinib u dozi od 140 mg/dan.

4.5. Liječenje transplantacijom krvotvornih matičnih stanica od podudarnog davatelja

U zadnjih 10-ak godina pristup liječenju Ph+ KML alogenom transplantacijom krvotvornih ma-

tičnih stanica uvelike se promijenio. Od terapije izbora u početnoj fazi bolesti danas se indikacijsko područje mijenja temeljem saznanja o djelotvornosti TKI prve i druge generacije. Stoga temeljem preporuka ELN transplantaciju kao vrlo djelotvornu metodu liječenja ali i metodu koja je praćena visokim postotkom letalnog ishoda zbog samog postupka ili komplikacija koje su posljedica transplantacije treba primjenjivati u stanjima kada drugi manje toksični terapijski postupci više ne djeluju. Vrijeme kada provesti HLA tipizaciju obitelji i bolesnika, kada početi pretraživanje nesrodnog podobnog davatelja i koje je vrijeme optimalno za liječenje alo-SCT ponajprije s obzirom na prethodno liječenje s TKI i fazu bolesti prikazuje Tablica 8.

Tablica 8. Indikacija za pretraživanje i liječenje transplantacijom alogenih krvotvornih matičnih stanica (32).

| PREPORUKE ZA PRETRAŽIVANJE SRODNOG DAVATELJA | |
|---|--|
| Pri dijagnozi | U bolesnika koji su pri dg u AP/BP. U djeci i mlađih osoba do 20 godina. U bolesnika s KML i upozoravajućim znacima. |
| Neuspjeh liječenja I. linijom terapije | U svih bolesnika. |
| PREPORUKE ZA PRETRAŽIVANJE NESRODNOG DAVATELJA | |
| Pri dijagnozi | U bolesnika koji su pri dg u AP/BP. |
| Nakon neuspjeha liječenja imatinibom | Kod progresije u AP/BP. Mutacije T315I. Ostale mutacije.* |
| Tijekom ili nakon liječenja drugom generacijom TKI | U svih bolesnika nakon neuspjeha s TKI. |
| PREPORUKE za ALO-SCT | |
| Pri dijagnozi | U bolesnika koji su pri dijagnozi u AP/BP. Preporuka je prethodno liječenje s TKI. |
| Neuspjeh I. linije terapije | U bolesnika u kojih je tijekom terapije utvrđen prelaz u AP/BP. Preporuka je prethodno liječenje s TKI. Mutacija T315I. |
| Neuspjeh II. linije terapije | U svih podobnih bolesnika.** |

* U bolesnika koji se liječe imatinibom mutacije koje ukazuju na rezistenciju na lijek.

** Bolesnici temeljem općih pokazatelja (dob, psihofizičko stanje, stanje pridruženih bolesti) koji su podobni za liječenjem alo-SCT.

Pri dijagnozi transplantaciju treba planirati u bolesnika s uznapredovalom fazom bolesti nakon početne terapije TKI prve ili druge generacije. I ovdje će načelno stav liječenja ovisiti o odgovoru na TKI druge generacije. Tako npr. u bolesnika s optimalnim odgovorom treba pričekati s transplantacijom posebice ako ne postoji srodnji davatelj ili HLA-nesrodnji davatelj visoke podudarnosti (10/10 ili 9/10) (51–53). U bolesnika koji su nakon liječenja s TKI razvili

progresiju bolesti u ubrzanoj fazu ili blastičnu krizu liječenje alogenom transplantacijom je optimalan terapijski pristup. Predlaže se prije transplantacije provesti liječenje s TKI onim lijekom koji bolesnik nije prethodno primao. U bolesnika s mutacijom T315I zbog neučinkovitosti liječenja s TKI potrebno je što prije provesti liječenja alogenom transplantacijom. To isto vrijedi i za bolesnika sa znacima neuspjelog liječenja TKI druge generacije.

5. Razina preporuke

Terapijski pristup i razinu preporuke prikazuje Tablica 9.

Tablica 9. Terapijske preporuke za Ph+KML.

| KRONIČNA FAZA | Terapija | Preporuka |
|---|--|----------------|
| Prva Linija | imatinib 400 mg/dan ili | 1a |
| | dasatinib 100 mg/dan ili | 1a |
| | nilotinib 2x300 mg/dan | 1a |
| Druga linija Imatinib – intolerancija Imatinib – subopt. odgovor* | imatinib* 600 mg/dan | 2a |
| | dasatinib 100 mg/dan ili | 2b |
| | nilotinib 2x400 mg/dan | 2b |
| Druga linija nilotinib – neuspjeh dasatinib – neuspjeh imatinib – neuspjeh mutacija T315I | dasatinib 100 mg/dan | 2b |
| | nilotinib 2x400 mg/dan | 2b |
| | dasatinib 100 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/dan, | 2b 2b |
| | alo-SCT | 1b |
| Citogenetski relaps imatinib suboptimalni odgovor mutacija T315I | dasatinib 100 mg/dan | 1b |
| | nilotinib 2x400 mg/dan | 1b |
| | alo-SCT | 1b |
| UBRZANA FAZA i/ili BLASTIČNA KRIZA | | |
| Prva linija | alo-SCT, prije alo-SCT imatinib 600-800 mg/dan ili dasatinib 140 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/dan | 1c 2b 2b |
| | alo-SCT prije transplantacije dasatinib*** ili nilotinib*** nilotinib 2x400 mg/dan dasatinib 140 mg/dan | 1c 1b 1b |
| | | |
| Druga linija liječeni imatinibom liječeni dasatinibom liječeni nilotinibom | | |
| | | |
| | | |

* Ako je snižena koncentracija imatiniba.

5.1. Ph+KML kronična faza - prva linija terapije

U bolesnika s Ph+ KML u kroničnoj fazi kao prva linija terapije preporuča se dasatinib u dozi od 100 mg/dan ili nilotinib u dozi od 2x300 mg/dan (**razina preporuke 1a**). U slučaju nemogućnosti primjene ova dva TKI predlaže se primjena imatiniba 400 mg/dan (**razina preporuke 1a**).

5.2. Ph+KML kronična faza bez optimalnog odgovora

5.2.1. Neuspjeh na liječenje prvom linijom terapije

U bolesnika s Ph+ KML u kroničnoj fazi u kojih je nakon 6 mjeseci liječenja TKI terapijski odgovor sukladan kriterijima neuspjeha preporuča se primjeniti nilotinib 2x400 mg (ako je dasatinib bio prva linija terapije) ili dasatinib 100 mg/dan (ako je nilotinib bio prva linija terapije) (**razina preporuke 2b**). U slučaju liječenja imatinibom preporuka je primjeniti dasatinib 100 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/

dan (**razina preporuke 2b**). U slučaju dokaza mutacije T315I preporuke je prekinuti terapiju s TKI i što prije provesti liječenje transplantacijom alogenih krvovtornih matičnih stanica (**razina preporuke 1b**).

5.2.2. Suboptimalni odgovor na liječenje imatinibom

U bolesnika s Ph+ KML u kroničnoj fazi koji se liječe imatinibom ako je nakon 6 mjeseci liječenja imatinibom terapijski odgovor sukladan kriterijima suboptimalnog odgovora a koncentracija imatiniba je niža od referentnih vrijednosti treba povisiti dozu imatiniba na 600 mg (**razina preporuke 2a**). Ako se nakon 3 mjeseca ne postigne kompletne citogenetske rezultate i/ili veliki molekularni odgovor liječenje treba prekinuti i u terapiju uvesti TKI druge generacije: dasatinib u dozi od 100 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/dan (**razina preporuke 2b**). U slučaju normalne koncentracije imatiniba u bolesnika sa su-

boptimalnim odgovorom nakon 6 mjeseci preporuka je započeti liječenje dasatinibom ili nilotinibom u gore navedenoj dozi. (**razina preporuke 2c**).

5.2.3. Citogenetski relaps ili porast Ph klona

U bolesnika s Ph+ KML u kroničnoj fazi koji se liječe imatinibom u prvoj liniji, ako nakon prvotno optimalnog odgovora nastupi citogenetski relaps ili se dokaže porast Ph klona potrebno je provjeriti rezistenciju na TKI (**razina preporuke 1b**). U tih je bolesnika preporuka nastaviti liječenje TKI druge generacije (dasatinib 100 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/dan) (**razina preporuke 1c**). U slučaju dokaza rezistencije na imatinib osim mutacije T315I preporuka je terapija TKI druge generacije u istoj dozi (**razina preporuke 1b**). U slučaju dokaza mutacije T315I preporuka je prekinuti terapiju s TKI i što prije provesti liječenje transplantacijom alogenih krvo-tvornih matičnih stanica (**razina preporuke 1b**).

5.3. Ph+KML uznapredovala faza bolesti

5.3.1. Bolesnici koji nisu liječeni TKI

U bolesnika s Ph+KML u ubrzanoj fazi pri dijagnozi preporuka je liječenje imatinibom u dozi od 600 mg/dan (**razina preporuke 1c**). U tih je bolesnika moguće liječenje TKI druge generacije (dasatinib 140 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/dan) (**razina preporuke 2b**). Bolesnici s HLA-identičnim srodnim davateljem ili nesrodnim davateljem (10/10 ili 9/10) koji su mlađi od 55 godina uz dobar psihofizički bodovni indeks prema ECOG-u (54) (≤ 2) i dobar bodovni skor pridruženih bolesti (55) (≤ 2) preporuka je liječenje alogenom transplantacijom (**razina preporuke 1c**).

U bolesnika s Ph+KML u blastičnoj krizi pri dijagnozi preporuka je liječenje imatinibom u dozi od 600-800 mg/dan s ili bez kemoterapije (**razina preporuke 1c**). U tih je bolesnika moguće liječenje TKI

druge generacije s ili bez kemoterapije (dasatinib 140 mg/dan, nilotinib 2x400 mg/dan) (**razina preporuke 1c**). Bolesnici s HLA-identičnim srodnim davateljem ili nesrodnim davateljem (10/10 ili 9/10 ili 8/10) koji su mlađi od 55 godina uz dobar psihofizički bodovni indeks prema ECOG-u (54) (≤ 2) i dobar bodovni skor pridruženih bolesti (55) (≤ 2) preporuka je liječenje alogenom transplantacijom (**razina preporuke 1b**).

5.3.2. Bolesnici koji su prethodno liječeni imatinibom

U bolesnika s Ph+KML u ubrzanoj fazi koji su liječeni imatinibom preporuka je liječenje TKI druge generacije (dasatinib 140 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/dan) (**razina preporuke 1c**). Bolesnici s HLA-identičnim srodnim davateljem ili nesrodnim davateljem (10/10 ili 9/10) koji su mlađi od 55 godina uz dobar psihofizički bodovni indeks prema ECOG-u (54) (≤ 2) i dobar bodovni skor pridruženih bolesti (55) (≤ 5) preporuka je liječenje alogenom transplantacijom (**razina preporuke 1c**)

U bolesnika s Ph+KML u blastičnoj krizi koji su prethodno liječeni imatinibom preporuka je liječenje TKI druge generacije s ili bez kemoterapije (dasatinib 140 mg/dan ili nilotinib 2x400 mg/dan) (**razina preporuke 1b**). Bolesnici s HLA-identičnim srodnim davateljem ili nesrodnim davateljem (10/10 ili 9/10 ili 8/10) koji su mlađi od 55 godina uz dobar psihofizički bodovni indeks prema ECOG-u (54) (≤ 2) i dobar bodovni skor pridruženih bolesti (55) (≤ 2) preporuka je liječenje alogenom transplantacijom (**razina preporuke 1b**).

5.4. Toksičnost liječenja

Kako je učinkovitost TKI slična izbor i njihova primjena ovisi i o njihovoj toksičnosti i podnošljivosti. Neželjene reakcije TKI prikazuje Tablica 10.

Tablica 10. Neželjene reakcije TKI.

IMATINIB – neželjene reakcije

- **Supresija koštane srži**: koja se očituje anemijom, neutropenijom i trombocitopenijom. Medijan trajanja neutropenije je 2-3 tjedna, a medijan trajanja trombocitopenije je 3-4 tjedna.
- **Kardiovaskularni sustav**: rijetko ali se opisuje dekompenzacija srca s disfunkcijom lijeve klijetke, ponajprije u bolesnika s poremećajim drugih organskih sustava. Stoga je neophodno striktno pratiti bolesnike koji prije liječenja imaju znakove kardijalne bolesti ili faktore rizika za koronarnu bolest.
- **Koža**: opisane su ozbiljne bulozne kožne reakcije, eritema multiforme i Stevens-Johnsonov sindrom. Nakon prekida moguće je ponovno započeti liječenje manjom dozom uz kortikosteroide i/ili antihistaminike. No u nekim bolesnika moguća je ponovna pojava ozbiljnih kožnih reakcija.
- **Retencija tekućine/edemi**: česte su neželjene reakcije zadržavanja tekućine, edema i porasta težine (povećan rizik kod primjene većih doza ili starije životne dobi (>65 godina)). Rijetko se javlja pleuralni ili perikardijalni izljev, plućni edem i ascites. Preporuka je s oprezom primjenjivati lijek uz striktne kontrole u osoba u kojih se nakupljanje tekućine slabije tolerira, kao što je slučaj u bolesnika s kardiovaskularnim ili plućnim bolestima.

- **Digestivni sustav:** iritacija digestivnog trakta se može kontrolirati istodobnom primjenom hrane i vode. Iako rijetki, opisana je perforacija crijeva.
- **Krvarenja:** ozbiljna krvarenja (stupnja 3/4) najčešće iz digestivnog trakta. Učestalost krvarenja je veća u bolesnika s GIST-om.
- **Hepatotoksičnost:** ozbiljne nuspojave oštećenja jetre stupnja 3-4 su relativno rijetke ($> 1\%$). U tim situacijama treba smanjiti dozu imatiniba.
- **Oportunističke infekcije:** se također opisane iako ovaj problem nije klinički značajan.

Problemi vezani uz bolesti organskih sustava:

- **Štitnjača:** u bolesnika na nadomjesnoj terapiji hormonima štitnjače nakon tireoidektomije može se razviti hipotireoza.
- Lijek primjenjivati s oprezom u bolesnika s bolestima jetre i bubrega

DASATINIB – neželjene reakcije

- **Supresija koštane srži:** izrazito ozbiljna o dozi ovisna mijelosupresija (trombocitopenija, neutropenija, anemija). Potrebno je smanjiti dozu ili privremeno prekinuti liječenje. Učestalost i intenzitet mijelosupresije je veći u bolesnika s uznapredovalom fazom Ph+KML.
- **Retencija tekućine:** opisani su generalizirani edemi, ali i pleuralni i perikardijalni izljevi, ascites, teški plućni edem i obično ovise o dozi lijeka. Oprez u liječenju bolesnika s nakupljanjem tekućine, ponajprije u bolesnika sa srčanim ili plućnim bolestima.
- **Krvarenja:** opisana su krvarenja u središnji živčani sustav s letalnim ishodom. Povezuju se s trombocitopenijom. Usto dasatinib može uzrokovati i poremećaj funkcije trombocita.
- **Produljenje QT intervala:** primjena s oprezom u bolesnika s QT sindromom, u bolesnika koji uzimaju antiaritmike ili lijekove koji dovode do produljenja QT intervala ili primjene diuretičkih, stanja s hipokalemijom ili hipomagnezemijom, primjene antraciklinskih antibiotika. Prije početka primjena svakako je potrebno korigirati hipokalemiju i hipomagnezemiju.

Problemi vezani uz bolesti organskih sustava:

- **Bolesti jetre:** bolesnici s ALT ili AST koji su >2.5 puta od gornje referentne vrijednosti ili s ukupnim bilirubinom koji je >2 puta od gornje referentne vrijednosti nisu liječeni dasatinibom.
- **Primjena antikoagulancija ili antitrombocitnih lijekova:** primjena uz povećani oprez zbog mogućnosti krvarenja.

NILOTINIB – neželjene reakcije

- **Supresija koštane srži:** je reverzibilna i u slučaju stupnja 3-4. Potrebna je redukcija doze ili kratkotrajni prekid liječenja.
- **Poremećaj elektrolita:** hipofosfatemija, hiper/hipokalemija, hipokalcemija i hiponatremija. Potrebno je korigirati elektrolitske poremećaje prije početka liječenja.
- **Hepatotoksičnost:** se očituje povišenim vrijednostima bilirubina, transferaza, i alkalne fosfataze. Potrebno je pratiti jetrene testove.
- **Produljenje QT intervala/iznenadna smrt:** opisano je produljenje QT intervala; iznenadna smrt vjerojatno je posljedica poremećaja repolarizacije klijetki. Produljeni QT interval može uzrokovati sinkope, epileptički napad i letalni ishod.
- **Kontraindicirana je primjena u bolesnika s hipokalemijom, hipomagnezemijom ili QT sindromom.** Prije početka liječenja nužno je korigirati elektrolitski poremećaj uz striktno praćenje EKG. Zabranjena je istodobna primjena lijekova koji produljuju QT interval i lijekova jakih CYP2A4 inhibitora. U bolesnika s nekontroliranom ili ozbiljnom srčanom bolesti nije uputno liječenje nilotinibom.

Problemi vezani uz bolesti organskih sustava:

- **Bolesti jetre:** kako se nilotinib metabolizira u jetri njegova primjena u bolesti jetre treba primjenjivati s oprezom. Ne zna se učinak u bolesnika s ALT i/ili AST >2.5 puta od gornje referentne vrijednosti i/ili bilirubina >1.5 puta od gornje referentne vrijednosti.
- **Pankreatitis:** primjena uz mjere opreza.

