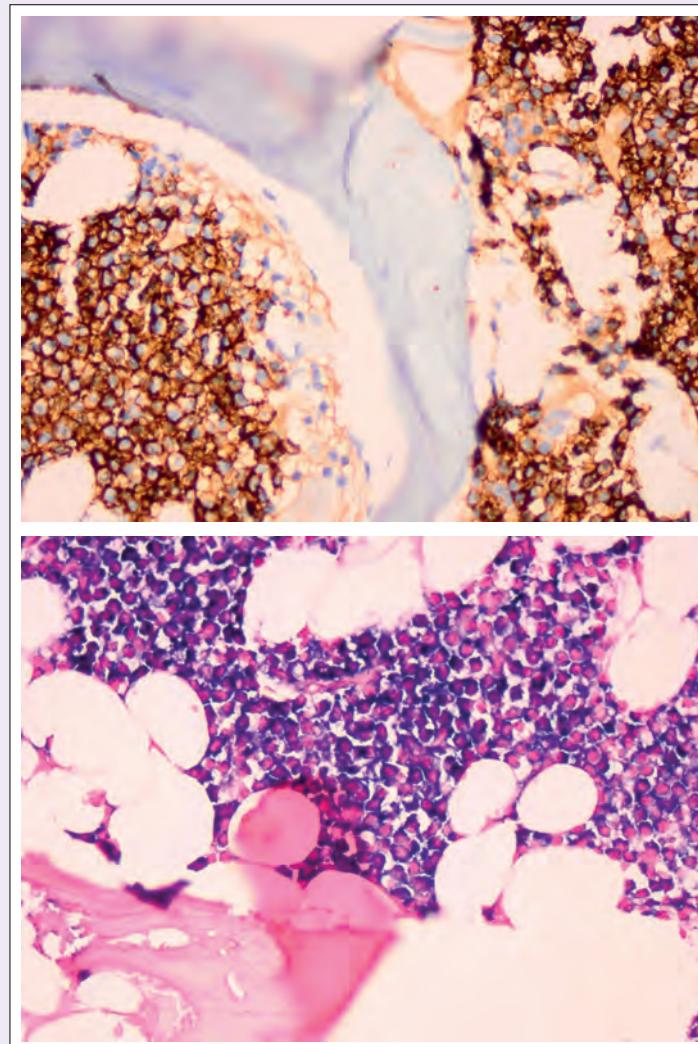


Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM



Volumen 5., Broj 1.

Krohema

Impresum

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM

Volumen 5., Broj 1., Svibanj 2013.

Nakladnik:

Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM

Za nakladnika:

Damir Nemet

Glavni urednik:

Dražen Pulanić

Tajnica Uredništva:

Lana Grković

Uredništvo:

Srđana Čulić, Ivan Host, Inga Mandac Rogulj, Vlatka Periša, Mario Piršić

Tajnica KROHEM-a:

Dijana Perčin

Autori tekstova:

Gorana Aralica	Ksenija Lučin
Višnja Armando	Inga Mandac Rogulj
Igor Aurer	Marko Martinović
Manuela Avirović	Danica Matišić
Josip Batinić	Sanja Mazić
Ernest Bilić	Bojana Mohar
Ines Bojanic	Mirta Mikulić
Aleksandra Bonevski	Melita Nakić
Srđana Čulić	Damir Nemet
Irena Drmić Hofman	Alen Ostojić
Davorka Dušek	Slobodanka Ostojić-Kolonić
Ranka Femenić	Maja Pavlović
Koraljka Gjadrov Kuveždić	Marina Pažur
Njetočka Gredelj Šimec	Vlatka Periša
Branka Golubić Ćepulić	Filip Popović
Blaženka Grahovac	Ljubica Rajić
Tomislav Franjo Hajnžić	Suncica Ries
Gordana Jakovljević	Jelena Roganović
Ozren Jakšić	Jasminka Stepan
Biljana Jelić Puškarić	Dragana Šegulja
Nives Jonjić	Tajana Štoos-Veić
Irena Jukić	Čedna Tomasović-Lončarić
Gordana Kaić	Maja Tomičić
Ika Kardum-Skelin	Kristina Urch
Miljenko Katunarić	Maja Vanek
Josip Konja	Adriana Vince
Paško Konjevoda	Radovan Vrhovac
Dubravka Kuljiš	Renata Zadro

Uputa suradnicima:

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

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

Opis slike na naslovnici:

Multipli mijelom u biopsiji koštane srži. Na slici gore pozitivna je imunohistokemija na CD138, a na slici dolje pozitivna je *in situ* hibridizacija na lake kappa lance.

Ustupljeno i priređeno ljubaznošću **Ivane Karaman**, dr. med., Zavod za patologiju, sudsку medicinu i citologiju, KBC Split.