Većina nuspojava za sva tri TKI ne zahtijevaju prekid liječenja. Mijelosupresija, kardiotoksičnost i hepatotoksičnost kao i ostale nuspojave obično se rješavaju smanjenjem doze ili kratkotrajnim prekidom liječenja (56–58). Imatinib treba primjenjivati s oprezom u bolesnika s bolestima bubrega i jetre. U bolesnika na nadomjesnoj terapiji hormonima štitnjače zbog tireoidektomije može se razviti hipotireoza (59). Dasatinib s oprezom treba primjenjivati u bolesnika sa znacima retencije tekućine (60), u bolesnika sa srčanim i plućnim bolestima te u bolesti jetre (61). Lijek treba primijeniti s oprezom u QT

sindroma i u bolesnika koji primaju antikoagulant i antitrombocitnu terapiju zbog mogućnosti krvarenja (62). Nilotinib zbog mogućeg produljenja QT intervala nije terapija izbora u bolesnika s teškom srčanom bolesti (63). Kontraindicirana je primjena nilotiniba u bolesnika s hipokalemijom, hipomagnezemijom ili QT sindromom (64). Zabranjena je primjena lijekova koji produljuju QT interval i lijekova snažnih CYP2A4 inhibitora (65). Nilotinib treba s oprezom primjenjivati u slučaju bolesti jetre i nakon pankreatitisa.

Literatura:

1. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 341:164.
2. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960; 132:1197.
3. Maniatis AK, Amsel S, Mitus WJ, Coleman N. Chromosome pattern of bone marrow fibroblasts in patients with chronic granulocytic leukaemia. *Nature.* 1969; 222:1278.
4. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcrabl hybrid gene. *Science.* 1986; 233:212.
5. Van Etten RA. Clinical manifestations and diagnosis of chronic myeloid leukemia. <http://www.uptodate.com>. 2011.
6. 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.
7. Labar B, Kušec R, Jakšić B, Škare-Librenjak LJ, Načinović-Duletić A, Petričević-Sinčić J, et al. Dijagnostičko-terapijski pristup u bolesnika s esencijalnom trombocitemijom. Smjernice Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti – KROHEM. *Liječ Vjesn.* 2010; 132:333-339.
8. Editorial Policy: Grading guide. <http://www.uptodate.com>. 2011.
9. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, Tso CY, Braun TJ, Clarkson BD, Cervantes F. Prognostic discrimination in “good-risk” chronic granulocytic leukemia. *Blood.* 1984; 63:789-99.
10. Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90:850-8.
11. Oláh E, Kiss A, Jakó J. Chromosome abnormalities, clinical and morphological manifestations in metamorphosis of chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 1980;26(1):37-45.
12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (Eds). *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, IARC Press, Lyon 2008.
13. Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson RO, Zinsmeister AR, Jalal SM, Spurbeck JL, Silver RT. Highly sensitive fluorescence *in situ* hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1998;91:3357-65.
14. Wang L, Pearson K, Pillitteri L, Ferguson JE, Clark RE. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2002;118:771-7.
15. Forrest DL, Trainor S, Brinkman RR, Barnett MJ, Hogge DE, Nevill TJ, Shepherd JD, Nantel SH, Toze CL, Sutherland HJ, Song KW, Lavoie JC, Power MM, Abou-Mourad Y, Smith CA. Cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia are correlated with Sokal risk scores and duration of therapy but not through imatinib plasma levels. *Leuk Res.* 2009; 33:271-5.
16. Castagnetti F, Palandri F, Amabile M, Testoni N, Luatti S, Soverini S, Iacobucci I, Breccia M, Rege Cambrin G, Stagno F, Specchia G, Galieni P, Juliano F, Pane F, Saglio G, Alimena G, Martinelli G, Baccarani M, Rosti G; GIMEMA CML Working Party. Results of high-dose imatinib mesylate in intermediate Sokal risk chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase: a phase 2 trial of the GIMEMA CML Working Party. *Blood.* 2009;113:3428-34.
17. Rosti G, Palandri F, Castagnetti F, Breccia M, Levato L, Guigliotta G, et al. GIMEMA CML Working Party. Nilotinib for the frontline treatment of Ph(+) chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009;114:4933-8.
18. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. ENESTnd Investigators. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010;362:2251-9.
19. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010; 362:2260-70.
20. Giles FJ, Rosti G, Beris P, Clark RE, le Coutre P, Mahon FX, et al. Nilotinib is superior to imatinib as first-line therapy of chronic myeloid leukemia: the ENESTnd study. *Expert Rev Hematol.* 2010; 3:665-73.
21. Kantarjian HM, Baccarani M, Jabbour E, Saglio G, Cortes JE. Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors: The Future of Frontline CML Therapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17:1674-83.
22. Breccia M, Alimena G. Nilotinib and dasatinib first-line: Are we ready for imatinib replacement? *Leuk Res.* 2011 in press.
23. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, Goldman JM, Müller MC, Radich JP, Rudoltz M, Mone M, Gathmann I, Hughes TP, Larson RA; IRIS Investigators. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009; 23:1054-1061.
24. O'Brien SG, Guilhot F, Goldman J, Hochhaus A, Hughes TP, Radich JP, Rudoltz M, Filian J, Gathmann I, Druker BJ, Larson RA. International randomized study of interferon versus ST1571 (IRIS) 7-year follow-up: Sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib (IM). *Blood.* 2008;12:76 2008 (abstr 186).
25. Allan NC. Therapeutic options in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev.* 1989;3:45-52.
26. Talpaz M, Kurzrock R, Kantarjian H, Guterman J. Therapy of chronic myelogenous leukaemia with interferons. *Cancer Surv.* 1989; 8:793-8.
27. Simonsson B, Hjorth-Hansen H, Bjerrum OW, Porkka K. Interferon alpha for treatment of chronic myeloid leukemia. *Curr Drug Targets.* 2011; 12:420-8.
28. Gratwohl A, Brand R, Apperley J, Crawley C, Ruutu T, Corradini P, et al. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica.* 2006; 91:513-21.
29. Goldman J. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia-status in 2007. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 42 Suppl 1:S11-S13.
30. Irvine DA, Heaney NB, Holyoake TL. Optimising chronic myeloid leukaemia therapy in the face of resistance to tyrosine kinase inhibitors-a synthesis of clinical and laboratory data. *Blood Rev.* 2010;24:1-9.
31. Saussele S, Lauseker M, Gratwohl A, Beelen DW, Bunjes D, Schwerdtfeger R, et al. German CML Study Group. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo SCT) for chronic myeloid leukemia in the imatinib era: evaluation of its impact within a subgroup of the randomized German CML Study IV. *Blood.* 2010;115:1880-5.
32. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009;27:6041-51.

33. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SO, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. IRIS Investigators. Five year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006;355:2408-2417.
34. Hehlmann R, Saussele S, Lauseker M, Proetel U, Kovalevskaya, Leitner A, et al. The German CML Study Group. Randomized Comparison of Imatinib 400 Mg Vs. Imatinib + IFN Vs. Imatinib + AraC Vs. Imatinib after IFN Vs. Imatinib 800 Mg: Optimized Treatment and Survival. Designed First Interim Analysis of the German CML Study IV. *Blood.* 2008;112:184. (abstract).
35. Hughes TP, Branford S. Measuring minimal residual disease in chronic myeloid leukemia: fluorescence in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009;9 Suppl 3:S266-71.
36. Müller MC, Cross NC, Erben P, Schenk T, Hanfstein B, Ernst T, Hochhaus A. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *J Clin Oncol.* 2009; 27:4204-10.
37. Assouline S, Lipton JH. Monitoring response and resistance to treatment in chronic myeloid leukemia. *Curr Oncol.* 2011; 18:e71-83.
38. Skorski T. Chronic myeloid leukemia cells refractory/resistant to tyrosine kinase inhibitors are genetically unstable and may cause relapse and malignant progression to the terminal disease state. *Leuk Lymphoma.* 2011; 52 Suppl 1:23-9.
39. Mahon FX, Molimard M. Correlation between trough imatinib plasma concentration and clinical response in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2009;33:1147-8.
40. Hochhaus A, Schenk T, Erben P, Ernst T, La Rosée P, Müller MC. Cause and management of therapy resistance. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009;22:367-79.
41. Sharma P, Mohanty S, Kochupillai V, Kumar L. Mutations in ABL kinase domain are associated with inferior progression-free survival. *Leuk Lymphoma.* 2010;51:1072-8.
42. La Rosée P, Deininger MW. Resistance to imatinib: mutations and beyond. *Semin Hematol.* 2010;47:335-43.
43. Jones D, Kamel-Reid S, Bahler D, Dong H, Elenitoba-Johnson K, Press R, et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2009;11:4-11.
44. Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control.* 2009; 16:122-31.
45. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D, Breeden M, Garcia-Manero G, O'Brien S, Ravandi F, Borthakur G, Cortes J. Characteristics and outcomes of patients with chronic myeloid leukemia and T315I mutation following failure of imatinib mesylate therapy. *Blood.* 2008;112:53-5.
46. Tanaka R, Kimura S. Abl tyrosine kinase inhibitors for overriding Bcr-Abl/T315I: from the second to third generation. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8:1387-98.
47. Burke AC, Swords RT, Kelly K, Giles FJ. Current status of agents active against the T315I chronic myeloid leukemia phenotype. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2011;16:85-103.
48. Silver RT. The blast phase of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009;22:387-94.
49. Gotoh M, Tauchi T, Yoshizawa S, Kitahara T, Kiguchi T, Kimura Y, Ohyashiki K. Successful prior treatment with dasatinib followed by stem cell transplantation in a patient with CML in blastic crisis with a BCR-ABL mutation. *Int J Hematol.* 2010; 91:128-31.
50. Olsson-Strömberg U, Hermansson M, Lundán T, Ohm AC, Engdahl I, Höglund M, Simonsson B, Porkka K, Barbany G. Molecular monitoring and mutation analysis of patients with advanced phase CML and Ph+ ALL receiving dasatinib. *Eur J Haematol.* 2010; 85:399-404.
51. Gratwohl A, Heim D. Current role of stem cell transplantation in chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009; 22:431-43.
52. Velev N, Cortes J, Champlin R, Jones D, Rondon G, Giralt S, et al. Stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia resistant to tyrosine kinase inhibitors with BCR-ABL kinase domain mutation T315I. *Cancer.* 2010;116:3631-7.
53. Saußele S, Hehlmann R, Gratwohl A, Hochhaus A. Outcome of patients with CML after SCT in the era of tyrosine kinase inhibitors. *Bone Marrow Transplant.* 2011 in press.
54. Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E.T., Carbone, P.P.: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5:649-655.
55. Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood.* 2005;106:2912-19.
56. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM et al. "Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia," *N Engl J Med.* 2001;344:1031-7.
57. Brunstein CG and McGlave PB, "The Biology and Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia," *Oncology.* 2001;15:23-31.
58. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahne T, et al. "Imatinib Pharmacokinetics and its Correlation With Response and Safety in Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: A Subanalysis of the IRIS Study," *Blood.* 2008; 111(8):4022-8.
59. de Groot JW, Zonnenberg BA, Plukker JT, van Der Graaf WT, Links TP. „Imatinib Induces Hypothyroidism in Patients Receiving Levothyroxine“ *Clin Pharmacol Ther.* 2005; 78(4):433-8.
60. Apperley JF, Cortes JE, Kim DW, Roy L, Roboz GJ, Rosti G, et al. "Dasatinib in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in Accelerated Phase After Imatinib Failure: The START A Trial," *J Clin Oncol.* 2009;27:3472-9.
61. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, O'brien S, Borthakur G, Bruzzi J, Munden R, Cortes J. "Pleural Effusion in Patients With Chronic Myelogenous Leukemia Treated With Dasatinib After Imatinib Failure" *J Clin Oncol.* 2007;25:3908-14.
62. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Thomas D, Vidal-Senmache G, et al. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy. *Cancer.* 2009;115:2482-90.
63. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, et al. "Nilotinib (Formerly AMN107), a Highly Selective Bcr-Abl Tyrosine Kinase Inhibitor, is Effective in Patients With Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase Following Imatinib Resistance and Intolerance," *Blood.* 2007;110:3540-6.
64. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, et al. "Nilotinib in Imatinib-Resistant CML and Philadelphia Chromosome-Positive ALL," *N Engl J Med.* 2006;354:2542-51.
65. Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. "AMN107 (Nilotinib): A Novel and Selective Inhibitor of BCR-ABL" *Br J Cancer.* 2006;94:1765-9.

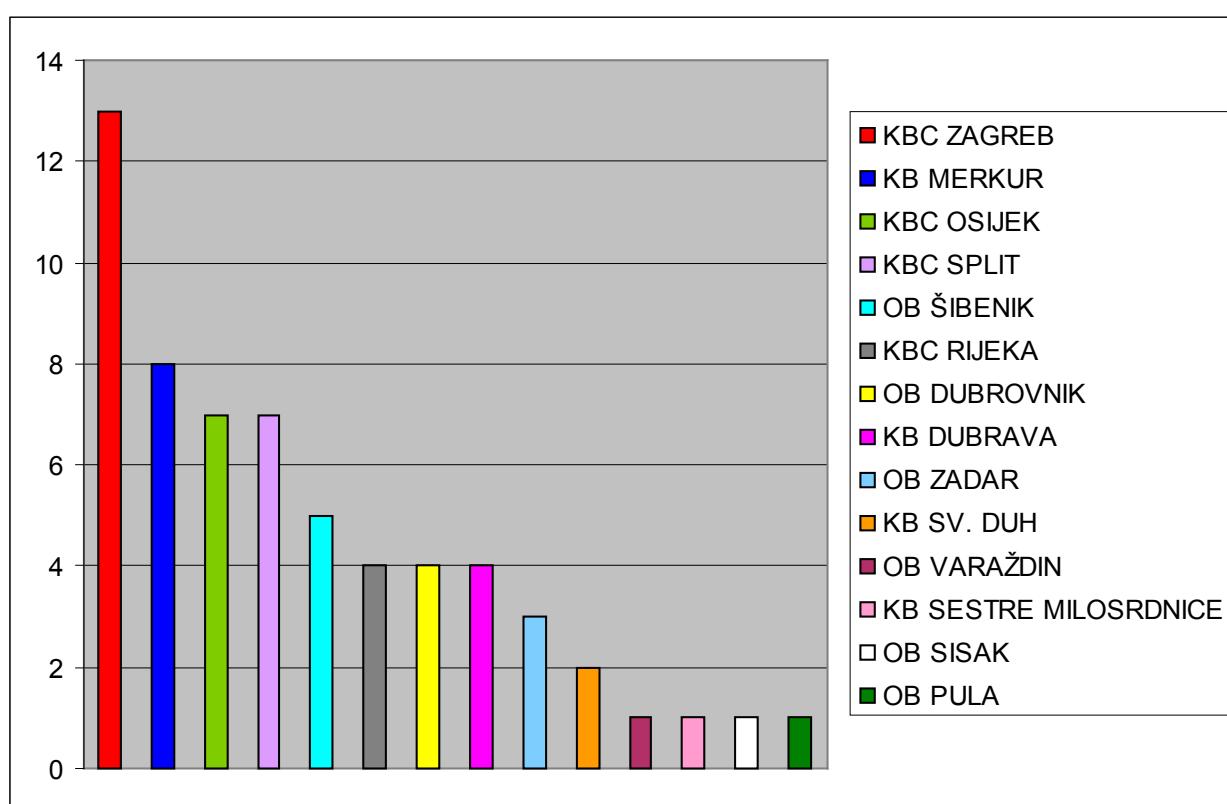
Hrvatski registar za kroničnu mijeloičnu leukemiju kao dio EUTOS registra ELN

Dubravka Sertić, dr. med.
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
KBC Zagreb
E-pošta: dsertic@net.hr
dsertic@kbc-zagreb.hr

Na sastanku KROHEM-a u Tuhejljskim Toplicama u svibnju 2011. podneseno je novo izvješće Radne skupine za kroničnu mijeloičnu leukemiju o sudjelovanju u Europskom registru za kroničnu mijeloičnu leukemiju pri European Leukemia Net (EUTOS for CML). Registr je nastao s ciljem prikupljanja važnih epidemioloških podataka o početku bolesti, liječenju i ishodu bolesnika s KML u Europi kako bi se otkrile moguće varijacije s obzirom na demografske i geografske regije, procijenila kvaliteta kontrolom ishoda i provedbe ELN preporuka, te razvio novi sveobuhvatni prognostički model koji bi doveo do optimalizacije obrade i poboljšanja izbora liječenja za pojedinog bolesnika. Radi se o prospektivnom prijavljivanju novodijagnosticiranih bolesnika u po-

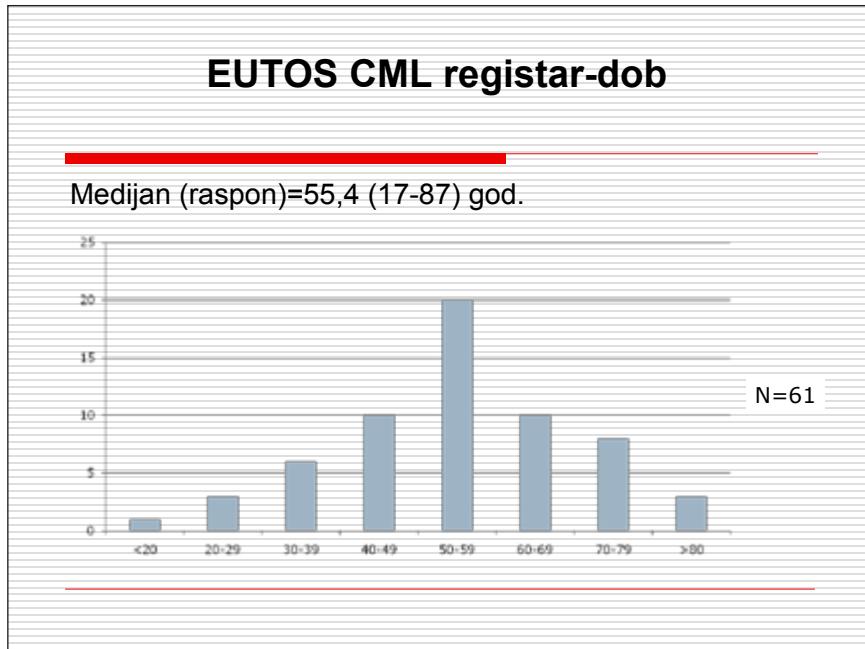
jedinim europskim zemljama i regijama od 2009. godine. Prijavljanje se odvija tako što hematolozi iz Hrvatske, koji su članovi KROHEM-a, prijavljuju bolesnike koordinatoru registra u KBC Zagreb. Također citogenetski laboratorijski i laboratorijski za molekularnu hematologiju signaliziraju koordinatoru da je dijagnosticiran novi bolesnik koji onda kontaktira hematologa koji je uputio bolesnika na obradu te se ispunjava papirnata verzija prijave. Bolesnici daju suglasnost za prijavu u registar potpisivanjem informiranog pristanka, a u registru se zbog zaštite identiteta vode pod brojem koji dodjeljuje registar.