Sadržaj

Alen Ostojić, Radovan Vrhovac:	
Početak rada CELG AML-1 registra i pristupanje FIND-IA registru	2
Sunčica Ries, Koraljka Gjadrov Kuveždić, Renata Zadro:	
Prominentne nuklearne invaginacije u akutnim mijeloičnim leukemijama s <i>FLT3-ITD</i> mutacijom	4
Njetočka Gredelj Šimec, Slobodanka Ostojić-Kolonić:	
Predstavljanje Radne skupine za sindrom mijelodisplazije	7
Njetočka Gredelj Šimec:	
Presječna studija - MDS Hrvatska	8
Marko Martinović:	
Sindrom mijelodisplazije i analiza genskog ekspresijskog profila	9
Ernest Bilić, Kristina Urch, Paško Konjevoda, Filip Popović, Ranka Femenić, Josip Konja, Maja Pavlović, Srđana Čulić, Jelena Roganović, Melita Nakić, Tomislav Franjo Hajnžić, Gordana Jakovljević, Jasminka Stepan, Višnja Armanda, Dubravka Kuljiš, Aleksandra Bonevski, Ljubica Rajić:	
Učestalost leukemija i limfoma kod djece u Hrvatskoj	15
Ika Kardum-Skelin, Gordana Kaić, Biljana Jelić Puškarić, Marina Pažur, Maja Vanek:	
Citologija u pedijatrijskoj onkologiji	20
Srđana Čulić:	
Prikaz tromboze i trombofilije u djeteta	29
Srđana Čulić:	
Internacionalni registar za kroničnu mijeloičnu leukemiju u djece i adolescenata (I-CML-Ped Study)	32
Bojana Mohar, Miljenko Katunarić, Irena Drmić Hofman, Blaženka Graovac:	
Analiza mutacija u kinaznoj domeni fuzijskog gena BCR-ABL1 u bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom liječenih inhibitorima tirozin kinaze.....	34
Dragana Šegulja, Danica Matišić, Josip Batinić, Damir Nemet:	
Imunonefometrijsko određivanje monoklonskog proteina	38
Ines Bojanić, Sanja Mazić, Branka Golubić Ćepulić, Maja Tomičić, Irena Jukić, Mirta Mikulić, Njetočka Gredelj Šimec, Radovan Vrhovac:	
Indikacije, način prikupljanja i liječenje transfuzijama granulocita – preporuke KROHEM-a	39
Adriana Vince, Davorka Dušek, Igor Aurer:	
Prevencija reaktivacije HBV infekcije u bolesnika liječenih zbog zločudnih hematoloških bolesti	43
Ksenija Lučin, Manuela Avirović:	
Uloga mikrookoliša u limfomu stanica plaštene zone	45
Gorana Aralica, Čedna Tomasović-Lončarić, Tajana Štoos-Veić, Ozren Jakšić:	
Mikrookoliš u kroničnoj limfocitnoj leukemiji	48
Inga Mandac Rogulj:	
Intervju s dr. Stephanie J. Lee	51
Vlatka Periša:	
Kalendar predstojećih hematoloških skupova	53
Dubravka Sertić:	
Fotografije s posljednjeg sastanka KROHEM-a u Biogradu u studenome 2012. godine	54

Početak rada CELG AML-1 registra i pristupanje FIND-IA registru

Alen Ostojić, dr. med.¹,

Prof. dr. sc. Radovan Vrhovac, dr. med.^{1,2}

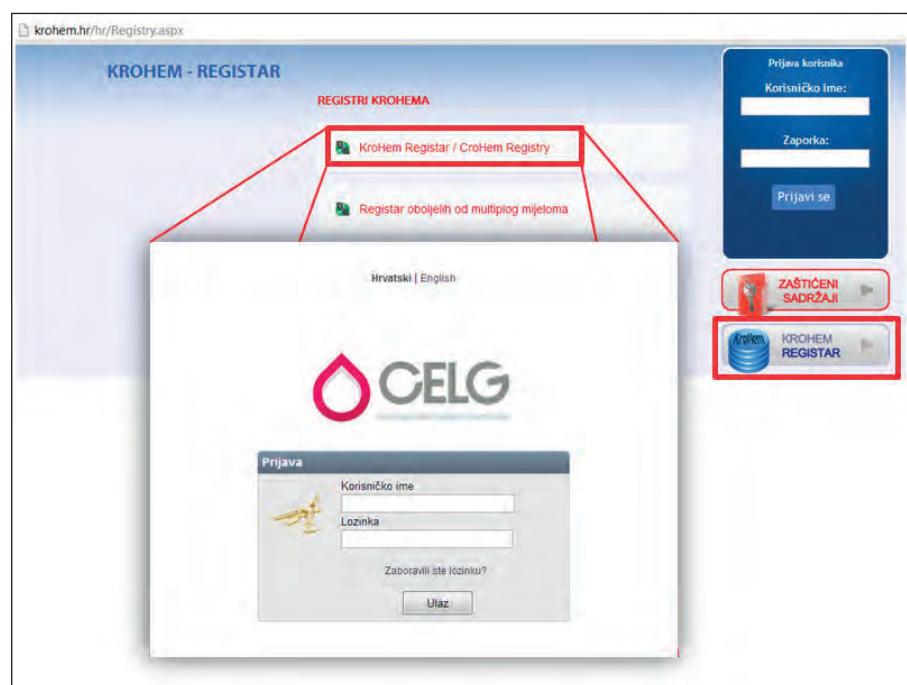
¹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
KBC Zagreb

² Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: alen.ostojoic@zg.t-com.hr, rvrhovac@mef.hr

S početkom 2013. godine, u sklopu opservacijske studije CELG AML-1 pod okriljem CELG-a (engl. Central and Eastern Leukemia Group), započeo je s radom registar pacijenata s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML). U više navrata je na sastancima KROHEM-a prezentiran protokol studije kojemu

se može pristupiti preko zaštićenog dijela mrežnih stranica KROHEM-a. Registrar se koristi kao osnova za prikupljanje podataka za CELG AML-1 studiju, a u njega se upisuju svi pacijenti stariji od 18 godina dijagnosticirani s AML-om počevši od 1. siječnja 2013. godine, karakteristike pacijenta i bolesti, tijek i modaliteti, te ishod liječenja. AML registrar je postavljen na zaštićeni server KROHEM-a, te mu se pristupa preko Internet stranice KROHEM-a (<http://www.krohem.hr>, Slika 1.). Za pristup AML Registraru potrebno je imati korisničko ime i lozinku koja je dodijeljena korisnicima u svim centrima koji



Slika 1. Poveznica i sučelje za pristup CELG AML-1 Registru.

sudjeluju u dijagnosticiranju i liječenju bolesnika s AML-om u zemljama članicama CELG-a. Princip dodjeljivanja pristupa Registrusu temelji se na vertikalnom ustrojstvu ovlaštenja za pristup podacima u registru (Slika 2.). Tehničku potporu za rad Registrusa osigurava KROHEM preko svoje informatičke službe koju čine Miroslav Dadić, dipl.ing. i Robert Kufner bacc.ing. Prikupljanjem podataka u Registrusu, osim za potrebe studije, dobit će se i vrijedni epidemiološki podaci o bolesnicima s AML-om u Republici Hrvatskoj.

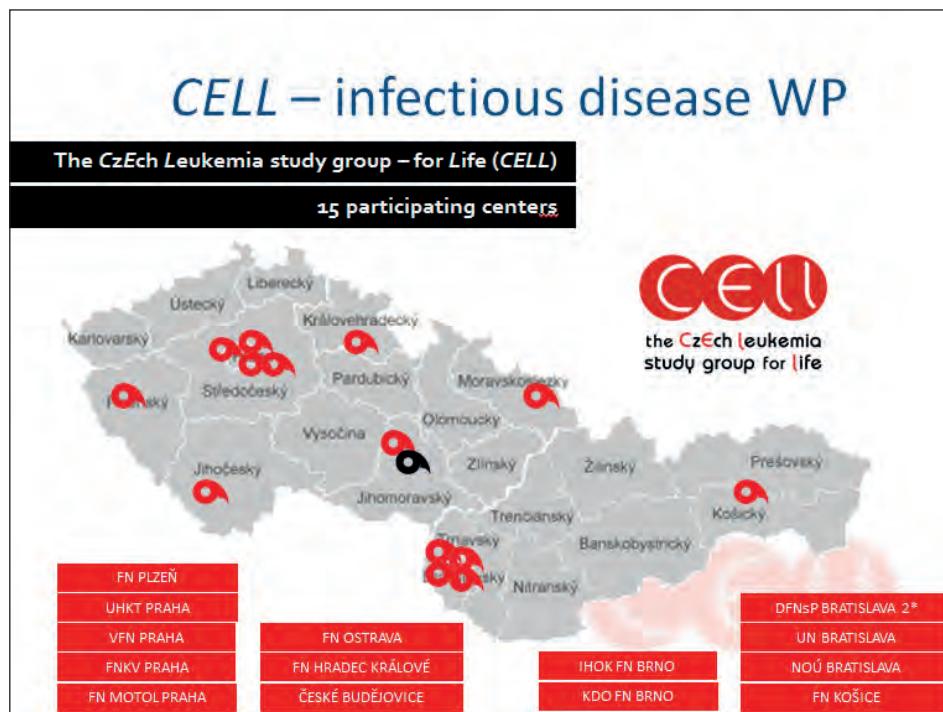
Uz CELG AML-1 Registrar, s početkom ove godine, uz prethodno pribavljene dopusnice od strane bolničkih etičkih povjerenstava, Registrusu za invazivne mikoze – invazivne aspergiloze (FIND-IA, engl. Fungal InfectioN Database – Invasive Aspergillosis) pridružili su se Zavodi za hematologi-



Slika 2. Razine ovlasti korisnika u CELG-AML1 Registru.

ju KBC Zagreb i KB Merkur. Riječ je o Registru koji je osnovan od strane Radne skupine za zarazne bolesti Češke grupe za istraživanje leukemije – Za život (CELL, engl. CzEch Leukemia study group – for Life, <http://www.leukemia-cell.org>). Registrar objedinjava sve oboljele od zločudnih hematoloških bolesti kod kojih je postavljena dijagnoza invazivne

aspergiloze (IA) prema revidiranim EORTC/MSG kriterijima iz 2008. godine (1). Koordinator FIND-IA registra je prof.dr.sc. Zdeněk Ráčil sa Sveučilišta Masaryk i Sveučilišne bolnice Brno. Trenutno FIND registrar objedinjava 17 centara: 15 iz Češke i Slovačke (Slika 3.), te, za sada, KBC Zagreb i KB Merkur iz Hrvatske. Projekt pridruživanja hrvatskih



Slika 3. FIND Registrar: Centri iz Češke i Slovačke (ljubaznošću prof. Z. Ráčila).

centara FIND registru, kolokvijalno nazvan kao FIND-HR, odvija se pod okriljem Radne skupine za potpornu terapiju KROHEM-a. Upisivanje podataka u FIND registar odvija se na način da se jednom ili dva puta godišnje, prema obavijesti administratora FIND registra, upisuju retrospektivno podaci o bolesnicima s IA iz prethodne godine. Trenutno je u tijeku upisivanje bolesnika iz 2012. godine, u čemu sudjeluju i naša dva navedena centra, a podaci o upisanim bolesnicima bit će prezentirani na jednom od idućih KROHEM-ovih sastanaka. Budući da se radi o bazi podataka koja je do sada dala vrijedne rezultate o epidemiologiji invazivne aspergiloze (2), koji između ostalog omogućuju i donošenje smjernica za prevenciju i liječenje invazivne aspergiloze na temelju objektivnih, lokalnih podataka, svi centri u kojima se izvode osnovne dijagnostičke pretrage za postavljanje dijagnoze IA, uključujući i Galactomannan test, pozvani su uključiti se u projekt u svrhu znanstvenog i stručnog napretka na ovom području, a na korist oboljelih od IA.

Literatura:

1. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008;46(12):1813-1821.
2. Racil Z, Weinbergerova B, Kocmanova I, et al. Invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies in the Czech and Slovak republics: Fungal InfectioN Database (FIND) analysis, 2005-2009. Int J Infect Dis. 2013;17(2):e101-109.

Prominentne nuklearne invaginacije u akutnim mijeloičnim leukemijama s *FLT3-ITD* mutacijom

Sunčica Ries¹, Koraljka Gjadrov Kuveždić¹,

Renata Zadro²

¹ Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb

² Laboratorij za molekularnu hematologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Sunčica Ries, dr. med.