U Hrvatskoj se prijavljuju bolesnici kod kojih je dijagnosticirana KML od 15. studenoga 2009. te je do kraja travnja 2011. prijavljen 61 bolesnik, od 64 novodijagnosticiranih bolesnika. Nisu prijavljena samo 3 bolesnika (5%) što je veliki napredak od prošlog sastanka kada 28% bolesnika još nije bilo prijavljeno. Svi bolesnici do kraja 2010. su prijavljeni u registar. Hematolozi iz 14 bolničkih ustanova su prijavili bolesnike, najviše u KBC Zagreb.

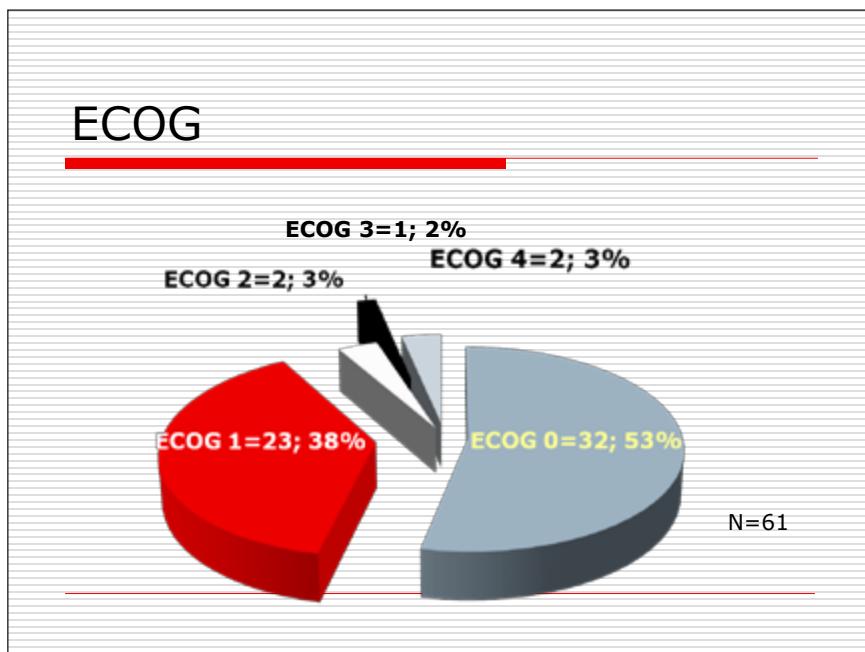


Bolest je češća u muškaraca što dokazuju i naši podaci te je prijavljeno 37 muških bolesnika (67%) i

21 žena (33%); medijan dobi je 55,4 godine, a raspon 17-87.



Svi prijavljeni bolesnici su pri dijagnozi bili u kroničnoj fazi bolesti, a većina bolesnika je bila prema WHO ECOG PS score-u 0 (53%) ili 1(38%), dok su samo 3 bolesnika bili teškog općeg stanja (score 3 ili 4).



Što se tiče rizika bolesti za prijelaz u uznapredovanju fazu distribucija je bila prema Euro Score: 36,4% mali, 51,5% srednji i 12,1% visoki, a prema Sokalu: 36,4% mali, 30,3% srednji i 30,3% visoki rizik.

Kod svih bolesnika dijagnoza je postavljena FISH metodom dokaza Ph kromosoma, dok je konvencionalni kariogram G-pruganjem učinjen kod 47 (80%) bolesnika. Kod 35 (59%) bolesnika je učinjen RT-PCR i referiran podtip i to b3a2 kod 21(60%), b2a2 13(37%) i b3a3 jedan bolesnik (3). Kvantitativni PCR na bcr-abl/abl učinjen je kod 25 (42%) bolesnika od kojih je prema IS rezultat izražen u 72%.

Uključivanje bolesnika u Registar se nastavlja do kraja 2011. godine, no obveza praćenja liječenja i ishoda bolesnika je jednom godišnje. Treba nastojati i dalje održavati visoku kvalitetu podataka. Sudjelovanje u Registru pokazalo je zajedništvo KROHEM grupe. Prikupljeni su vrijedni podaci koji mogu koristiti i u budućim istraživanjima, te se pokazujemo prema inozemstvu da smo pouzdana grupa kojoj se mogu povjeriti i složeniji zadaci. Sudjelovanje u ovakvim istraživanjima poboljšava kvalitetu dijagnostike i liječenja bolesnika.

Praćenje učestalosti venskih tromboembolijskih bolesti– preliminarni rezultati

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

¹ Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: dpulanic@yahoo.com

² Odjel interne medicine OB Šibenik

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

Na posljednjem sastanku Krohema u Tuheljskim Toplicama raspravljena je aktualna situacija s praćenjem venskih tromboembolija (VTE) u sklopu pokrenute Krohemove studije praćenja incidencije VTE u Republici Hrvatskoj.

Podsjetimo, VTE su među najvećim medicinskim i javnozdravstvenim problemima današnjice. Incidencija VTE, koje uključuju duboku vensku trombozu (DVT) (Slika 1.) i plućnu emboliju (PE), se prema većini recentnih studija u svijetu procjenjuje oko 1 na 1000 stanovnika. Ukoliko se obrazom 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 uzimanje određenih lijekova, koji povećavaju rizik nastanka VTE.



Slika 1. Bolesnica s dubokom venskom trombozom desne noge.

Podaci vezani uz VTE, te naslijednu i stečenu trombofiliju u Republici Hrvatskoj (RH) uglavnom nisu poznati. Stoga je Krohem pokrenuo akademsku, nesponzoriranu, opservacijsku studiju praćenja učestalosti venskih tromboembolija u pojedinim županijama RH, inicijalno u Šibensko-kninskoj županiji (a kasnije su se uključili i centri iz drugih hrvatskih županija), s planom da se zatim prikupljeni podaci ekstrapoliraju na cijelu RH, što je raspravljen i prihvaćeno tijekom sastanka Krohema u Vodicama u studenom 2010. Nakon toga je pokrenut administrativni postupak kako bi se navedeno praćenje moglo provesti u pojedinim bolnicama.

Na posljednjem sastanku Krohema u Tuheljskim Toplicama je dr. Velka Gverić-Krečak iz OB Šibenik prikazala preliminarne podatke praćenja incidencije VTE u OB Šibenik, što ukratko donosimo u ovom prilogu.

Preliminarni rezultati iz OB Šibenik: U ožujku i travnju 2011. su u OB Šibenik zabilježena hospitalizirana 22 bolesnika s VTE; 16 (73%) žena i 6 (27%) muških bolesnika. Medijan dobi bio je 69 godina, a raspon 28-89 godina (Slika 2.).

Slika 2. Dobna raspodjela bolesnika iz OB Šibenik.



14 bolesnika (64%) imalo je dijagnozu DVT, 7 (31%) PE, a 1 (5%) i DVT i PE. Dva bolesnika (9%) imalo je recidiv VTE, samo je jedan (5%) pušio cigarete, a nijedan oboljeli nije imao „rijetku“ lokalizaciju VTE, niti pozitivnu obiteljsku anamnezu VTE u prvih srodnika (Tablica 1).

| Dijagnoza (N, %): | | |
|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| DVT 14 (64%) | PE 7 (31%) | DVT i PE 1 (5%) |
| Rijetke VTE | 0 | |
| Recidiv VTE | 2 | (9%) |
| Cigarete puši | 1 | (5%) |
| VTE prvih srodnika | 0 | |

Tablica 1. Obilježja bolesnika s VTE u OB Šibenik.

Oko dvije trećine (15 bolesnika, odnosno 68%) imalo je sekundarnu VTE, a oko jedne trećine (7 bolesnika, tj. 32%) idiopatsku VTE (Tablica 2.). Od uzroka sekundarne VTE, najčešće su to bili oboljeli od zločudnih solidnih tumora (10 bolesnika, 45% svih VTE) (Tablica 2.).

| Sekundarna VTE | Idiopatska VTE |
|--|-----------------------|
| 15 (68%) | 7 (32%) |
| Ako sekundarna VTE, uzroci: | |
| Zločudni solidni tumor 10 (45% svih VTE) | |
| Imobilizacija, operacija 3 | |
| Kronična mijeloproliferativna bolest 1 (5%) | |
| NHL 1 (5%) | |
| DIK 1 (5%) | |
| Sepsa 1 (5%) | |
| Sveukupno umrli 1 (5%) | |

Tablica 2. Idiopatske i sekundarne VTE.

Zaključak: Prikazani preliminarni rezultati iz OB Šibenik su nedvojbeno vrlo zanimljivi, no riječ je ipak o malom uzorku bolesnika i o samo dva mjeseca praćenja. Može se pretpostaviti da će kompletiranjem podataka i dalnjim praćenjem, kako u OB

Šibenik tako i u drugim zainteresiranim centrima, uzorak bolesnika postati još veći i reprezentativniji, te omogućiti donošenje zaključaka o incidenciji i karakteristikama VTE u našoj zemlji, što bi moglo imati veliku javnozdravstvenu važnost.

Značaj prevencije i liječenja mučnine i povraćanja uzrokovane antitumorskim lijekovima i postupcima

dr. sc. Njetočka Gredelj Šimec, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Merkur

E-pošta: njetocka.gredelj@zg.t-com.hr

Zahvaljujući pojavi novih antiemetika unazad dvadesetak godina se značajno smanjila incidencija mučnine i povraćanja izazvanih kemoterapijom i zračenjem. Unatoč toj činjenici, postotak bolesnika koji imaju emezu vezanu uz terapiju i nadalje je visok, naročito ako se radi o bolesnicima koji primaju višednevne protokole koji uključuju kombinacije visoko emetogenih lijekova i zračenja.

Novija istraživanja pokazuju da među bolesnicima koji primaju umjereno do visoko emetogenu terapiju njih 59,7% ima mučninu (36,2% akutnu, 54,3% odgođenu) dok ih 36,4% povraća (13,2% akutno, 32,5% odgođeno) (1). Pokazano je da se i uz adekvatnu, trojnu antiemetsku profilaksu samo kod 42,9% bolesnika podvrgnutih kondicioniranju visokoemetogenom kemoterapijom i zračanjem cijelog tijela, postiže zadovoljavajući antiemetogeni učinak (2). Nažalost, percepcija liječnika i medicinskih se-stara o učestalosti i intenzitetu mučnine i povraćanja značajno se razlikuje od doživljaja samih bolesnika. Iako 37% bolesnika ima akutnu mučninu, medicinsko osoblje smatra da je ona prisutna samo kod 24%. Kad se radi o odgođenoj mučnini i povraćanju situacija je još lošija, naime medicinsko osoblje vjeruje da su ove nuspojave liječenja dvostruko manje učestale nego što su to u stvarnosti (percepcija odgođene mučnine 24% nasuprot stvarnih 52%, percepcija odgođenog povraćanja 15% nasuprot stvarnih 27%) (3).

Mučnina i povraćanje regulirani su iz viših centara središnjeg živčanog sustava. Dva su osnovna mesta nastanka impulsa. Prvi je u sluznici probavne cijevi, prvenstveno u proksimalnom dijelu tankog crijeva gdje se na terminalnim završecima aferentnih vlakana nervusa vagusa nalaze neurokininski receptori, odnosno 1,5-hidroksitriptaminski (serotoninski) receptor i kolecistokininski vagalni receptor. Ovi receptori su u neposrednoj blizini enteroendokrinih stanica koje na poticaj slobodnih radikala luče medijatore, u prvom redu 5-hidroksitriptamin, supstancu P i kolecistokinin. Putem vlakana vagusa impuls odlaze u dorzalne jezgre, u jezgre tractusa solitariusa. Dio impulsa unutar medule

spinalis zatvara refleksni luk za povraćanje, dok dio odlazi u više centre. Drugo područje nastanka impulsa je četvrta moždana komora, odnosno area postrema. Ovdje se nalazi kemoreceptorska "trigger" zona koju podražuju metaboliti i strane supstance koje su prošle krvno-moždanu barijeru, odnosno one koje se nalaze u likvoru. Impulsi nastali na ovaj način regulirani su od viših limbičkih centara, najčešće područja amigdala (4).

Emeza nastala kao posljedica terapije može se prema vremenu i načinu nastanka podijeliti na akutnu i odgođenu. Akutna započinje nekoliko minuta nakon početka terapije i traje do 24sata, a maksimalno je izražena nakon 5-6sati, dok odgođena započinje 24 sata nakon početka terapije i može trajati nekoliko dana. Refraktorna emeza nastaje unatoč adekvatno provedenim mjerama prevencije i prisutna je unatoč liječenju. U nastanku emeze značajnu ulogu može imati psihološka komponenta. Ukoliko ona pravladava, a emeza nije vezana uz početak terapije već nastaje na neke druge poticaje (vizualne, olfaktorne, auditivne) govorimo o anticipatornoj emezi. Ova vrsta emeze je često posljedica ranije loše provedne prevencije i također je vrlo refraktorna na terapiju.

Za prevenciju i liječenje emeze na raspolaganju su lijekovi iz tri glavne skupine, kao i brojni drugi lijekovi i postupci koji imaju antiemetogeni učinak. Najstarija skupina su kortikosteroidi. Oni imaju slab antiemetogeni potencijal, ali u kombinaciji sa serotonininskim antagonistima su vrlo učinkoviti u prevenciji akutne i odgođene emeze. Serotoninски antagonisti, odnosno blokatori 5-hidroksitriptaminskih receptora su skupina lijekova vrlo učinkovitih za prevenciju i liječenje akutne mučnine i povraćanja. U ovu skupinu spadaju ondansetron, granisetron, palonosetron, tropisetron i dolasetron. Serotoninски antagonisti se međusobno ne razlikuju po učinkovitosti izuzev palonosetrona koji ima produženo djelovanje te jednokratnom primjenom može prevenirati odgođenu emezu na koju je učinak ostalih lijekova iz ove skupine ograničen.

Nova skupina lijekova su blokatori neurokininskih receptora 1. Oni su podjednako učinkoviti u prevenciji akutne i odgođene emeze. Na našem tržištu su dostupni aperpitant koji se primjenjuje isključivo per os, te njegov prolječ za intravensku primjenu, fosapritant. Pri primjeni ovih lijekova bitno

je imati na umu da oni imaju složeni metabolizam koji uključuje citokrom P450 3A4, te da stoga mogu ulaziti u interakcije s drugim lijekovima. Uz navedene lijekove, prvenstveno za liječenje anticipatorne i refraktorne emeze, mogu se koristiti anksiolitici, neki psihotici, dopaminski antagonisti, inhibitori protonske pumpe, H2 blokatori, kanabinoidi, kao i psihoterapija, relaksacija i hipnoza (5).

Brojne su posljedice loše prevencije i liječenja mučnine i povraćanja. Intenzivno, refraktorno povraćanje može izazvati dehidraciju, elektrolitski i acidobazni disbalans, aspiracijske pneumonije, oštećenja sluznice gornjeg probavnog trakta s krvarenjem, rupture jednjaka, prijelome rebara. Mučnina i povraćanje mogu izazvati strah i depresiju, kasniju anticipatornu emezu, te u konačnici dovesti do odgode terapije ili reduciranja doze lijekova. Zbog navedenog kao i zbog činjenice da je postkemoterapijsku mučninu i povraćanja znatno jednostavnije prevenirati nego liječiti ukoliko se razvije, neophodno je postojanja jasne strategije u njezinoj prevenciji.

Smjernice za liječenje i prevenciju mučnine i povraćanja izazvanih kemo- i redioterapijom koje predlažu različita udruženja za hematološko/onkološko liječenje ili skupine za potporno liječenje međusobno se minimalno razlikuju (6-9).

Definirana su 4 rizika emetogenosti kemo- i redioterapije (visoki rizik - izaziva mučninu i povraćanje kod gotovo svih bolesnika (više od 90%), umjereni rizik (30-90%), niski rizik (10-30%) i minimalni rizik (manje od 10% bolesnika)), prema kojima se kategoriziraju citostatici. Skupina visokog emetogenog rizika određena je emetogenim potencijalom cisplatinе, te su lijekovi za prevenciju i liječenje emeze za visokoemetogene terapije valorizirani na cisplatskim protokolima. Smjernice daju jasne preporuke za sprječavanje i liječenje akutne i odgođene emeze, anticipatornog i refraktornog povraćanja, uz poseban osvrt na liječenje emeze izazvane zračenjem i emeze kod djece. Pri primjeni smjernica ne smije se zanemariti ni individualizirani pristup. Treba imati u vidu skupine bolesnika s povišenim rizikom, a to su u prvom redu mlađe žene s pozitivnom anamnezom mučnine i povraćanja u trudnoći, te sve anksiozne osobe, a naročito one kod kojih je anksioznost uzrokovana ranijim negativnim iskustvom vezanim za terapiju.