Klinički zavod za patologiju i citologiju

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: sun77ries@yahoo.com

Uvod

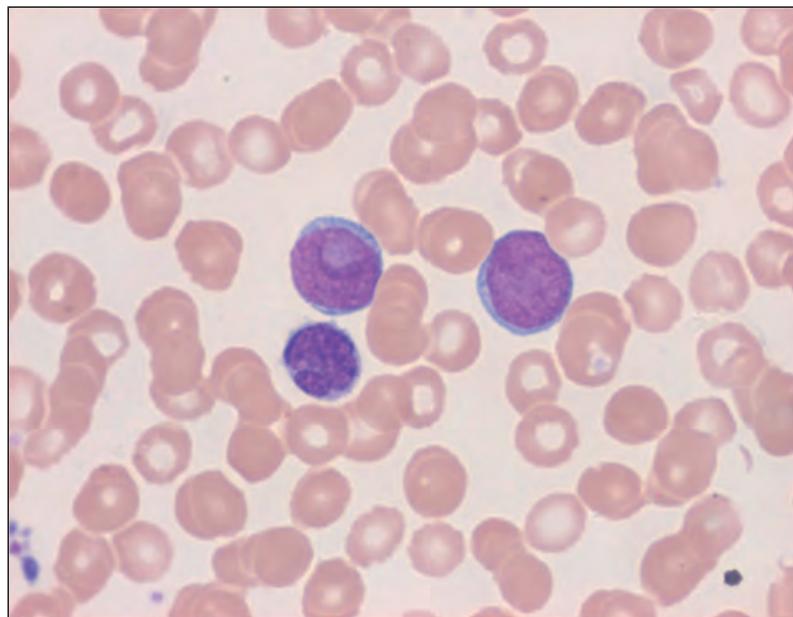
Akutne mijeloične leukemije (AML) su heterogena skupina bolesti koja se razlikuje po citomorfološkim, imunofenotipskim, molekularnim karakteristikama i kliničkom tijeku bolesti. Razvojem citogenetičkih i molekularnih tehnika poboljšalo se razumijevanje biologije AML-a, stoga je Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) uvela multidisciplinaran pristup dijagnozi i podjeli akutnih leukemija (1). Kod pojedinih podtipova AML-a postoje dijagnostičke teškoće u postavljanju citomorfološke dijagnoze, dok akutna promijelocitna leukemija i akutna mijeloična leukemija s abnormalnim eozinofilima imaju karakterističnu morfologiju koja se povezuje sa citogenetičkim promjenama, poput t(15;17), inv (16) ili t(16;16) (2). AML s prominentnim nuklearnim invaginacijama nije prepoznata u podjeli prema SZO kao poseban entitet iako ima

karakterističnu morfologiju tzv. "cup-like" blasta koji se u literaturi povezuju s *FLT3-ITD* mutacijom i *NPM1* mutacijom (3,4). Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno nakupljanje citoplazmatskih organela što objašnjava "cup-like" morfologiju (5). Dio radova povezuje pojavu mutacije *FLT3-ITD* s lošom prognozom u bolesnika s AML (6,7). *FLT3-ITD* mutacija se nalazi u oko 40% bolesnika s *NPM1* mutacijom. Dobrim prognostičkim pokazateljem kod bolesnika s AML-om pokazalo se prisustvo *NPM1* mutacije bez *FLT3-ITD* mutacije (8).

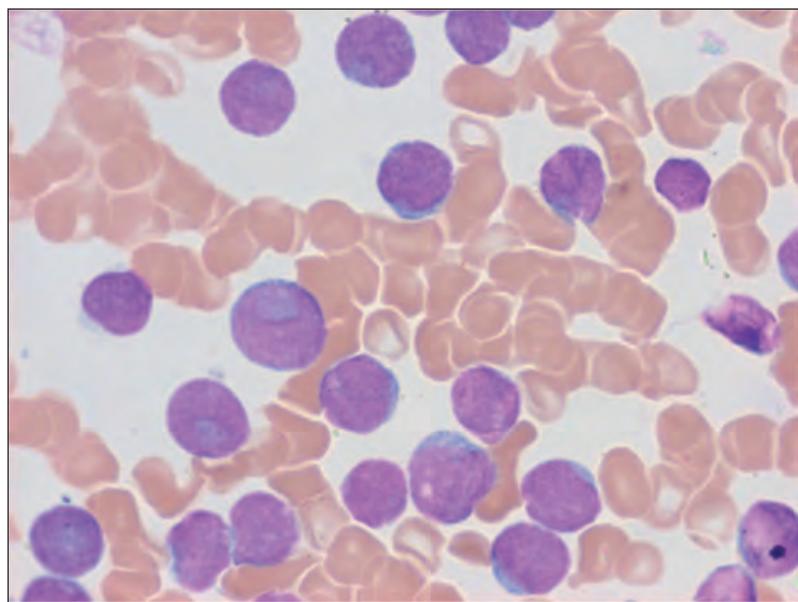
Cilj istraživanja bio je utvrditi prisustvo "cup-like" blasta kod bolesnika s akutnim mijeloičnim leukemija koje nisu drugačije klasificirane te povezati morfološke promjene s rezultatima molekularne analize *FLT3-ITD* mutacije na uzorcima koštane srži istih bolesnika.

Bolesnici i metode

U istraživanje je uključeno 37 bolesnika s dijagnozom novootkrivene AML u periodu od 2010. do 2012. kod kojih je analizirana *FLT3-ITD* mutacija. Cito-morfološka analiza blasta u koštanoj srži i perifernoj krvi učinjena je na razmazima bojenim standardnim May-Grünwald-Giemsa bojenjem i citokemijskom reakcijom mijeloperoksidaze. Kriteriji za prepoznavanje "cup-like" blasta su bili >10% blasta s najmanje 1 prominentnom jezgrinom invaginacijom koja obuhvaća >25% jezgrinog promjera (Slika 1. i 2.).



Slika 1. Blasti s prominentnim nuklearnim invaginacijama (May-Grünwald-Giemsa, x1000).



Slika 2. Blasti s prominentnim nuklearnim invaginacijama (May-Grünwald-Giemsa, x1000).

Molekularne analize izvedene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Laboratoriju za molekularnu hematologiju, KBC Zagreb. RNA izolirana iz aspirata koštane srži prilikom dijagnoze prepisana je u cDNA, a *FLT3-ITD* analizirana je kvalitativnim RT-PCR-om na GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, SAD) prema Nakao i sur. Leukemia 1996;10:1911-8. (9).