Kao zaključak, treba istaknuti, da zadovoljavajuća prevencija i liječenje terapijom izazvane mučnine i povraćanja kod hematoloških i onkoloških bolesnika omogućava primjenu suvremenih, često visokometogenih lijekova i njihovih kombinacija. Nadalje, ona smanjuje komplikacije, omogućava ambulantno liječenje i povećava suradljivost bolesnika. Sve navedeno značajno utječe na kvalitetu života bolesnika i, indirektno, na konačan ishod liječenja.

Literatura:

1. Bloechl-Daum B, Deuson RR, Mavros P, et al. Delayed nausea and vomiting continue to reduce patients' quality of life after highly and moderately emetogenic chemotherapy despite anti-emetic treatment. *J Clin Oncol.* 2006;24:4472-4478.
2. López-Jiménez J, Martín-Ballesteros E, Sureda A et al, Chemotherapy-induced nausea and vomiting in acute leukemia and stem cell transplant patients: results of a multicenter, observational study. *Haematologica.* 2006; 91:1: 84-91.
3. Grunberg SM, Deuson RR, Mavros P, et al. Incidence of chemotherapy-induced nausea and emesis after modern antiemetics. *Cancer.* 2004;100:2261-2268
4. Hesketh PJ, Chemotherapy -Induced Nausea and Vomiting, *N Engl J Med.* 2008; 358:23:2482-92
5. Feyer P, Jordan K, Update and new trends in antiemetic therapy: continuing need for novel therapies, *Ann Oncol.* 2011; 22:30-38.
6. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Antiemesis. V.3.2011.
7. Roila F, Herrstedt J, Aapro M, et al. Guideline update for MASCC and ESMO in the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting: results of the Perugia consensus conference. *Ann Oncol.* 2010;21(suppl 5):v232-v243
8. ASCO Guideline for Antiemetics in Oncology:Update 2006. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 2932-47.
9. Tomek R, Vrdoljak E, Vrbanec D i sur. Hrvatske smernice za prevenciju mučnine i povraćanja uzrokovanih kemoterapijom. *Lječ Vjesn.* 2009;131:49-53.

Krohem: preporuke o cijepljenju bolesnika sa zločudnim hematološkim bolestima

**Toni Valković¹, Mirta Mikulić², Jelena Roganović³,
Adriana Vince⁴, Bernard Kaić⁵, Radovan Vrhovac⁶**

¹ Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Rijeka

² Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

³ Odjel za hematologiju i onkologiju, Klinika za pedijatriju KBC Rijeka

⁴ Klinika za infektivne bolesti Fran Mihaljević, Zagreb

⁵ Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Odjel za cijepljenja, Zagreb

⁶ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KB Merkur

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Toni Valković, 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: toni_val@net.hr

Uvodne napomene

Bolesnici sa zločudnim hematološkim bolestima su imunokompromitirani zbog same bolesti, kao i protutumorske terapije, te su infekcije u njih češće i teže nego li u osoba koje nisu imunokompromitirane.

U ovih bolesnika, cijepljenje ima važnu ulogu u prevenciji infekcija, ali mu je učinkovitost slabija nego u općoj populaciji budući da se često ne uspevaju postići zaštitni titrovi protutijela.

Zbog toga je važno cijepljenjem bliskih kontakata (obiteljskih i zdravstvenih djelatnika koji sudjeluju u njezi i liječenju bolesnika) smanjiti mogućnost prijenosa infekcije na bolesne osobe.

Općenite preporuke

Nakon postavljanja dijagnoze zločudne hematološke bolesti, a prije započinjanja protutumorskog liječenja (kemoterapija, radioterapija, glukokortikoidi, imunoterapija, imunomodulatorni lijekovi) potrebno je provjeriti: prethodni cjepni status (Di-Tc-Per, Polio, MPR, hepatitis B), podatke o prethodnoj VZV infekciji (ukoliko su ti podaci nesigurni, treba učiniti i VZV serologiju) te učiniti HBV serumske biljege.

Živa, oslabljena cjepiva (BCG, ospice, rubela, mumps, vodene kozice, oralno atenuirano polio cjepivo, žuta groznica i dr.) mogu izazvati bolest u imunokompromitiranih bolesnika i zbog toga se u njih ne smiju koristiti tijekom i barem 3 mjeseca nakon za-

vršetka kemoterapije / radioterapije / imunoterapije.

Neka živa, oslabljena cjepiva (vodene kozice, rotavirusno cjepivo) ne smiju se upotrebljavati ni u članova obitelji bolesnika sa zločudnim hematološkim bolestima zbog mogućnosti prijenosa uzročnika. Za neka druga živa oslabljena cjepiva prijenos nije vjerljiv (mumps, rubeola, ospice). Članove obitelji bolesnika sa zločudnim hematološkim bolestima, koji nisu preboljeli varičele treba cijepiti protiv vodenih kozica najmanje 4 tjedna prije nego što će bolesnik započeti s imuno- ili mijelosupresivnom terapijom ili 6 tjedana nakon njenog završetka. Ako cijepljena osoba razvije vodene kozice kao nuspojavu cijepljenja, ne smije doći u kontakt s bolesnikom. Ako bolesnik dođe u kontakt s osobom koja ima vodene kozice ili postvakinalne varičele kao nuspojavu cijepljenja, indicirana je primjena VZV imunoglobulina.

Inaktivirana cjepiva mogu se upotrebljavati u hematoloških bolesnika.

Kako bi se uspio proizvesti imunološki odgovor, ukoliko je to moguće, bolesnike bi trebalo cijepiti inaktiviranim cjepivima barem 2 tjedna prije primjene mijelo- ili imunosupresivne terapije.

Ukoliko je bolesnik cijepljen unutar 2 tjedna od početka terapije, 1. dana terapije ili dok je terapija u tijeku, smatra se nezaštićenim budući da, veoma često, neće stvoriti adekvatan titar zaštitnih protutijela pa ga treba revakcinirati barem 3 mjeseca nakon terapije.

Preporuke o cijepljenju protiv pojedinih uzročnika

Preporuča se godišnje cijepljenje protiv gripe inaktiviranim trovalentnim cjepivom u svih bolesnika, kao i osoba iz njihove okoline te zdravstvenih djelatnika.

Cijepljenje protiv pneumokoka 23-valentnim polisaharidnim cjepivom treba izvršiti prije započinjanja protutumorske terapije, a ukoliko bolesnik nije cijepljen prije terapije, treba ga vakcinirati barem 3 mjeseca nakon završetka terapije. Kod djece do 5 godina starosti preporučuje se konjugirano 13-valentno cjepivo, prema shemi u skladu s dobi bolesnika. Cijepljenje protiv meningokoka i hemofilusa treba izvršiti samo u rizičnih bolesnika (npr. bolesnici koji žive u zatvorenim zajednicama kao što su vojarne, škole, samostani; oni koji rade s djecom). Bolesnici s paroksizmalnom noćnom hemoglobinurijom koji se liječe monoklonskim protutijelom ekulizumabom moraju se prije započinjanja liječenja cijepiti protiv

meningokoka, bubreći da su infekcije ovim uzročnikom češće u ovoj populaciji.

Cijepljenje rekombinantnim cjepivom protiv hepatitisa B treba izvršiti u bolesnika koji nisu cijepljeni tj. čiji je titar protutijela niži od 10 mIU/ml.

Preporuke o cijepljenju prije splenektomije te bolesnika s funkcionalnom asplenijom/hiposplenijom

Barem 2 tjedna prije splenektomije bolesnici se moraju vakcinirati 23-valentnim polisaharidnim cjepivom protiv pneumokoka (ili konjugiranim cjepivom Prevenar 13 kod mlađih od pet godina), kao i cjepivom protiv hemofilusa, dok se vakcinacija protiv meningokoka može provesti u bolesnika koji su pojačano izloženi (npr. bolesnici koji žive u zatvorenim zajednicama kao što su vojarne, škole, samostani; oni koji rade s djecom). Preporučljivo je cijepiti ih protiv gripe trovalentnim podjediničnim ili fragmentiranim cjepivom prije sezone gripe.

Ako nije bilo moguće ili je propuštena prilika cijepiti bolesnika prije splenektomije, preporučljivo je cijepiti ga nakon splenektomije.

Preporuke o cijepljenju bolesnika s transplantacijom krvotvornih matičnih stanica (autologna, alogenična): uvodne napomene

U bolesnika koji nisu revakcinirani nakon autologne ili alogenične transplantacije titar protutijela na bolesti koje se mogu spriječiti cijepljenjem postupno se smanjuje u razdoblju od 1-10 godine. Dokazan je povišen rizik od pneumokoknih infekcija, H. influenzae tip b, ospica, vodenih kozica i gripe. Stoga je potrebna rutinska revakcinacija, a zbog ograničenih podataka u pojedinim tipovima transplantacije smjernice se odnose kako na autolognu tako i na alogeničnu transplantaciju, uključujući i kondicioniranje smanjenog intenziteta i umbilikalnu krv. Za uspješan odgovor na cijepljenje potreban je oporavak stečene (T- i B- stanične) imunosti koja se načelno odvija unutar godine dana od transplantacije, osim u starijih bolesnika s kroničnom reakcijom presatka protiv domaćina (GvHD, od engl. *graft versus host disease*), u kojih se oporavak limfocita T, posebno CD4 stanica, može odvijati i više od 2 godine nakon transplantacije. T-stanični odgovor na cjepiva protiv patogena s kojima je postojao susret prije transplantacije moguć je u razdoblju od 1-6 mjeseci, a stvaranje protutijela 6-12 mjeseci po transplantaciji, dok je T-stanični odgovor i stvaranje protutijela na cjepiva za patogene s kojima nije bilo susreta prije transplantacije moguć nakon najmanje 1 godine. GvHD ili njegovo liječenje smanjuje T-stanični od-

govor i stvaranje protutijela, no ne preporučuje se odgađanje cijepljenja bolesnika s GvHD-om (osim živih cjepiva) već mjerjenje titrova specifičnih protutijela prije i nakon cijepljenja.

Kalendar cijepljenja nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica

| Tip cjepiva | Početak cijepljenja u mjesecima nakon transplantacije | | | |
|---|---|--------|--------|----------------------------------|
| | 6 mj. | 12 mj. | 18 mj. | >24 mj. |
| Gripa | Doživotno, sezonski, s početkom prije i nastavljajući 4- 6 mj. nakon TKMS | | | |
| Pneumokoni 13-valentni konjugat (0.5 mL, i.m.) ¹ | 3 doze u mjesecnim ili dvomjesečnim intervalima | | | |
| Pneumokno 23-valentno cjepivo (0.5 mL, i.m.) | | | 1 doza | |
| TDaP/Td* (0.5 mL, i.m.) | 3 doze u mjesecnim ili dvomjesečnim intervalima | | 1 doza | |
| Hib konjugat (0.5 mL, i.m.) | 3 doze u mjesecnim ili dvomjesečnim intervalima | | 1 doza | |
| Inaktivirano Poliovirus cjepivo (0.5 mL, s.c ili i.m.) | 3 doze u mjesecnim ili dvomjesečnim intervalima | | 1 doza | |
| Hepatitis A (1 mL i.m.) | | 1 doza | 1 doza | |
| Hepatitis B (1 mL i.m.) | 3 doze u mjesecnim intervalima | 1 doza | | |
| Meningokok | 1 doza | | | |
| MMR** | | | | 1 doza*** |
| VZV** | | | | 2 doze s razmakom od dva mjeseca |

¹ Trenutno ovo cjepivo nije registrirano za osobe starije od 5 godina, međutim, većina važećih preporuka o cijepljenju imunokompromitiranih osoba preporučuje primjenu ovog cjepiva izvan odobrenih indikacija kod starijih od pet godina, zbog superiorne imunogenosti u odnosu na polisaharidno cjepivo. Preporučljiv razmak između doza konjugiranog pneumokoknog cjepiva je dva mjeseca, a početak cijepljenja se preporučuje šest mjeseci nakon transplantacije.

* Tdap cjepivo trenutno nije dostupno u Hrvatskoj jer niti jedna takva formulacija nije registrirana. Dok se ne registrira Tdap cjepivo (cjepivo protiv difterije, tetanusa i hripcavca sa smanjenim sadržajem antiga, za primjenu kod osoba starijih od 7 godina), pacijenti mlađi od 7 godina mogu se cijepiti uobičajenim dječjim TDaP cjepivom, a stariji od 7 godina Td cjepivom.

** Osoba u vrijeme cijepljenja protiv ospica, rubele, mumpsa i protiv vodenih kozica mora u vrijeme cijepljenja biti imunokompetentna.

*** Djeca mlađa od 18 godina trebaju primiti dvije doze s razmakom od dva mjeseca.

Cjepiva protiv ospica, zaušnjaka i rubele preporuča se primjeniti nakon isteka najmanje 24 mjeseca od transplantacije, ukoliko pacijent nema GvHD (barem 6 mjeseci) i ne prima imunosupresivnu terapiju (barem 3 mjeseca) i to s 2 doze u razmaku od 2 mjeseca. Prije cijepljenja treba provesti serološko testiranje na ospice, rubelu i mumps, te ako pacijent ima protutijela na neki od tih virusa, nije potrebno cijepiti tom komponentom, već se može cijepiti monovalentnim cjepivima protiv ospica ili rubele ako pacijent nema protutijela.

Cijepljenje protiv Varicella-Zoster virusa može se obaviti tek nakon 2 godine, ukoliko pacijent nema GvHD (barem 6 mjeseci) i ne prima imunosupresivnu terapiju i to nakon prethodnog serološkog testiranja. Cijepe se samo seronegativne osobe u dva navrata s razmakom od najmanje dva mjeseca između prve i druge doze s cjepivom protiv vodenih kozica (ne s cjepivom protiv zoster-a).

Svi transplantirani pacijenti koji putuju u daleke krajeve trebaju se prije toga savjetovati sa stručnom osobom oko eventualne potrebe za cijepljenjem.

Preporučljivo je cijepiti s razmakom od dva tjedna između pojedinih primjena različitih cjepiva.

Cijepljenje kućnih kontakata i zdravstvenih djelatnika koji njeguju bolesnika i dolaze s njim u kontakt tijekom liječenja

Kućni kontakti i zdravstveni djelatnici u kontaktu s bolesnicima trebaju se svake godine cijepiti protiv gripe.

Kućni kontakti (stariji od 12 mjeseci) koji nisu cijepljeni protiv ospica, rubele i mumpsa, trebaju se cijepiti (ako nemaju kontraindikacije) po postavljanju dijagnoze zločudne hematološke bolesti (neovisno o tome je li predviđena transplantacija koštane srži/matičnih stanica).

Zdravstveni djelatnici koji rade s pacijentima oboljelima od zločudnih hematoloških bolesti moraju biti cijepljeni protiv ospica, rubele i mumpsa (ako nemaju kontraindikacije) ili imati serološki dokaz imunosti (anamneza preboljenja bolesti nije dokaz imuniteta).

Kućni kontakti (stariji od 12 mjeseci) koji nisu preboljeli vodene kozice i/ili nemaju serološki dokaz imunosti na VZV trebaju se cijepiti protiv vodenih kozica (ako nemaju kontraindikacije), odmah po posavljaju dijagnoze zločudne hematološke bolesti uz uvjet da se cijepe barem 4 tjedna prije ili 6 tjedna nakon imunosupresivne terapije bolesnika.

Zdravstveni djelatnici koji rade s pacijentima oboljelima od zločudnih hematoloških bolesti mora-

ju biti cijepljeni protiv vodenih kozica (ako nemaju kontraindikacije) ili imati serološki dokaz imunosti (anamneza preboljenja bolesti nije dokaz imuniteta).

Djeca, kućni kontakti bolesnika trebaju se cijepiti prema "Programu cijepljenja", radi postizanja pravodobne zaštite – ne odgađati cijepljenje djece u kontaktu s bolesnicima.

Cijepljenje kućnih kontakata i zdravstvenih djelatnika koji dolaze u kontakt s bolesnicima protiv pneumokoka, H. influenzae tipa B i meningokoka ne smatra se potrebnim budući da cijepljenje ne sprječava kolonizaciju sluznice respiratornog trakta i eventualni prijenos infekcije na bolesnike.

Kućni kontakti i zdravstveni djelatnici u kontaktu s bolesnicima koji boluju od zločudnih hematoloških bolesti ne smiju primiti OPV (oralno atenuirano polio cjepivo).

U izradi ovih smjernica korišteni su slijedeći izvori:

1. Ljungman P, Cordonnier C, Einsele H et al: Vaccination of hematopoietic cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant 2009; 44:521-6.
2. Ljungman P, Small TN, Vaccination Recommandations writing group: Update to vaccination guidelines. Biol Blood Marrow Transplant 2010; 16:1608-9.
3. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. V2.2010.
4. Provan D, Singer CRJ, Baglin T, Lilleyman J: Oxford Handbook of Clinical Haematology. Oxford University Press 2006, Second Edition.

Cijepljenje djece s malignim bolestima

Prof. dr. sc. Jelena Roganović, dr.med.
Odjel za hematologiju i onkologiju
Klinika za pedijatriju KBC Rijeka
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
E-pošta: jelena.roganovic1@ri.t-com.hr

Sigurna i učinkovita primjena cjepliva oduvijek je bila veliki izazov u imunokompromitirane djece. Poznato je da djeca s oslabljenim imunološkim sustavom imaju povećani rizik za razvoj teških komplikacija od onih bolesti koje se mogu spriječiti cijepljenjem. S druge strane, dvojbena je sposobnost oboljelog djeteta da nakon cijepljenja uspostavi, a zatim održi zaštitni imunološki odgovor. Dodatni problem predstavljaju vrlo mala djeca s malignim bolestima, u koje se iijatrogena imunosupresija izaziva prije završetka programa primarne imunizacije. Stoga su za cijepljenje djece s malignim bolestima neophodne zasebne preporuke.