Rezultati

FLT3-ITD mutacija je dokazana kod 9 od 37 bolesnika s novootkrivenom AML. Blasti s prominentnim nuklearnim invaginacijama su bili prisutni u koštanoj srži i perifernoj krvi 7 bolesnika. 6 od 7 bolesnika sa "cup-like" blastima imalo je dokazanu *FLT3-ITD* mutaciju (Tablica 1.).

	<i>FLT3-ITD</i> poz.	<i>FLT3-ITD</i> neg.	ukupno
"cup-like" poz.	6	1	7
"cup-like" neg.	3	27	30
ukupno	9	28	37

Tablica 1. Prikaz prisustva "cup-like" kod bolesnika s dokazanom *FLT3-ITD* mutacijom.

Blaste s prominentnim nuklearnim invaginacijama imali su uglavnom bolesnici s AML-om bez sazrijevanja i AML-om sa sazrijevanjem (Tablica 2.).

podtipovi AML (NOS)	"cup-like" poz.	"cup-like" neg.	ukupno
AML s minimalnom diferencijacijom	0	1	1
AML bez sazrijevanja	2	1	3
AML sa sazrijevanjem	4	13	17
Akutna mijelomonocitna leukemija	1	7	8
Akutna monoblastična i monocitna leukemija	0	7	7
Akutna eritroleukemija	0	1	1
Ukupno	7	30	37

Tablica 2. Prikaz prisustva "cup-like" blasta u pojedinim podtipovima AML-a.

Zaključak

Prema dosadašnjim studijama 40% do 49% bolesnika s novootkrivenom AML ima normalan nalaz citogenetike (8). AML s urednim citogenetičkim nalazom pripadaju grupi akutnih leukemija intermedijalnog rizika i kod njih se često nalazi *FLT3*-ITD mutacija. Kako je ta mutacija važan prognostički čimbenik za pacijente s AML-om i ima utjecaja na daljnje liječenje smatramo da je svaka citomorfološka promjena koja se može povezati s *FLT3*-ITD mutacijom važan podatak za kliničara. Rad McCormicka i suradnika pokazao je da se *FLT3* mutacijski status može razlikovati kod postavljanja dijagnoze i u relapsu bolesti, kao i prisustvo "cup-like" blasta (10). U našem istraživanju citomorfološki smo dokazali prisustvo prominentnih nuklearnih invaginacija tzv. "cup-like" blasta u koštanoj srži i perifernoj krvi naših bolesnika. Blasti s "cup-like" morfologijom češći su u AML bez sazrijevanja i u AML sa sazrijevanjem. U ovom istraživanju je 6/9 bolesnika s *FLT3*-ITD mutacijom imalo "cup-like" blaste kod postavljanja dijagnoze. AML s "cup-like" blastima predstavljaju rijedak ali karakterističan morfološki podtip koji se može koristiti za usmjeravanje prema specifičnim molekularnim analizama. Smatramo da je citomorfološko prepoznavanje prominentnih nuklearnih invaginacija koje se pojavljuju u bolesnika s relapsom AML-a a nisu bile prisutne kod postavljanja dijagnoze važan podatak za kliničara i planiranje dalnjeg liječenja.

Literatura:

- Arber DA, Brunning RD, Le Beau MM, Falini B, Vardiman JW, Porwit A, i sur. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ured. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2008. str. 110-23.
- Clotel T, Renneville A, Venot M, Gardin C, Kelaidi C, Leroux G, i sur. Slow relapse in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16). *Haematologica* 2009;94(10):1466-7.
- Chen W, Rassidakis GZ, Li J, Routbort M, Jones D, Kantarjian H, i sur. High frequency of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia with prominent nuclear invaginations ("cup-like" nuclei). *Blood* 2006;108:1783-4.
- Chen W, Konoplev S, Medeiros LJ, Koeppen H, Leventaki V, i sur. Cuplike nuclei (prominent nuclear invaginations) in acute myeloid leukemia are highly associated with *FLT3* internal tandem duplication and NPM1 mutation. *Cancer* 2009;115:5481-9.
- Kroschinsky FP, Schäkel U, Fischer R, Mohr B, Oelschlaegel U, i sur. Cup-like acute myeloid leukemia: new disease or artificial phenomenon? *Haematologica* 2008;93:283-286.
- Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer S, Belton AA, i sur. The presence of a *FLT3* internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML10 and 12 trials. *Blood* 2001;98:1752-9.
- Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, i sur. The impact of *FLT3* internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:2776-84.
- Mrózek K, Marcucci G, P, Whitman SP, CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007;109:431-448.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horike S, Kashima K, i sur. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1996;10:1911-8.
- McCormick SR, McCormick MJ, Grutkoski PS, Ducker GS, Banerji N, i sur. *FLT3* Mutations at Diagnosis and Relapse in Acute Myeloid Leukemia: Cytogenetic and Pathologic Correlations, Including Cuplike Blast Morphology. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:1143-1151.

Predstavljanje Radne skupine za sindrom mijelodisplazije

Dr. sc. Njetočka Gredelj Šimec, dr. med.¹,
Prof. dr. sc. Slobodanka Ostojić-Kolonić, dr. med.^{1,2}
¹ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
 KB Merkur, Zagreb
² Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
 E-pošta: njetocka.gredelj@zg.t-com.hr, ostojic@net.hr

Nakon što je na sastanku u Puli u studenom 2011. godine, na inicijativu profesora Jakšića te uz potporu ostalih članova KROHEM-a formirana Radna skupina za sindrom mijelodisplazije (MDS), sredinom 2012. godine je za voditeljicu Skupine predložena prof. dr. sc. Ostojić-Kolonić. Na sastanku KROHEM-a u Biogradu u studenom 2012. godine, Radna skupina je predstavila planove budućih aktivnosti i pozvala sve zainteresirane članove KROHEM-a da se pridruže radu Skupine. Uz planirane aktivnosti Radna skupina je prikazala i vremenske rokove u kojima planira završetak pojedinih aktivnosti.