Opće preporuke

Citostatska terapija oslabljuje imunološki odgovor. Ovaj učinak je najizraženiji tijekom terapije indukcije i konsolidacije, a umjeren tijekom terapije održavanja. Također je veći učinak kemoterapije na imunološki odgovor na primarno cijepljenje nego na docjepljivanje (booster doze). Nakon završetka kemoterapije, imunološka funkcija se oporavlja za 3 ili više mjeseci.

Živa oslabljena virusna i bakterijska cjepliva su glede sigurnosti i učinkovitosti kontraindicirana u imunokompromitirane djece, te ih treba izostaviti do restitucije imunološke funkcije. Općenito, primjena živih cjepliva se odgađa najmanje 3 mjeseca nakon završetka kemoterapije, a nakon ovog perioda preporučeni interval do imunizacije ovisi o vrsti i intenzitetu primijenjene kemoterapije. Nije, dakle, moguće dati definitivne preporuke koje uključuju sve kemoterapijske protokole. U selekcioniranih bolesnika integritet imunološkog sustava može se teoretski procijeniti testovima *in vitro*. Laboratorijski surogat biljezi, npr. apsolutni broj limfocita u vrijeme cijepljenja, pružaju uvid u imunološku funkciju i vjerojatnost adekvatnog imunološkog odgovora. Međutim, budući da pravodobno testiranje većinom nije dostupno, ovaj pristup nije od praktične koristi.

Za primjenu živih cjepliva u djece s malignim bolestima u različitim zemljama postoje različite preporuke (Tablica 1.).

Tablica 1. Preporučen interval za primjenu živih cjepliva nakon kemoterapije.

| Država | Preporučeni interval |
|------------------|----------------------|
| SAD* | Najmanje 3 mjeseca |
| Kanada** | 12 mj. |
| Australija | 12 mj. |
| Velika Britanija | 6 – 12 mj. |

* Prema American Academy of Pediatrics preporuča se razmotriti testiranje *in vitro*

** Preporuke National Advisory Committee on Immunization

U bolesnika u kojih su kortikosteroidi jedina imunosupresivna terapija, Američka akademija za pedijatriju (American Academy of Pediatrics, AAP) preporuča odgoditi primjenu živih cjepliva najmanje 1 mjesec ako su primali „visoke“ doze steroida (definirane kao doza prednizona $\geq 2 \text{ mg/kg/dan}$) kroz 2 tjedna ili dulje, te najmanje 2 tjedna kod primjene visokih doza u razdoblju kraćem od 2 tjedna. Odlaganje imunizacije živim vakcinama nije potrebno u slučaju primjene fizioloških, niskih ili sistemskih umjerenih doza kortikosteroida, kao i njihove topičke primjene ili lokalnog injiciranja, neovisno o duljini terapije. Za cijepljenje djece koja su primala tijekom liječenja rekombinantna monoklonalna protutijela nema definitivnih preporuka, ali je jasno da je u ovih bolesnika imunološki deficit dugotrajan.

Mrtva (inaktivirana) cjepliva ne predstavljaju poseban rizik glede neželjenih učinaka za imunokompromitiranu dječu, ali je imunološki odgovor na njih upitan. Ukoliko je oboljelo dijete cijepljeno unutar manje od 2 tjedna od početka terapije, ne smatra se zaštićenim i treba ga docijepiti. Adekvatan imunološki odgovor može se očekivati tek između 3 mjeseca i 1 godine nakon završetka terapije, a vjerojatniji je u bolesnika u kojih je apsolutni broj limfocita veći od $1 \times 10^9/\text{L}$.

Specifična cjepliva

Cjeplivo protiv varičele u većini zemalja nije dozvoljeno u djece s malignim bolestima. Prema novijim preporukama, AAP preporuča razmotriti cijepljenje protiv varičele u prijemčive djece s akutnom limfatičnom leukemijom koja su najmanje jednu godinu u kontinuiranoj remisiji i imaju apsolutni broj limfocita veći od $0,7 \times 10^9/\text{L}$. I prema važećim Kanadskim smjernicama bolesnici s akutnom limfatičnom leukemijom se mogu cijepiti, pod uvjetom da su u remisiji ≥ 12 mjeseci, da imaju apsolutni broj limfocita $\geq 1,2 \times 10^9/\text{L}$, da ne primaju radioterapiju,

te da im je moguće privremeno ukinuti terapiju održavanja 1 tjedan prije i 1 tjedan nakon imunizacije. Preporučaju se dvije doze cjepiva u razmaku od 1 do 3 mjeseca.

Dok je cjepivo protiv varičele relativno kontraindicirano u onkoloških bolesnika, njihovu braću ili sestre treba cijepiti unatoč malom riziku prijenosa vakcinalnog virusa. Naime, bolest povezana s vakcinalnim virusom je blaga, a rizik za prirodni varičela-zoster virus zabrinjavajući. Sva djeca s malignim bolestima koja nisu preboljela varičelu ili nisu cijepljena trebaju primiti postekspozicijsku profilaksu varičela-zoster imunoglobulinom (VZIG). VZIG se primjenjuje čim prije nakon ekspozicije, a najkasnije unutar 96 sati. Pasivna profilaksa nije potrebna za ponavljanu ekspoziciju unutar 21 dan nakon pretходne doze VZIG. Ako VZIG nije dostupan ili je prošlo više od 96 sati nakon ekspozicije, preporuča se profilaksa aciklovirom (80 mg/kg/dan u 4 doze kroz 7 dana, maksimalna doza 3200 mg/dan).

U pedijatrijskih onkoloških bolesnika koji primaju kemoterapiju kontraindicirano je oralno cjepivo protiv poliomijelitisa, BCG cjepivo, živo oslabljeno intranasalno cjepivo protiv gripe te cjepivo protiv ospica, zaušnjaka i rubeole (MPR). Nisu kontraindicirana cjepiva protiv difterije i tetenus, acelularno cjepivo protiv pertusisa, inaktivirano polio cjepivo, cjepivo protiv Hemofilusa influence tip B, pneumokokno i meningokokno konjugirano cjepivo, te inaktivirano cjepivo protiv gripe. Imunokompromitiranim bolesnicima preporuča se godišnja imunizacija inaktiviranim trovalentnim cjepivom protiv gripe, kao i njihovim ukućanima. Djeca koja primaju kemoterapiju mogu imati oslabljen imunološki odgovor na ovo cjepivo u usporedbi sa zdravom djecom. Prema sadašnjim AAP smjernicama optimalno vrijeme za cijepljenje protiv gripe je nakon 3 mjeseca od zadnjeg kemoterapijskog ciklusa, uz apsolutni broj neutrofila i limfocita $\geq 1,0 \times 10^9/L$. Djeca koja su završila kemoterapiju imaju visoku stopu sero-konverzije. Kod djece s malignim bolestima također se preporuča provesti kompletno cijepljenje protiv hepatitis B.

Prijedlog Nacionalnih preporuka za cijepljenje djece s malignim bolestima

Na osnovu postojećih smjernica iz drugih zemalja i Kalendara obveznih cijepljenja u Republici Hrvatskoj za 2011. godinu (Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi), u suradnji s infektologima, u izradi su nacionalne preporuke za cijepljenje djece s malignim bolestima. Uz prijedlog kalendara cijepljenja djece koja primaju kemoterapiju i u koje je provedena primovakcinacija (Tablica 2.), zasebno je prikazan prijedlog kalendara cijepljenja za oboljelu djecu mlađu od 7 godina (Tablica 3.) i stariju od 7 godina (Tablica 4.) u koje nije dovršena primovakcinacija. Prijedlozi kalendara cijepljenja djece nakon autologne i alogene transplantacije krvotvornih matičnih stanica, splenektomiranih bolesnika, te preporuke za cijepljenje ukućana i zdravstvenih djelatnika koji učestvuju u liječenju oboljele djece iznijeti su u okviru Radne skupine za potpornu terapiju u hematologiji.

Tablica 2. Prijedlog kalendara cijepljenja djece s malignim bolestima.

| Cjepivo | Komentar |
|------------------------------|--|
| Influenza inaktivirano | - svake godine u jesen - 2 doze u prvoj godini cijepljenja - NE u dojenčadi mlađe od 6 mjeseci |
| Toksoid tetanusa i difterije | - prema kalendaru cijepljenja |
| Pneumokok | - broj doza ovisi o dobi - 2 doze + booster doza (23-valentno cjepivo) - prije splenektomije |
| H. influenzae | - prema kalendaru cijepljenja - prije splenektomije |
| Meningokok | - prije splenektomije |
| Hripavac acelularno cjepivo | - prema kalendaru cijepljenja |
| Polio inaktivirano (IPV) | - prema kalendaru cijepljenja - NE ≥ 18 god. |

DTaP = cjepivo protiv difterije, tetanusa i pertusisa; Td = cjepivo protiv tetanusa i difterije (adultni tip); IPV = inaktivirano polio cjepivo; Hib = cjepivo protiv Hemofilusa influence tip B; PV7 = 7-valentno konjugirano pneumokokno cjepivo; PV23 = 23-valentno polisahardno pneumokokno cjepivo; FLU = inaktivirano cjepivo protiv gripe; MMR = cjepivo protiv ospica, zaušnjaka i rubeole; HAV = cjepivo protiv hepatitisa A; HBV = cjepivo protiv hepatitisa B; MEN = meningokokno cjepivo

Tablica 3. Prijedlog kalendara cijepljenja djece s malignim bolestima mlađe od 7 godina koja nisu primarno cijepljena.

| | 2 mj. | 4 mj. | 6 mj. | 12-15 mj. | 18 mj. | 24 mj. | 4-6 god. | 14-16 god. |
|---------------|--|-------|-------|---------------------------------|--------|--------|----------|------------|
| DTaP | + | + | + | | + | | + | Td |
| IPV | + | + | + | | + | | + | |
| HIB | + | + | + | | + | | | |
| (PV7) | (+) | (+) | (+) | (+) | | | | |
| (PV23) | | | | | | (+) | | |
| FLU | Svake godine u jesen | | | | | | | |
| MMR | (Relativna) kontraindikacija | | | | | | | |
| (HAV) | | | | (Preporučeno za djecu > 1 god.) | | | | |
| HBV | Preporučeno u dojenačko doba, djetinjstvu i preadolescenciji | | | | | | | |
| (MEN) | (Preporučeno u adolescenciji) | | | | | | | |

DtaP = cjepivo protiv difterije, tetanusa i pertusisa; Td = cjepivo protiv tetanusa i difterije (adultni tip); IPV = inaktivirano polio cjepivo; HIB = cjepivo protiv Hemofilusa influence tip B; HBV = cjepivo protiv hepatitisa B; PV7 = 7-valentno konjugirano pneumokokno cjepivo; MEN = meningokokno cjepivo

Tablica 4. Prijedlog kalendara cijepljenja djece s malignim bolestima starije od 7 godina koja nisu primarno potpuno cijepljena.

| | Td | IPV | HIB | HBV | PV7 | MEN |
|------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Prvi posjet | X | X | X | X | (X) | (X) |
| 2 mj. kasnije | X | X | | X | (X) | |
| 6-12 mj. kasnije | X | X | | X | | |
| 10 god. kasnije | X | | | | | |

Td = cjepivo protiv tetanusa i difterije (adultni tip); IPV = inaktivirano polio cjepivo; HIB = cjepivo protiv Hemofilusa influence tip B; HBV = cjepivo protiv hepatitisa B; PV7 = 7-valentno konjugirano pneumokokno cjepivo; MEN = meningokokno cjepivo

Morfološki i klinički aspekti in situ limfoma

Dr. sc. Ivana Ilić, dr. med.

Zavod za patologiju i citologiju
Klinički bolnički centar Zagreb
E-pošta: iilic5@yahoo.com

In situ limfomi

Dijagnoza „in situ“ tumora označava zloćudne stanice epitelnih i melanocitnih tumora koje ne rastu invazivno već se nalaze na mjestu na kojem su nastale, od okolnog tkiva odijeljene bazalnom membranom. Obzirom da sarkomi i limfomi ne nastaju iz tkiva koja imaju bazalnu membranu taj pojam ne postoji u njihovoј tumorogenezi.

Zametna središta limfatičnih folikula limfnog čvora nisu odvojena od okoline bazalnom membranom, no dobro su ograničena, pa se pojava atipičnih stanica na ovom mjestu koja ne povećava limfnog čvor, ne remeti njegovu arhitekturu te ne formira tumorsku masu u doslovnom smislu naziva intrafolikularnom neoplazmom ili folikularnim in situ limfomom (FLIS)(1,2). Shodno tome nalaz atipičnih stanica u zoni plašta se naziva in situ limfom zone plašta (3).

Pojava atipičnih stanica zametnog središta opisana je u literaturi još 2001. godine te je prvotno nazvana monoklonalna proliferacija atipičnih stanica zametnog središta (početni folikularni limfom) (4), no već je sljedeće godine ista promjena nazvana »in situ« folikularnim limfomom (1) da bi u klasifikaciji hematoloških i limfomskih novotvorina potom preoblikovana u intrafolikularnu neoplazmu (2). Iako prihvaćen, posljednji naziv nije potpuno zadovoljio sve hematologe ni hematopatologe pa se još očekuje bolje ime za ovaj entitet.

Nalaz atipičnih stanica u zametnom središtu ili zoni plašta znači da stanice pokazuju morfološku i/ili fenotipsku različitost od normalnih stanica tog sijela, no da njemu istovremeno pripadaju podrijetlom. Atipičnim imunofenotipom folikularnog limfoma smatra se izričaj bcl2 biljega koji se može prikazati imunohistokemijskim bojenjem. Analizom imunohistokemijskog bojenja stanice FLIS-a također pokazuju i jači izričaj bcl6 i CD10 biljega u usporedbi s normalnim stanicama zametnog središta (2). Obzirom da su imunohistokemijske odlike iste kod svih folikularnih limfoma ponekad se javlja problem razlikovanja FLIS-a od „običnog“ folikularnog limfoma koji zahvaća samo mali dio limfnog čvora.. U posljednjem se nalaze uvećani limfatični

folikuli kojima nedostaje zona plašta, proliferativna aktivnost je veća, a ovi limfomi su obično histološkog gradusa 2 ili 3 iako vrlo rijetko mogu biti i gradusa 1. Za razliku od toga folikularni limfom in situ ima nizak proliferativni indeks i uvijek je histološkog gradusa 1.

Obzirom da limfni čvorovi najčešće nisu povećani, nalaz in situ limfoma je slučajan nalaz u limfnim čvorovima koji su izvađeni zbog različitih razloga, a najčešće zbog procjene kliničkog stadija zloćudnog tumora. U literaturi nema puno opisanih in situ limfoma kako folikularnih (1,5,6) tako ni limfoma zone plašta (3,7). Nalaze se dvije studije o in situ folikularnom limfomu (2,3), obje retrospektivne, napravljene s ciljem da utvrde postotak pojavnosti in situ folikularnog limfoma u općoj populaciji. U studiji Conga i sur. (2) je retrospektivno analizirano 900 limfnih čvorova s reaktivnim promjenama (folikularna hiperplazija) u razdoblju od 8 godina te je nađeno 23 FLIS-a (Tablica 1). Druga je studija napravljena na 132 pacijenta i ukupno 1294 limfnih čvorova (3). Tri pacijenta imala su FLIS (Tablica 2).

Znači, radi se o slučajnom nalazu koji se može vidjeti u oko 5% limfnih čvorova koji klinički nisu povećani i kojima je arhitektura održana. Jedini način da ih se dijagnosticira je prisutnost bcl2 biljega u stanicama zametnih središta. Tu se javlja pitanje opsežnosti imunohistokemijskih bojenja pri analizi svakog izvađenog limfog čvora. Prema uputama autora Klasifikacije hematoloških i limfatičnih novotvorina imunohistokemijska bojanja su opravdana samo u slučaju kad postoji klinička ili patohistološka sumnja na limfom (1,9).

Prema literaturi (1) u oko 15% bolesnika s FLIS-om istovremeno se nađe folikularni limfom na drugom mjestu, a u oko 30% bolesnika limfom se pojavi nakon nekog vremena. No, 50% bolesnika s FLIS-om nema limfoma niti u vrijeme postavljanja dijagnoze, a niti kasnije. Prema preporuci Carbone i sur. (9) hematolog ovakvog bolesnika treba obraditi poput svakog bolesnika s limfomom te utvrditi klinički stadij kako bi se otkrio mogući limfom na drugom mjestu. U slučaju da postoji limfom, bolesnik se lijeći kao i ostali oboljeli od istog tipa limfoma, uslučaju da nema drugog limfoma u vrijeme postavljanja dijagnoze takav se bolesnik prati.

Literatura o in situ limfomu zone plašta je još oskudnija što je i očekivano jer se radi o entitetu

koji je još rjeđi od folikularnog limfoma in situ (3,7). Limfni čvor može ali i ne mora biti povećan. Prikazi slučajeva koji su objavljeni opisuju da se histološki nalazi očuvana arhitektura limfnog čvora s ili bez znakova folikularne hiperplazije te limfatični folikuli s održanom zonom plašta koja može ali i ne mora biti proširena. Stanice zone plašta pokazuju aberantan izričaj biljega ciklin D1 i sox 11. Za razliku od folikularnog limfoma in situ, većina ovih bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze in situ limfoma jednog limfnog čvora ima "običnim" limfomom zone plašta zahvaćeni i drugi limfni čvor, dok četvrtina bolesnika ima infiltraciju koštane srži limfomom. Ishod bolesti je slabo poznat, no očito se radi o agresivnijoj bolesti nego je to FLIS. Za obradu i praćenje bolesnika vrijede preporuke kao za FLIS.

Literatura:

1. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. 2002; Vol. 99, No. 9, pp. 3376-3382.
2. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, WHO Classification of Tumours, Volume 2 IARC WHO Classification of Tumours, No 2, 2008.
3. Richard P, Vassallo J, Valmary S, Missouri R, Delsol G, Bro-susset P."In situ-like" mantle cell lymphoma: a report of two cases. *J Clin Pathol*. 2006.;59(9):995-6.
4. Pruneri G, Mazzarol G, Manzotti M, Viale G. Monoclonal proliferation of germinal center cells (incipient follicular lymphoma) in an axillary lymph node of a melanoma patient. *Hum Pathol*. 2001; 32(12):1410-1413
5. Tobias Henopp, Leticia Quintanilla-Martinez, Falko Fend and Patrick Adam Eberhard-Karls-University, Institute of Pathology, Tubingen, Germany. INCIDENCE OF FOLLICULAR LYMPHOMA IN SITU IN UNSELECTED LYMPH NODES OF SURGICAL SPECIMENS, Poster, 22nd Meeting EAHP, Uppsala 2010.
6. Montes-Moreno S, Castro Y, Rodríguez-Pinilla SM, García JF, Mollejo M, Castillo ME, Bas-Vernal A, Barrionuevo-Cor-nejo C, Sanchez-Verde L, Menarguez J, Cigudosa JC, Piris MA. Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: re-view of a series of 13 cases. *Histopathology*. 2010;56(5):658-62.
7. Aqel N, Barker F, Patel K, Naresh KN. In-situ mantle cell lymphoma--a report of two cases. *Histopathology*. 2008;52(2):256-60.
8. Rouillet MR, Martinez D, Ma L, Fowler MH, McPhail ED, Judkins A, Arber DA, Bagg A. Coexisting follicular and mantle cell lymphoma with each having an in situ component: A novel, curious, and complex consultation case of coinci-dental, composite, colonizing lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2010;133(4):584-91.
9. Carbone A, Santoro A. How I treat: diagnosing and managing "in situ" lymphoma. *Blood*. 2011;117(15):3954-60.

Procjena klonalnosti non-Hodgkin limfoma

**Mirjana Mariana Kardum Paro¹, Slavko Gašparov^{2,3},
Petra Korać^{2,3}, Mara Dominis^{2,3}**

¹ Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
KB Merkur

² Klinički zavod za patologiju i citologiju KB Merkur

³ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa autora za kontaktiranje:

Doc. dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro,
spec.med.biokemije
Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
KB Merkur
E-pošta: mariana.kardum@zg.t-com.hr

Doc. dr. sc. Slavko Gašparov, dr. med.
Klinički zavod za patologiju i citologiju
Klinička bolnica Merkur, Zagreb
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: gasparovslavko@gmail.com

Nakon izvještaja s radionice BIOMED-2/EUROCLONALITY WORKSHOP ON CLONALITY ASSESSMENT koja se održala u Nijmegenu krajem veljače 2009. te predstavljanja poboljšanja koja smo uveli u našem laboratoriju i isprobali/prikazali na našim slučajevima, nastojali smo čim više poboljšati metodu i usavršiti očitanje nalaza.

Poboljšanja metode na kojima smo radili su:

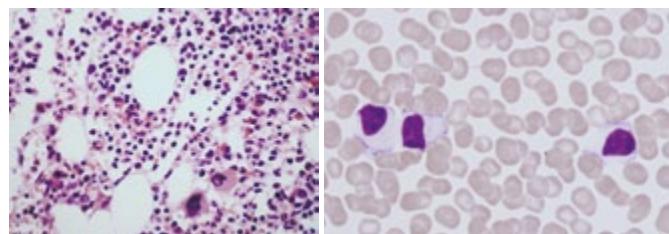
1. usporedba načina izdvajanja DNA iz tkiva uklopljenih u parafin (*komercijalni vs. standardni (deparafinizacija/digestija/proteinaza K)*)
2. nabavljen elektroforetski sustav (PAGE) i gelovi
3. korištenje nove metode vizualizacije rezultata analize klonalnih preuređbi (*Syber Gold vs. Bojenje srebrom*)
4. kontrolirana kvaliteta umnažanja DNA uz "control size ladder" (pk/ks/lč/formalinom fiksirana tkiva uklopljena u parafin)
5. usvojeni standardizirani BIOMED-2 protokoli umnažanja lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i heterodupleks analize umnoženih produkata prema van Dongen JJM i sur. Leukemia. 2003;17:2257-2317.
6. rezultati pretraga klonalnih preuređbi gena (IgH/TCR) potvrđivani sudjelovanjem u programima/ shemama vanjske procjene kvalitete (MDHM; UK NEQAS) te su pretrage akreditirane prema normi HRN EN ISO 15189
7. uvedeni novi testovi za procjenu klonalnih preuređbi (IgK; TCRγ).

Iako je metoda usavršena, neki slučajevi bili su upitni pa su doc. dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro i doc. dr. sc. Slavko Gašparov te slučajeve prikazali na radionici BIOMED-2/EUROCLONALITY WORKSHOP ON CLONALITY ASSESSMENT, NIJMEGEN, NIZOZEMSKA, održanoj 14–16. 02. 2011.

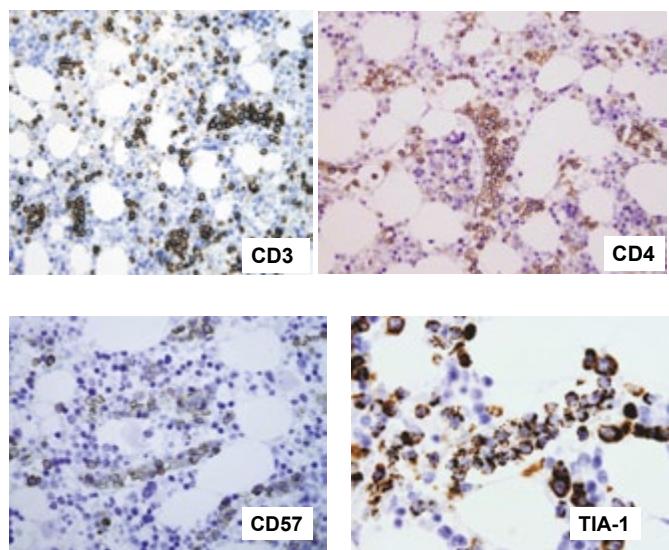
Slučajevi su prikazani tako da je objašnjena patohistološka slika te način provjere kvalitete uzoraka DNA uz "control size ladder" ~ 600 pb, predviđeni su rezultati metoda za određivanje preuređbe u genu za T-stanične receptore (TCR) i određivanje preuređbe u genu za teški (IgH) lanac imunoglobulina.

SLUČAJ 1.

Početkom prošle godine u našu bolnicu primljen je pacijent rođen 1942. godine. Utvrđena je perzistentna leukocitoza (Lkc $16 \times 10^9/L$, 95% limfocita), povećana slezena (5 cm) dok povećani palpabilni limfni čvorovi nisu nađeni. Učinjena je biopsija koštane srži. Patohistološka dijagnoza bila je T-limfoproliferativna bolest, T-velikostanična granularna limfocitna leukemija (Slika 1.). U koštanoj srži dominirala je intrasinusoidalna infiltracija malih limfocita. Stanice infiltrata bile su CD3+, CD4+, CD57+, TIA-1+, CD20-, CD8-, CD7-. (Slika 2.).

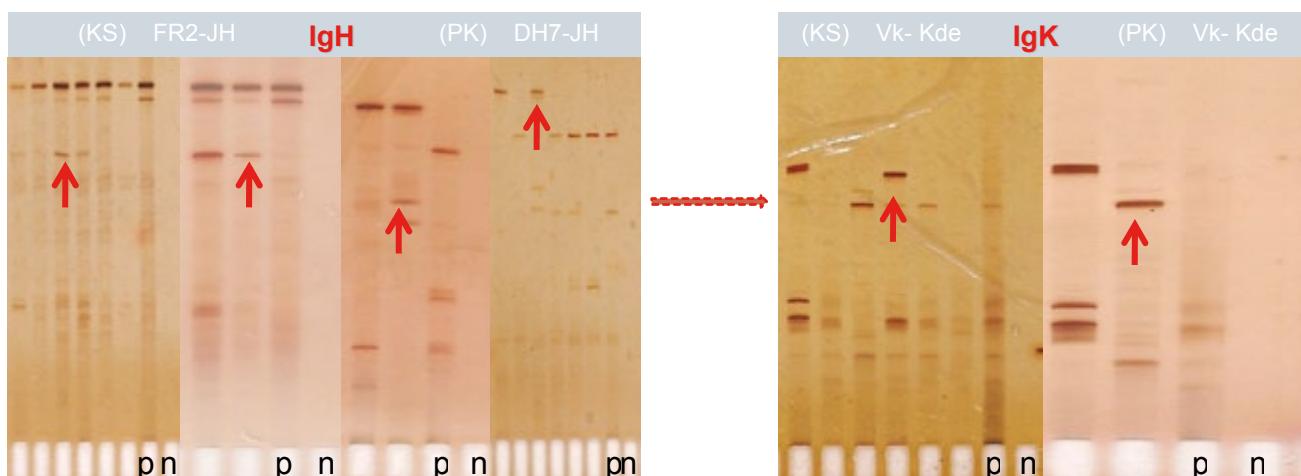
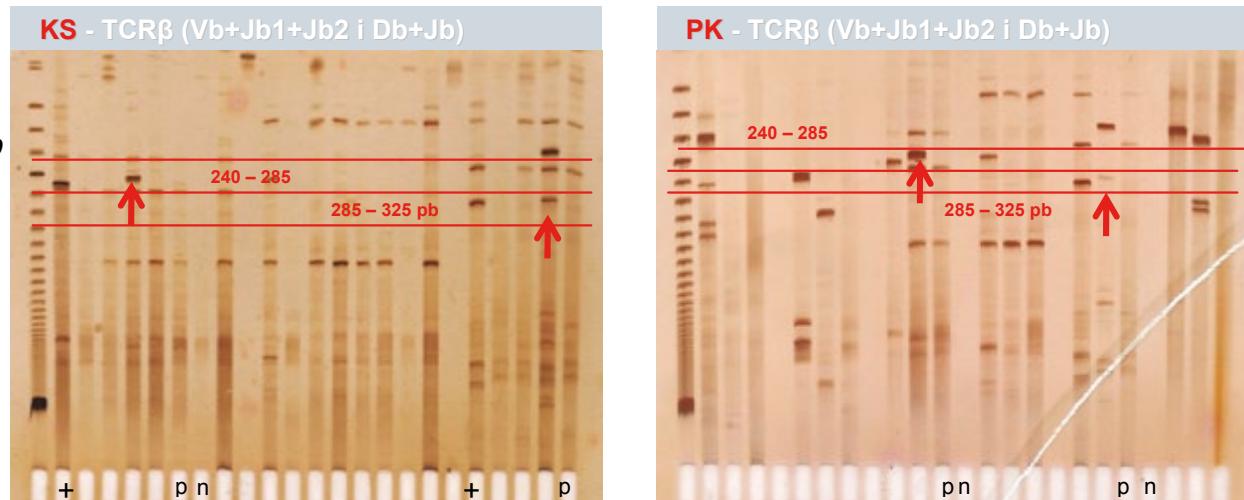


Slika 1. H&E bioptata koštane srži i MGG razmaza periferne krvi.



Slika 2. Imunohistokemijsko određivanje fenotipa tumorskih stanica na uzorku bioptata koštane srži.

Uzorak koštane srži poslan na analizu klonalnosti pokazao je klonalnu preuredbu u genu za receptor TCR β kao i u genu za teški lanac imunoglobulina.



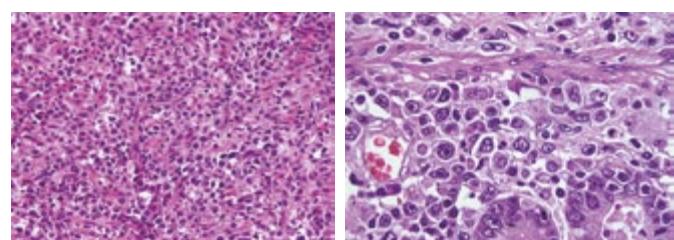
Slika 3. Prikaz rezultata procjene klonalnosti – analize preuredbe TCR β , IGH i IGK gena.

Nakon rasprave na radionici zaključeno je da je metoda ispravno korištena i očitana te da je ovakav slučaj moguć u čak 20% slučajeva.

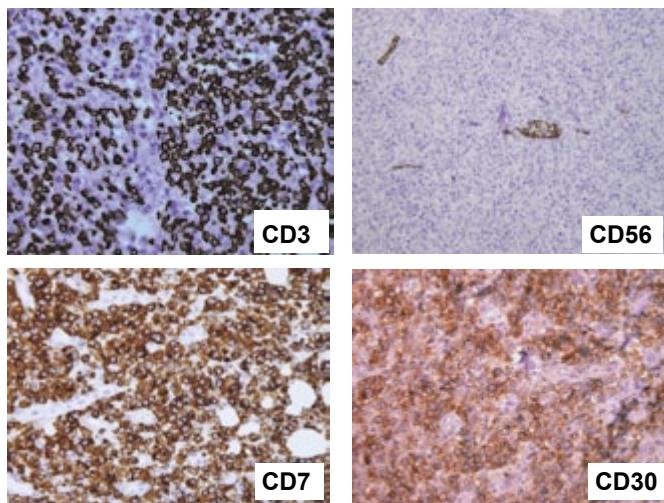
SLUČAJ 2.

Pacijentica 1974. godište primljena je u lipnju 2008. godine zbog proljeva i bolova u abdomenu. Postavljena je sumnja na upalnu bolest crijeva. U travnju 2009., prema anamnezi, učinjena je ileo/colonoskopija, iako pacijentica nema dokumentaciju o istoj. Zbog jakih bolova i slike ileusa pacijentica je hospitalizirana 2010. godine. Učinjena je resekcija 40 cm tankog crijeva (ileuma). Nađen je tumor veličine 7 cm. Patohistološki nalaz bio je enteropatija

povezana s T-staničnim limfomom, tip I (EATL) (Slika 4.). Tumorske stanice bile su CD3+, CD7+, CD30+, CD56-, Granzyme B+, TIA-1+, Ki67+, CD20-, BCL2-, BCL6-, CD10-, CD2-, CD5-, CD56-, CD4-, CD8- (Slika 5.).

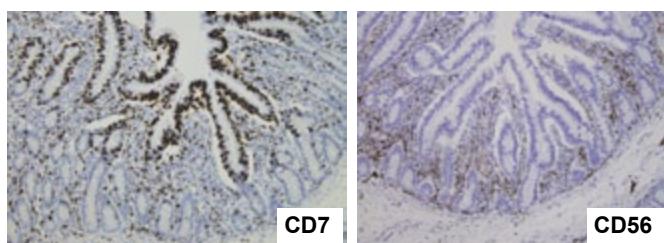


Slika 4. H&E histološkog uzorka tumorskog tkiva.



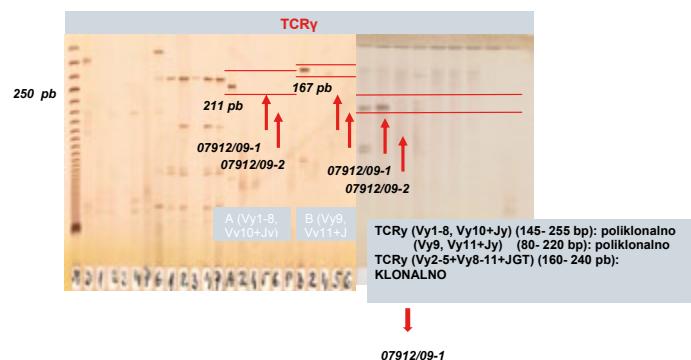
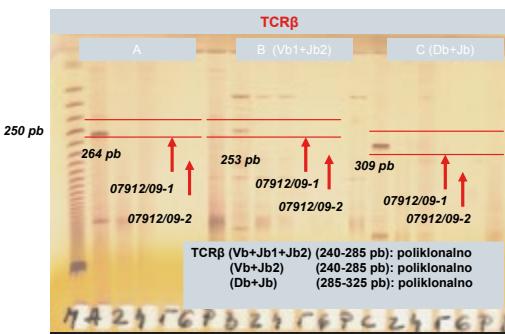
Slika 5. Imunohistokemijsko određivanje fenotipa tumorskih stanica.

Analizom okolnog tkiva izvan tumora utvrđena je enteropatija, tj slika celijakije, sa infiltracijom atrofične sluznice stanicama istog fenotipa: CD3+, CD7+, TIA1+, Granzyme B+, CD2-, CD5-, CD4-, CD8-, CD56- (Slika 6.).



Slika 6. Imunohistokemijsko određivanje fenotipa stanica u sluznici crijeva kraj tumorskog tkiva.

Analiza gena za T stanične receptore β i γ prema protokolu BIOMED2 oba uzorka (tumorskog tkiva i uzorka tkiva sluznice) pokazala je poliklonalnu sliku tj. ni u jednom uzorku nije nađena klonalna preuredba tih gena. Analiza preuredbe gena TCR γ prema protokolu opisanom 1996. godine (Födinger M et al. Br J Haematol. 1996;94(1):136-9.) pokazala je klonalnu preurebu u uzorku tumorskog tkiva (Slika 7.).



Slika 7. Prikaz rezultata procjene klonalnosti – analize preuredbe TCR β i TCR γ gena.

Zaključeno je da je metoda procjene preuredbe oba gena prema protokolu BIOMED 2 napravljena i očitana ispravno, te da je rezultat dobiven starim protokolom vjerodostojan samo ako ga je moguće potvrditi dokazom preuredbe TCR δ za što trenutno ne postoje komercijalno dostupni kitovi.