Na temelju podataka iz Registra tumora krvo-tvornog sustava u Hrvatskoj iz 2011. godine, objavljenog u Biltenu Krohema, iz studenog 2012. godine, incidencija MDS-a u Hrvatskoj je 1,74/100.000, odnosno 73 novo dijagnosticirana bolesnika godišnje. Ovaj rezultat je znatno niži od očekivanog, jer se prema literaturnim podacima incidencija MDS-a kreće između 4 i 12/100.000 stanovnika, što bi značilo da bi se broj novodijagnosticiranih bolesnika u Hrvatskoj trebao kretati između 180 i 540 godišnje. Stoga ne čudi da je jedna od prvih zadaća Radne skupine definiranje obrasca za MDS u Registru KROHEM-a i započinjanje s unosom podataka što prije bude moguće. Osim odgovora na pitanje o incidenciji MDS-a u Hrvatskoj, od KROHEM-ovog registra MDS-a očekuju se odgovori i na druga brojna pitanja kao što su: kako u našim uvjetima liječimo MDS, kako se borimo s preopterećenjem željezom, kolika je incidencija i interval prijelaza MDS-a u AML, koliko smo pacijenata transplantirali, koliko smo pacijenata liječili s novim lijekovima i koliko smo bili u svemu tome uspješni. Za dobivanje odgovora na ova pitanja neophodno je uz unos novodijagnosticiranih pacijenta i ažuriranje podataka o tijeku bolesti i liječenju, za što se planira i stranica Registra predviđena za praćenje bolesnika, koja bi se ispunjavala jednom godišnje. Članovi Radne skupine su svjesni činjenice da je unošenje podataka u Registar dodatan napor za članove KROHEM-a i da je stoga neophodno voditi računa o dobroj ravnoteži

između uloženog truda pri unosu podataka i upotrebljivosti unešenih podataka. Potrebno je istaknuti da bi podaci dobiveni iz Registra trebali omogućiti donošenje zaključaka na temelju kojih će se moći stvarati nove strategije dijagnostike i terapije MDS-a u našim uvjetima i poboljšati organizacija rada. Jednako tako dobiveni podaci bi trebali poslužiti i za buduće stručne radove.

Uz formiranje KROHEM-ovog Registra za MDS, Radna skupina je već počela s aktivnostima oko uključenja u prospektivni, multicentrični EU-MDS Registry u kojem već sudjeluje 117 centara iz 14 zemalja s ukupno oko 1200 bolesnika s MDS-om niskog i srednjeg rizika (IPSS low and intermediate-1). Primarni cilj Registra je prikupiti demografske podatke o liječenju novodijagnosticiranih bolesnika. Sekundarni ciljevi su istražiti korelaciju između kliničkih karakteristika (uključujući WHO klasifikaciju i prognostičke parametre) i sekundarne hemokromatoze, odnosno terapijskog pristupa s jedne strane i petogodišnjeg preživljjenja, vremena do progresije i performansa statusa s druge strane. Drugi sekundarni cilj je prikupljanje podataka o sigurnosti liječenja kelatorima željeza.

Sljedeća važna aktivnost je izrada dijagnostičkog postupnika i smjernice za liječenje MDS-a.

U dijagnostički postupnik se planira uvrstiti i protočna citometrija koja je sve važnija dijagnostička metoda, naročito pri postavljanju dijagnoze MDS-a niskog rizika. Prednost protočne citometrije je u činjenici da ima visoku specifičnost (95%) i senzitivnost od 75%, uz mogućnost otkrivanja promjena na stanicama granulocitnog i monocitnog reda, koje često nemaju jasnu morfološku sliku te su teže uočljive morfološkim metodama (citologiji i patologiji). Važnost protočne citometrije pri dijagnozi i praćenju MDS-a vidljiva je i iz činjenice o postojanju etabliranog MDS Flow Cytometry scor (FCSS). S obzirom na to da se u Hrvatskoj za sad rutinski ne koristi protočna citometrija pri postavljanju dijagnoze i određivanju stupnja rizika MDS-a, planira se definiranje paleta markera za MDS te stjecanje iskustava s ovom metodom kako bi se ona u budućnosti mogla uvesti u dijagnostički algoritam.

Uz uvođenje novih dijagnostičkih metoda Radna skupina planira i predstavljanje novih terapijskih mogućnosti. Za sada Hrvatska značajno zaostaje u terapijskim mogućnostima, prvenstveno zbog nedostupnosti novih lijekova. U studenom 2011. godine u Hrvatskoj je registriran azacitidin. Kako lijek nije

na listi HZZO-a zbog visokih troškova liječenja trenutno se s azacitidinom liječi svega nekoliko bolesnika, od kojih većina prima lijek doniran od strane tvrtke Celgene. Radi se o lijeku s kojim se u Europi i SAD-u liječi veliki broj bolesnika visokog rizika (10-20%) i koji je pokazao dobar terapijski učinak u smislu značajnog produženje preživljjenja (nakon 2 godine 26% vrs 51%) i značajno smanjenje ovisnosti o transfuzijama. Osim navedenog, azacitidin se sve više primjenjuje u liječenju starijih bolesnika s AML-om. Iz navedenog je jasno da se željno iščeškuje njegovo uvrštenje na listu HZZO-a. Jednako su skromne naše mogućnosti, pa stoga i naša iskustva u liječenju bolesnika s 5q- sindromom lenalidomodom čija se registracija u Europskoj uniji očekuje tijekom 2013. godine, te s decitinibom koji također

ima jasno definirano mjesto u tretmanu bolesnika s MDS-om.

Vezano uz potporno liječenje, na temelju rezulta-ta recentnih studija, Radna skupina je kao jedan od zadatka definirala i reviziju postojećih smjernica KROHEM-a o praćenju i liječenju preopterećenja željezom kod bolesnika s MDS-om.

Na kraju, ali ne najmanje važno, Radna skupina je predložila provođenje Presječne studije - MDS Hrvatska, prema modelu Francuske presječne studije objavljene u Haematologica, 2010. godine. Uz ovu Studiju Radna skupina planira i druge znanstvene aktivnosti te je već dogovorila suradnju s profesorom Joachimom Deegom jednim od vodećih svjetskih stručnjaka u području MDS-a.

Presječna studija - MDS Hrvatska

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

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
KB Merkur, Zagreb
E-pošta: njetocka.gredelj@zg.t-com.hr

Presječna studija - MDS Hrvatska zamišljena je kao studija KROHEM-a, organizirana i vođena od strane članova Radne skupine za sindrom mijelo-displazije (MDS). Članovi Radne skupine za MDS bi na svojim sastancima dogovorili detalje i rokove vezane za provođenje studije, kao i podjelu radnih zadataka. Po završetku studije članovi Radne skupine bi se dogovorili o eventualnom objavlјivanju rada s rezultatima dobivenim studijom kao i o autorima rada. Svi članovi KROHEM-a bi na sastancima KROHEM-a bili informirani o podacima prikupljenim ovom studijom kao i o donesenim zaključcima.

Studija bi obuhvatila sve bolesnike koji su pregledani ili liječeni zbog MDS-a u hematološkim ambulantama, dnevnim bolnicama ili na bolničkim odjelima u periodu od mjesec dana. Predloženi period provođenje studije je rujan 2013. godine. Studijom bi se prikupili podaci o dobi i spolu bolesnika, o karakteristikama bolesti kod dijagnoze i u trenutku pregleda te podaci o trenutnom načinu liječenju i o načinima liječenja unazad 6 mjeseci. Liječnici uključeni u studiju bi u pisanom obliku dobili obrazac za unos podataka. Zbog pojednostavlјivanja unosa podataka liječnici uključeni u studiju bi trebali ispuniti obrazac u pisanom obliku te ga dostaviti do određenog roka voditeljima studije koji bi podatke unosili u elektronski oblik za računalnu obradu. Uz obrazac

za unos podataka liječnici koji bi sudjelovali u studiji bi dobili i obrazac za informirani pristanak.

Očekuje se da će se iz podataka prikupljenih na ovoj skupini bolesnika kao i na temelju njihove estrapolacije moći procijeniti epidemiologija MDS-a u Hrvatskoj kao i karakteristike bolesti na populaciji naših pacijenata. Zatim bi se dobio uvid u opseg dijagnostičke obrade koja se pri svakodnevnom radu koristi kod postavljanja dijagnoze MDS-a, kao i u dostupnost, u našim uvjetima, posebnih dijagnostičkih metoda kao što je kariogram. Jednako tako bi nam prikupljeni podaci mogli pokazati koji su kriteriji za potporno liječenje kod naših pacijenata, koliko su oni ujednačeni i kod kojeg se broja bolesnika provodi specifično i differentno liječenje te kakva je njegova dostupnost. Svi dobiveni podaci bili bi usporedivi s podacima dobivenim iz sličnih studija, odnosno s poznatim karakteristikama i suvremenim načinima dijagnosticiranja i liječenja MDS-a. S obzirom da se radi o presječnoj studiji, što znači da joj je cilj prikupiti podatke o svim pacijentima koji su pregledani ili liječeni zbog MDS-a u određenom vremenu (ovdje jedan mjesec) na određenom teritoriju (Republika Hrvatska), za njeno uspješno provođenje neophodno je sudjelovanje svih velikih i svih malih hematoloških centara u Hrvatskoj.

Podaci prikupljeni tijekom provođenja studije obuhvaćali bi podatke potrebne za EU MDS Registry, kao i podatke potrebne za Registrar MDS-a, što bi smanjilo dodatni angažman kod pokretanja unosa podataka u ova dva registra.

Sindrom mijelodisplazije i analiza genskog ekspresijskog profila

Dr. sc. Marko Martinović, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
KB Merkur, Zagreb
E-pošta: martinovi.marko@gmail.com

I Sindrom mijelodisplazije

1. Definicija

Sindrom mijelodisplazije (MDS) obuhvaća heterogenu skupinu klonalnih zločudnih tumora krvo-tvornog sustava sa zajedničkim obilježjem hiper-cellularne i displasične koštane srži sa nedjelotvorom hematopoezom i posljedičnom citopenijom u perifernoj krvi, te rizikom transformacije u akutnu leukemiju (1,2). Kriterij za citopeniju u MDS-u je hemoglobin niži od 100 g/L, apsolutni broj neutrofila niži od $1,8 \times 10^9/L$ i broj trombocita niži od $100 \times 10^9/L$. Displazija može biti udružena s povišenom razinom mijeloblasta u perifernoj krvi i koštanoj srži. Mijeloblasta u oba tjelesna prostora može biti do 20%, a ukoliko ih je više od toga bolest se proglašava akutnom mijeloičnom leukemijom. Ovi tumori mogu nastati bez jasnog uzroka (primarni ili *de novo* MDS) ili kao posljedica ranije izloženosti iradijaciji odnosno kemoterapiji (eng. *treatment induced*, t-MDS). Mogući uzroci primarnog MDS-a su izloženost benzenu iznad dopuštenih granica, pušenje, izloženost kemikalijama koje se koriste u poljoprivredi, kao i pozitivna obiteljska anamneza na tumore hematopoetskog sustava

2. Incidencija

Točna incidencija *de novo* MDS-a u SAD-u nije poznata. Računa se da je 10.000 novodijagnosticiranih godišnje u SAD-u, što nadilazi incidenciju akutne mijeloične leukemije (AML) u populaciji starijoj od 65 godina (3). Rizik oboljevanja od MDS-a raste s dobi. Pokazano je da je incidencija na 100.000 ljudi godišnje 0,5 kod mlađih od 50 godina, 5,3 kod onih između 50 i 59, 15 kod onih između 60 i 69, 49 kod onih između 70 i 79; i 89 kod onih starijih od 80 godina (4). Također, muškarci nešto češće obolijevaju (5).