Kao ukupni zaključak, upozoravamo na važnost smjernica objavljenih 2003. godine (van Dongen JJM i sur. Leukemia 2003;17:2257-2317.):

“results of molecular clonality studies should always be interpreted in the context of the clinical, morphological and immunophenotypic diagnosis”.

Morfologija u dijagnostici kroničnih Philadelphia negativnih mijeloproliferativnih neoplazmi

Dr. sc. Tajana Štoos-Veić, dr.med.¹

Dr. sc. Čedna Tomasović-Lončarić, dr.med.²

Dr. sc. Gorana Aralica, dr.med.²

¹ Odjel za citologiju i protočnu citometriju

² Klinički zavod za patologiju

KB Dubrava, Zagreb

E-pošta: tveic@kbd.hr, ctomasov@kbd.hr,

garalica@kbd.hr

Otkriće stečene točkaste somatske mutacije gena Janus Kinase2 (*JAK2*) koji se nalazi na kratkom kaku 9-og kromosoma, a nađena u većine bolesnika s Philadelphia negativnim mijeloproliferativnim sindromom (1-4), dalo je veliki zamah istraživanju patogeneze Ph negativnih kroničnih mijeloproliferativnih bolesti. Dosadašnji rezultati istraživanja ugrađeni su u novu klasifikaciju Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) 2008 godine (5) koja objedinjuje kliničke, morfološke, imunofenotipske, genetske i molekularne značajke pri postavljanju dijagnoze hematoloških bolesti. Primjena nove klasifikacije odrazila se i u nazivlju kroničnih mijeloproliferacija koje dobivaju naziv neoplazme što odražava znanje o njihovu klonalnom porijeklu.

Usprkos postignutom napretku u razumijevanju patogeneze mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN), a posebno tri klasične, Ph-negativne MPN: policitemije vere (PV), esencijalne trombocitemije (ET) i primarne mijelofibroze (PMF), još je ostalo otvoreno pitanje kako mutacija jednog gena, *JAK2^{V617F}*, može biti odgovorna za različite morfološke i kliničke značajke MPN-a. *JAK2^{V617F}* mutacija ne pomaže u razlikovanju tri glavna fenotipska subtipa MPN (PV, ET i PMF). Isto tako se pokazalo da neke bolesti s jasno izraženim mijeloproliferativnim značajkama nemaju mutaciju *JAK2^{V617F}* te da *JAK2* mutacija nije prvi genetski događaj u patogenezi MPN (6).

Većina bolesnika s PV (oko 95%) su nosioci *JAK2^{V617F}* mutacije ili imaju drugi molekularni marker (npr. exon12 mutaciju), dok oko 50% bolesnika s PMF i ET nema molekularni marker. Stoga je morfološka dopunski kriterij za dijagnozu PV, dok je morfološka analiza koštane srži jedan od glavnih dijagnostičkih kriterija potrebnih za dijagnozu ET i PMF.

Morfološka klasifikacija temelji se na inicijalnim uzorcima koštane srži, uzetim prije terapije. Citološki razmazi aspirata koštane srži i histološki nalaz koštane biopsije su komplementarne metode i primjenjene zajedno omogućavaju potpuni uvid u

morfologiju koštane srži, a konačna interpretacija i postavljanje dijagnoze zahtjeva integraciju nalaza u perifernoj krvi, koštanoj srži (aspirat i biopsija) te relevantnih dodatnih testova kao što su imunofenotipizacija protočnim citometrom, citogenetika te molekularne analize (7).

Kako ponekad postoje preklapanja kliničke slike i laboratorijskih nalaza, morfološka analiza nam pruža dodatnu mogućnost razlikovanja JAK2 negativnih MPN od reaktivnih stanja, kao i međusobnog razlikovanja subtipova kako JAK2 pozitivnih tako i JAK2 negativnih MPN.

Prema preporukama SZO za morfološku dijagnostiku MPN prije svega potreban je adekvatan uzorak!

Za citološku analizu to znači da se analizira razmaz aspirata koji sadrži partikle koštane srži i primjeren je razmazan bez obzira na metodu razmazivanja (stakлом preko stakla, poput razmaza periferne krvi ili kombinacija) te je dobro osušen tj. fiksiran i obojan (7).

Za histološku analizu uzorak odgovarajuće veličine (najmanje 1,5 cm) treba uzeti pod pravim kutem u odnosu na korteks te ga odgovarajuće fiksirati i kasnije obraditi (8).

Ujedno, preporuča se svakako ujednačeni pristup morfološkoj analizi koštane srži.

U bioptatima koštane srži potrebno je analizirati 10 intertrabekularnih prostora, ocijeniti celularnost uzorka, analizirati morfologiju, sazrijevanje, zastupljenost i topografiju loza te ocijeniti stupanj fibroze (koristi se europski sustav graduiranja).

U citološkom razmazu aspirata analiziraju se isti parametri, osim fibroze koja se u citološkim uzorcima ne vidi nego se o njenom prisustvu zaključuje posredno, dok se bolje vide stanični detalji te se može napraviti mijelogram. Analiziraju se zastupljenost, sazrijevanje i morfologija loza.

Uvijek je potrebno korelirati nalaz aspirata koštane srži s nalazom bioptata jer se npr. broj nezrelih stanica tj. blasta dobivenih raznim metodama ne mora podudarati. U slučaju neslaganja, uobičajeno se uzima nepovoljniji nalaz kao relevantan.

Policitemija vera

Prema SZO glavni kriteriji za dijagnozu PV uključuju povišene vrijednosti hemoglobina (Hb) (>185g/L u muškaraca, >165 g/L u žena) te prisutnost *JAK2^{V617F}* ili druge funkcionalno slične muta-

cije (npr. *JAK2* exon12 mutacije). Morfologija je tek jedan od dopunskih kriterija potrebnih za dijagnozu.

Kriteriji za morfološku dijagnozu PV su:

- trilinijska proliferacija zrelih hematopetskih stanica u koštanoj srži (povećana celularnost)
- odnos loza uredan ili pomaknut u korist crvene loze
- eritrocitopoeza normoblastična, umnožena
- granulopoeza zrela, morfološki uredna
- umnoženi, polimorfni, mali i veliki, zreli megakariociti hiperlobuliranih jezgara
- negativno fagocitirano željezo

U razmazima periferne krvi nema većih morfoloških osobitosti, mogu se naći:

- gusti, zbijeni, normokromni eritrociti
- često leukocitoza i trombocitoza
- blaga bazofilija
- score leukocitne alkalne fosfataze (APL) najčešće povišen

Iako je ponekad dijagnoza PV jasna već iz oba glavnih kriterija, inicijalna morfologija (biopsija) ko-

štane srži može doprinijeti točnoj subtipizacije MPN u nejasnim slučajevima gdje se preklapaju laboratorijski i klinički parametri. Uz to, početna morfologija olakšat će praćenje tijeka bolesti. Poznato je da oko 20% bolesnika s PV može razviti postpolicitemijsku fibrozu koja se morfološki ne može razlikovati od PMF ili razvoja fibroze u tijeku drugih hematoloških bolesti (MPN, MDS, MPN/MDS).

Dva osnovna morfološka uvjeta za dijagnozu post-PV fibroze uključuju verificiranu prethodnu PV i to po kriterijima WHO iz 2008. godine te prisutvo fibroze koštane srži 3. ili 4. stupnja prema europskom sustavu graduiranja (9) (isključivo biopsija!). Ako nema početne morfologije, postavit će se morfološka dijagnoza na temelju trenutačnog stanja što ne mora odgovarati stvarnom stanju.

Primarna mijelofibroza i esencijalna trombocitemija

Standardizirana morfološka analiza koštane srži uključuje analizu već navedenih parametara, a prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Morfološke značajke od utjecaja na dijagnozu MPN.

| | PMF 0-1 | ET | Reaktivna koštana srž |
|-------------------------------------|-----------------------------|--------------|------------------------------|
| Celularnost | povećana | normalna | varijabilna |
| Granulopoeza | umnožena | normalna | varijabilna |
| Eritropoeza | oskudnija | normalna | varijabilna |
| Stupanj fibroze (retikulin)* | nije umnožen/lagano umnožen | nije umnožen | nije umnožen |

*Značajka koja se ne može ocijeniti u aspiratima koštane srži

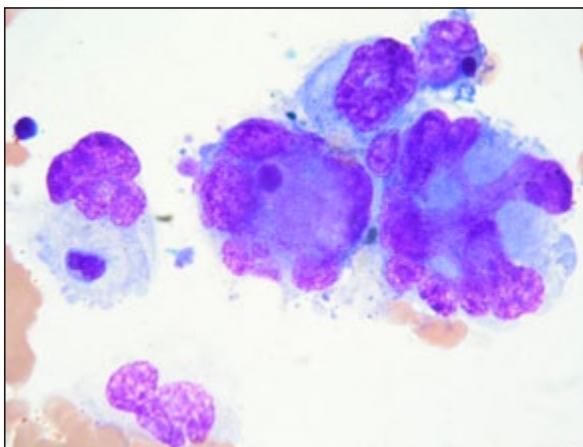
U dijagnostici MPN od posebnog su interesa topografija i morfologija megakariocita, prikazani u Tablici 2, te na slikama 1, 2, 3 i 4.

Tablica 2. Morfološke značajke megakariocita.

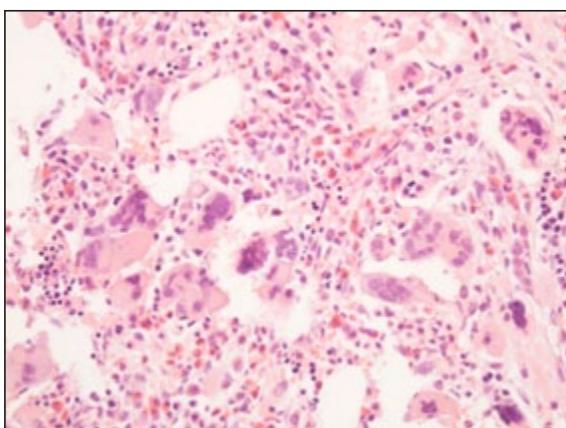
| | PMF 0-1 | ET | Reaktivna koštana srž |
|--------------------------------|---|--|--|
| Broj | umnoženi | jako umnoženi | umnoženi |
| Raspored (topografija)* | uglavnom kohezivne nakupine | pojedinačni, rahle nakupine | uglavnom pojedinačni, rijetko peritrabekularno |
| Veličina i sazrijevanje | mali, srednje veliki, do veliki, različite zrelosti | veliki do divovski, zreli | normalni, uglavnom zreli |
| Izgled jezgara | nepravilno lobulirane, oblačaste, izrazito polimorfne | izrazito lobulirane i duboko presavijene | umjereno lobulirane, umjereno polimorfne |

*Značajka koja se ne može dobro ocijeniti u aspiratima koštane srži.

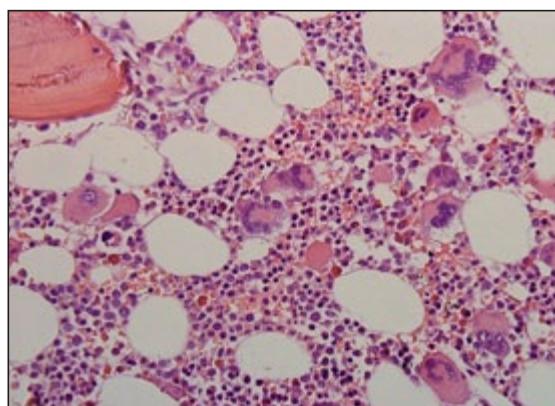
I uz pridržavanje svih navedenih kriterija, jasno je da se morfološki ne mogu subtipizirati svi slučajevi MPN, niti se mogu uvijek sa sigurnošću razlikovati od reaktivnih stanja. Obavezno je stoga u dijagnozu uklopiti kliničke, laboratorijske i molekularne podatke. Iako nije sasvim egzaktna, morfološka dijagnoza je nezavisni prediktor preživljjenja, prognoze i progresije bolesti (10). Klasifikacija SZO iz 2008. godine ne jamči 100% dijagnostičku točnost, ali ipak će omogućiti točniju subtipizaciju a time i praćenje tijeka MPN.



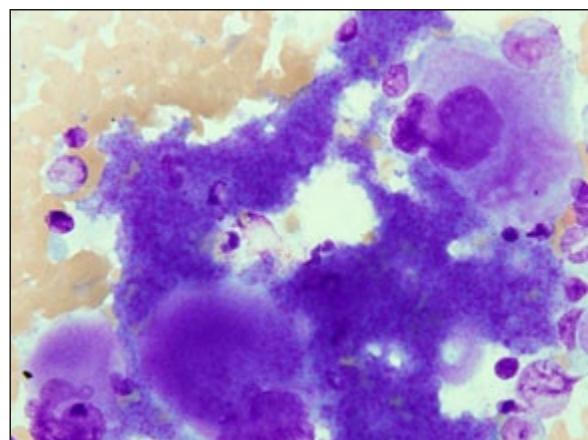
Slika 1. Izrazito polimorfni zreli i nezrelji megakariociti u PMF, citološki razmaz (MGG, 1000x).



Slika 2. PMF, biopsija (HE,400x).



Slika 3. ET, biopsija (HE,400x).



Slika 4. Divovski megakariociti i plaže trombocita, ET, citološki razmaz (MGG, 1000x)

Literatura:

1. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434:1144-8.
2. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7:387-97.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passewag JR et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352:1779-90.
4. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired Jak2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005; 280: 22788-92.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed., IARC press, Lyon, 2008.
6. Hussein K, Bock O, Kreipe H. Histological and molecular classification of chronic myeloproliferative disorders in the age of JAK2: persistence of old questions despite new answers. *Pathobiology*. 2007; 74:72-80.
7. S-H Lee et al. For The International Council For Standardization In Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports *Int Jn Lab Hem*. 2008; 30:349-364.
8. Vardiman JW in: WHO classification of tumors. 4th Edition. IARC, Lyon. 2008
9. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, FrancoV, van der Velden WJ, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005; 90:1128-1132.
10. Barbuli T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*. 2011; 29(23):3179-84.

Izraženost proteina NOTCH1 i JAGGED1 u monoklonalnoj gamapatiji neodređenog značenja i multiplom mijelomu

Anita Škrtić^{1,2}, Petra Korač^{1,2}, Delfa Radić Krišto³,

Radmila Ajduković-Stojisavljević⁴,

Davor Ivanković⁵, Mara Dominis^{1,2}

¹ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

² Klinički zavod za patologiju i citologiju,

KB Merkur, Zagreb

³ Hematološki odjel, Klinika za unutarnje bolesti,

KB Mekur, Zagreb

⁴ Odjel za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
KB Dubrava, Zagreb

⁵ Katedra za medicinsku statistiku, epidemiologiju
i medicinsku informatiku, Škola narodnog zdravlja
„Andrija Štampar“, Medicinski fakultet Sveučilišta u
Zagrebu, Zagreb

Adresa za kontaktiranje:

Dr. sc. Anita Škrtić, dr. med.

Klinički zavod za patologiju i citologiju

Klinička bolnica Merkur

E-pošta: skrtic.anita@gmail.com

Multipli mijelom (MM) i monoklonalna gamapatija neodređenog značenja (MGUS) predstavljaju dva različita entiteta unutar heterogene skupine plazma staničnih novotvorina, no ipak dijele određena zajednička obilježja; dobnu pojavnost tumora, spolnu zastupljenost, visinu proliferativnog indeksa i apoptoze u tumorskim stanicama, izraženost staničnih biljega i citogenetičke promjene (1). MM i MGUS obilježavaju složene numeričke i strukturalne citogenetičke promjene te najvjerojatnije predstavljaju primarni događaj u patogenezi plazma staničnih novotvorina (2-5).

Notch signalni put također sudjeluje u patogenezi multiplog mijeloma što pokazuju rezultati visoke izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama (6). NOTCH1 i JAGGED1 članovi su obitelji Notch receptora (Notch1/2/3/4 i 5) i Notch liganda (Jagged1/2, Delta-like 1/3/4) koji pripadaju tipu I transmembranskih proteina. Notch signalni put ima značajnu ulogu u hematopoezi, u regulaciji T- i B- stanične diferencijacije hematopoetskih matičnih stanica (7,8). Poznata je uloga NOTCH1 gena u razvoju akutne T- stanične limfoblastične leukemije/limfoma (9). Uloga Notch signalnog puta u razvoju B- staničnih novotvorina nije u potpunosti razjašnjena. Postoji kontroverzno mišljenje o djelovanju Notch signalnog puta i aberantne izraženosti proteina NOTCH1 i JAGGED1 na ponašanje tumorskih plazma stanica u MM-u inhi-

bicijom rasta i apoptoze ili indukcijom proliferacije (6, 8,10-15).

U nedavno objavljenoj studiji (16) po prvi put prikazana je statistički značajno veća učestalost izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u MM-u u odnosu na MGUS, veća učestalost jakog intenziteta imunohistokemijskog bojanja u tumorskim plazma stanicama MM-a kao i razlika u izraženosti oba proteina u bolesnika s MGUS-om koji su razvili kliničku sliku MM-a. Značajno češće jaki intenzitet izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina nađen je u bolesnika oboljelih od MM-a koji su imali morfološka obilježja difuznog tipa infiltrata te morfološki gradus III plazma stanice u koštanoj srži. Rezultati izraženosti NOTCH1 i JAGGED1 proteina u tumorskim plazma stanicama MGUS-a, MM-a proizvođen iz MGUS-a i MM-a ukazuju na moguću ulogu navedenih proteina u patogenezi multiplog mijeloma. Ostaje otvoreno pitanje uloge prisutnog Notch signalnog puta u primarnom, *de novo* MM-u bez prethodne dijagnoze MGUS-a i sekundarnom MM-u proizvođen iz MGUS-a; da li taj put sudjeluje u proliferaciji/inhibiciji i/ili apoptizi tumorskih stanica, ili u složenoj signalnoj mreži mikrookoliša koštane srži? Značajna izraženost oba proteina u plazma stanicama MM-a u odnosu na stanice MGUS-a upućuje na moguću vrijednost NOTCH1 i JAGGED1 proteina u imunohistokemijskoj analizi infiltrata MM-a u koštanoj srži.

Literatura:

- Grogan TM, Van Camp B, Kyle RA, Muller-Hermelink HK, Harris NL. Plasma cell neoplasms. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon (FR): IARC Press; 2001.
- Chesi M, Bergsagel PL, Brents LA, Smith CM, Gerhard DS, Kuehl WM. Dysregulation of cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines. Blood. 1996;88:674-81.
- Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. Immunol Rev. 2003;194:96-104.
- Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, et al. Intergroupe Francophone du Myélome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. Blood. 2002;99:2185-91.
- Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood. 2002;100:1417-24.
- Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. Blood. 2006;107:2223-33.

7. Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood*. 1999;93:2431-48.
8. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284:770-6.
9. Ellisen LW, Bird J, West DC, et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 1991;66:649-61.
10. Houde C, Li Y, Song L, et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood*. 2004;104:3697-704.
11. Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, et al. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103:3511-5.
12. Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabrilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood*. 2004;103:3503-10.
13. Morimura T, Goitsuka R, Zhang Y, Saito I, Reth M, Kitamura D. Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells. *J Biol Chem*. 2000;275:36523-31.
14. Romer S, Saunders U, Jäck HM, Jahn BM. Notch1 enhances B-cell receptor-induced apoptosis in mature activated B cells without affecting cell cycle progression and surface IgM expression. *Cell Death Differ*. 2003;10:833-44.
15. Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood*. 2005;106:3898-906.
16. Škrkić A, Korač P, Krišto DR, Ajduković Stojisavljević R, Ivanković D, Dominis M. Immunohistochemical analysis of NOTCH1 and JAGGED1 expression in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hum Pathol*. 2010;41:1702-10.

Mikrookoliš koštane srži u mijelomagenezi

**Emina Babarović¹, Toni Valković², Sanja Štifter¹,
Irena Seili Bekafigo³, Antica Duletić Načinović²,
Ksenija Lučin¹, Nives Jonjić¹**

¹ Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

² Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Rijeka

³ Klinička jedinica za kliničku citologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Rijeka

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Nives Jonjić, dr. med.

Zavod za patologiju

Klinički bolnički centar Rijeka i

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: nives@medri.hr

Multipli mijelom (MM) drugi je najčešći oblik krvne maligne bolesti koji čini 10% svih hematoloških novotvorina, a uzorkuje 2% smrtnosti od svih malignih oboljenja. Više od 10000 bolesnika umire svake godine od MM ili komplikacija ove bolesti (1). Brojne studije pokazale su da je razvoj bolesti postepen. Monoklonalna gammopathia neodređena značenja (engl. monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS) je premaligno stanje koje gotovo uvijek prethodi nastanku mijeloma, no patogeneza progresije u MM je i dalje nerazjašnjena. Rizik progresije u MM ili drugi limfoproliferativni poremećaj je približno 1% godišnje (2). Tijekom vremena usporedno s plazma stanicama koje nakupljuju genetske promjene dolazi i do promjena u mi-

krookolišu. Interakcije citogenetski promijenjenih plazma stanica i mikrookoliša imaju ključnu ulogu u progresiji bolesti, u patogenezi koštane resorpcije i aktivaciji procesa angiogeneze (3).

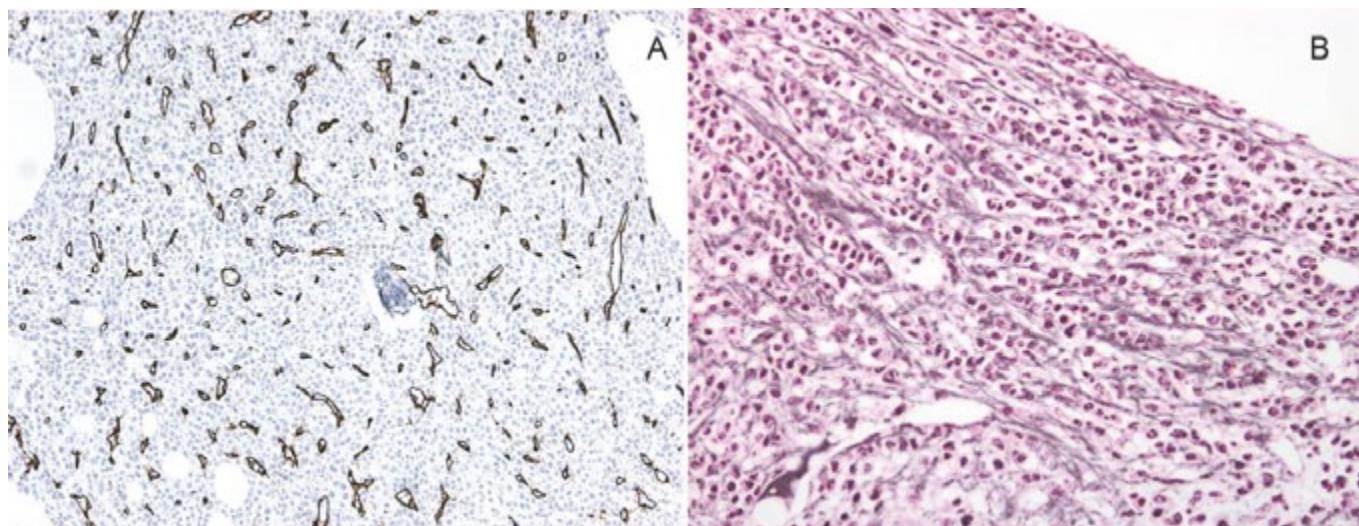
Mikrookoliš koštane srži u MM sastoji se od tumorskih plazma stanica, proteina izvanstaničnog matriksa, stromalnih stanica koštane srži i njihovih čimbenika rasta i inhibitora, vaskularnih endotelnih stanica, mikrovaskulature i angiogenih čimbenika, osteoblasta, osteoklasta i upalnih stanica. Danas postoje brojni dokazi da interakcija mijelomske stanice sa stanicama mikrookoliša, neposrednim kontaktom putem adhezijskih molekula ili lučenjem brojnih citokina, omogućava proliferaciju, migraciju i preživljavanje plazma stanica, ali i rezistenciju na lijekove te progresiju koštane bolesti i aktivaciju procesa angiogeneze (4-6). Stromalne stanice koštane srži luče stromalni čimbenik 1 (engl. stromal derived factor 1, SDF-1) i čimbenik rasta nalik inzulinu 1 (engl. insulin like growth factor 1, IGF-1) koji djeluju kemotaksički na mijelomske stanice i zaslužni su za proces udomljenja (engl. homing) mijelomske stanice u koštanoj srži. Adhezija mijelomske stanice na stromalne stanice koštane srži putem α4β1 integrinske – vaskularne stanične adhezijske molekule 1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) inducira stromalne stanice na sekreciju citokina poput interleukina 6 (IL-6), IL-1β, IL-11, čimbenik nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor, TNF), transformirajući čimbenik rasta (engl. transforming growth factor, TGF) i ligand receptora aktivatora jezgrinog čimbenika kappa B (engl. re-

ceptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, RANKL). Ovi citokini zajedno nazivaju se aktivatorima osteoklasta. Nekoliko studija pokazalo je da stimuliraju proliferaciju i funkciju osteoklasta, a suprimiraju osteoblaste što dovodi do narušene ravnoteže u koštanom mikrookolišu s posljedičnom pojačanom razgradnjom kosti. Nadalje, pojačana razgradnja kosti, veći broj i aktivnost osteoklasta potiču rast i progresiju mijelomske stanice, direktno putem stanične adhezije ili indirektno lučenjem citokina kao što je IL-6.

IL-6 preko aktivacije jezgrinog čimbenika kappa B (engl. nuclear factor kappa B, NF- κ B) snažno stimulira proliferaciju mijelomske stanice i štiti ih od deksametazonom inducirane apoptoze. Aktivacija transkripcijskog faktora NF- κ B odgovorna je i za produkciju drugih faktora rasta i adhezijskih molekula, od strane mijelomske stanice i stromalnih stanica mikrookoliša, kao što su vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF), VCAM-1 i E-selektin. Time se zatvara začarani krug između koštane destrukcije i proliferacije tumorskih stanica, a stromalne stanice pružaju neprestani poticaj za rast i proliferaciju tumora.

Glavno obilježje mijelomske bolesti je golema raznolikost u kliničkoj prezentaciji, genetičkim abnormalnostima i ishodu bolesti. Najvažniji napredak učinjen je u razumijevanju genetičke heterogenosti bolesti i njezinom velikom utjecaju na ishod bole-

nika s MM. No, i dalje ostaje nerazjašnjeno koliko na heterogenost MM utječe in vivo razlike u interakcijama između tumorskih i stromalnih stanica koštane srži. Nekoliko nedavnih studija je ukazalo na važne funkcionalne i fenotipske razlike između stromalnih stanica koštane srži bolesnika s MM u odnosu na iste te stanice dobivene iz koštane srži zdravih volontera. Stomalne stanice koštane srži bolesnika s MM, u funkcionalnim studijama, lučile su više koncentracije IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF-alpha, osteopontina (OPN), hepataltog čimbenika rasta (engl. hepatalt growth factor, HGF) i B-staničnog aktivirajućeg čimbenika iz TNF obitelji (engl. B-cell-activating factor of the TNF family, BAFF), osim toga njihova sposobnost da se diferenciraju u osteoblaste i da inhibiraju proliferaciju T-stanica je bila oštećena (7-9). Kao posljedica ovakvih istraživanja učinjen je znatan napredak u razumijevanju biologije bolesti što je dovelo do razvoja brojnih novih učinkovitijih lijekova koji su konstruirani s posebnim djelovanjem upravo na interakciju tumorskih stanica i okolne strome (10,11). Nove spoznaje otvaraju mogućnost bolje i individualizirane terapije bolesnika. Međutim, u rutinskim laboratorijskim tehnikama tijekom pregleda koštane srži u obzir se uzima samo broj plazma stanica, a malo pažnje se posvećuje morfološkim promjenama u mikrookolišu koštane srži, kao što su to angiogeneza i fibroza (Slika 1.), što bi trebalo poboljšati i standardizirati tijekom praćenja bolesnika.



Slika 1. Imunohistokemijsko bojenje cilindra koštane biopsije sa CD34 prikazuje pojačanu angiogenezu u novodijagnosticiranog bolesnika s MM, na povećanju x100 (A). Primjer Gomory bojenja cilindra koštane biopsije prikazuje nježnu mrežu tankih retikulinskih vlakana s brojnim križanjima, na povećanju x200 (B).

Komponente tumorskog mikrookoliša su tijesno povezane u svim fazama intramedularnog rasta. U ovom dinamičnom sustavu svi su elementi kontinuirano u interakciji, a promjene samo jednog elementa mogu dramatično promijeniti cijeli sustav i događaju se neprestano tijekom bolesti i nakon provedenog liječenja. Zbog navedenih razloga izuzetno je bitno detaljnije istražiti kompleksnu mrežu mikrookoliša koštane srži kako bi se pronašli novi biljezi koji bi pomogli u boljoj dijagnostici i prepoznavanju podskupina bolesnika s različitim tijekom bolesti, te u praćenju terapijskog odgovora, a samim tim i u liječenju ove maligne bolesti.

Literatura:

1. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. Lancet. 2009;25(374):324-39.
2. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. Blood. 2009; 28;113(22):5418-22.
3. Rajkumar SV. Prevention of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Clin Cancer Res. 2009;15(18):5606-8.
4. Balakumaran A, Robey PG, Fedarko N, Landgren O. Bone marrow microenvironment in myelomagenesis: its potential role in early diagnosis. Expert Rev Mol Diagn. 2010;10(4):465-80.
5. Mahindra A, Hideshima T, Anderson KC. Multiple myeloma: biology of the disease. Blood Rev. 2010;24 Suppl 1:S5-11
6. Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. Genes Nutr. 2008;3(1):29-34
7. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaiani AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, Larghero J. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. Leukemia. 2007;21(1):158-63.
8. Zdzisińska B, Bojarska-Junak A, Dmoszyńska A, Kandef-Szerszeń M. Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells. Arch Immunol Ther Exp. 2008;56(3):207-21.
9. Corre J, Mahtouk K, Attal M, Gadelorge M, Huynh A, Fleury-Cappellosso S, Danho C, Laharrague P, Klein B, Rème T, Bourin P. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. Leukemia. 2007;21(5):1079-88.
10. Ocio EM, San Miguel JF. The DAC system and associations with multiple myeloma. Invest New Drugs. 2010; Suppl 1:S28-35.
11. Morgan G. Future drug developments in multiple myeloma: an overview of novel lenalidomide-based combination therapies. Blood Rev. 2010;24 Suppl 1:S27-32.

Fotografije iz Tuheljskih Toplica sa sastanka Krohema u svibnju 2011.

Dubravka Sertić, dr. med.



Tri godine, šest brojeva, 110 članaka i 308 stranica Biltena Krohema

Dražen Pulanić

Prvi broj Biltena Krohema tiskan je u ožujku 2009. godine, potaknut pitanjima i željama članova Krohema za publikacijom koja bi pratile sastanke Krohema i pisanim putem obavještavala članove Krohema o aktivnostima i smjernicama Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem donesenim na pojedinim sastancima.

Od tada pa sve do danas svake godine su tiskana dva broja Biltena Krohema, dakle sveukupno šest brojeva u tri godine izlaženja, prateći stručne sastanke Krohema koji se održavaju također dva puta godišnje. Svi brojevi Biltena Krohema ujedno se nalaze i na web stranicama Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem.

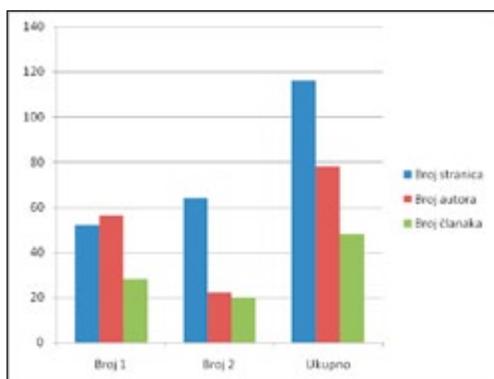
Slika 1. pokazuje naslovnice svih brojeva Biltena Krohema, po dvije svake godine, odnosno dvije svake godine po volumenu.

Slika 1. Naslovnice svih brojeva Biltena Krohema po godištima / volumenima.

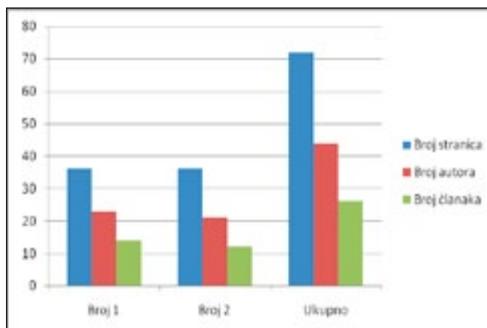


Grafički prikaz broja stranica, broja članaka i broja autora koji su sudjelovali u pisanju tih članaka po pojedinim godinama/volumenima Biltena Krohema prikazuju Slike 2a, 2b. i 2.c.

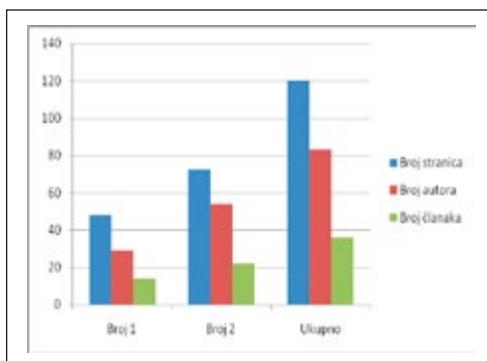
Slika 2a. Broj stranica, autora i članaka Biltena Krohema 2009. godine, Volumen 1., brojevi 1 i 2, te sveukupno u 2009. godini.



Slika 2b. Broj stranica, autora i članaka Biltena Krohema 2010. godine, Volumen 2., brojevi 1 i 2, te sveukupno u 2010. godini.

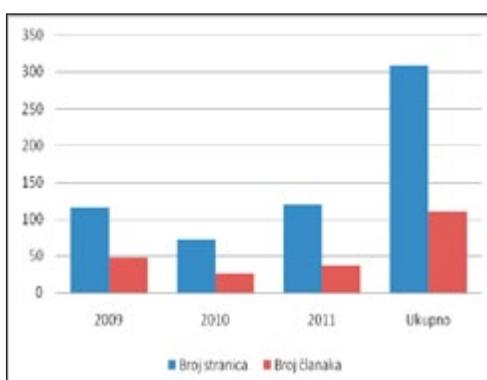


Slika 2c. Broj stranica, autora i članaka Biltena Krohema 2011. godine, Volumen 3., brojevi 1 i 2, te sveukupno u 2011. godini.



Kako se može vidjeti iz Slike 3. i ostalih grafičkih prikaza, u ove tri godine, od 2009. do 2011., publicirano je 110 članaka na sveukupno 308 stranica Biltena Krohema, uz veliki broj autora (u nekim radovima je sudjelovalo više koautora, a također su mnogi autori sudjelovali u pisanju više radova).

Slika 3. Broj stranica i članaka Biltena Krohema po pojedinim godinama i sveukupno.



Aktivno sudjelovanje velikog broja članova u pisanju u Biltenu Krohema najbolji je pokazatelj da je glasilo prepoznato kao koristan medij kojim se bilježe zbivanja i inicijative Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem. Hoće li se u sljedećim godinama glasilo profesionalizirati, kako će se dalje razvijati i kakav oblik časopisa nam je nadalje potreban, pokazat će vrijeme.