3. Dijagnoza sindroma mijelodisplazije

Sumnja na MDS se postavlja kod svih bolesnika, a pogotovo kod starijih od 60 godina, ukoliko je prisutna nerazjašnjena citopenija jedne ili više mijeloidnih loza (6). Uobičajena je citološka obrada razmaza periferne krvi i aspirata te po potrebi bioptata koštane srži kojom se nalaze displastične promjene jedne ili više hematopoetskih loza (7, 8). Displazija se definira ovisno o krvnoj lozi. Diseritropoezu primarno označavaju promjene jezgre kao što su pupanje (eng. *budding*), više jezgara, megloblastoidne promjene, destruktivna fragmentacija (lat. *karyorrhexis*), dok su promjene citoplazme u vidu prstenastih sideroblasta, vakuolizacije i pozitiviteta na bojenje PAS-om. Disgranulopoeza se očituje primarno hipolobuliranošću jezgre (pseudo Pelger – Huet anomalija) i hipersegmentacijom jezgre, nadalje malim ili neubičajeno velikim jezgrama, smanjenim brojem ili čak izostankom granula, te Auerovim štapićima. Dismegakariocitopoeza se očituje mikromegakariocitima, hipolobuliranim jezgrama i multiplim, međusobno razdvojenim jezgrama (2). Ovi citološki nalazi sami po sebi nisu dostatni za dijagnozu MDS-a, stoga moguća predisponirajuća stanja moraju biti isključena. Među njih spadaju alkoholizam, slaba prehrana, nedostatak vitamina B12 i folne kiseline, infekcije (npr. HIV-om), utjecaj lijekova (npr. valproata), izlaganje toksičnim kemikalijama, ranije provedene kemoterapije i radioterapije. Dodatna obrada uključuje imunofenotipizaciju stanica periferne krvi i koštane srži (9), biopsiju koštane srži (8), imunohistokemijsku (10) i citogenetsku analizu (11). U bioptatima koštane srži bolesnika s MDS-om se mogu naći displastične promjene stanica hematopoeze, fibroza (retikulinskim vlaknima), infiltracija limfocitima (čak i prisustvo limfnih čvorova) (8, 12). Novije metode koje doprinose dijagnostici MDS-a, a koje su još uvijek i eksperimentalne su analiza genske ekspresije (eng. *gene expression profiling*) (13) i analiza polimorfizma pojedinog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism analysis*) (14).

4. Podjela sindroma mijelodisplazije

bolest	nalazi u perifernoj krvi	nalazi u koštanoj srži
refraktorna citopenija s displazijom 1 krvotvorne loze	<1% blasta	≥10% displastičnih stanica u zahvaćenoj lozi, <5% blasta, <15% prstenastih sideroblasta
refraktorna anemija s prstenastim sideroblastima	anemija, nema blasta	≥15% prstenastih sideroblasta, samo eritridna displazija, <5% blasta
refraktorna citopenija s displazijom više loza	citopenija 1 ili više loza, <1% blasta	displazija ≥10% stanica u ≥2 loze, <5% blasta
refraktorna anemija sa suviškom blasta - 1	citopenija 1 ili više loza, <5% blasta	displazija 1 ili više loza 5-9% blasta
refraktorna anemija sa suviškom blasta - 2	citopenija 1 ili više loza, 5-19% blasta	displazija 1 ili više loza 10-19% blasta
neklasificirani MDS	citopenija 1 ili više loza, ≤1% blasta	displazija ≤ 10% stanica u ≤ 3 loze, <5% blasta
MDS s izoliranom delecijom 5q	anemija, = ili ↑ trombocita, <1% blasta	= ili ↑ displastičnih megakariocita, <5% blasta, izolirana delecija 5q

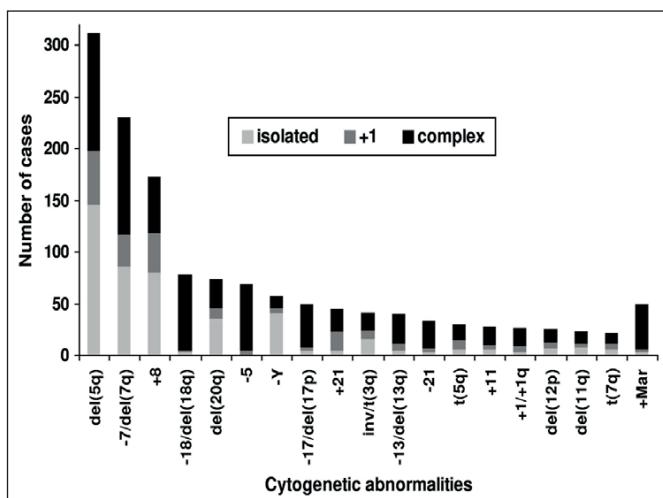
Prema: Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW, Hellstrom – Lindberg E. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (ed.) WHO Classification of Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. International Agency for Research on Cancer, 2008.

5. Prognostički čimbenici

Većina oboljelih od sindroma mijelodisplazije umire od posljedica neučinkovite koštane srži, manji dio (oko 30%) od transformacije u akutnu mijeloičnu leukemiju. Konične citopenije dovode do izloženosti bolesnika simptomatskoj anemiji i svim njenim posljedicama (prvenstveno posljedicama na kardiovaskularni sustav s obzirom da se radi najčešće o starijim dobnim skupinama), neutropeniji i posljedičnoj sklonosti infektivnim bolestima, te trombocitopeniji i sklonosti krvarenjima. Kako se može i očekivati s obzirom na heterogene citološke manifestacije unutar ovog sindroma, kod oboljelih je izražena različitost težine bolesti u rasponu od indolentne bolesti koja ne utječe značajno na trajanje života do progresije u akutnu mijeloičnu leukemiju koja dovodi do smrti bolesnika kroz nekoliko mjeseci. Na osnovi citogenetskih analiza razvijani su višestruki prognostički modeli. Najrašireniji u upotrebi je Međunarodni prognostički sustav (eng. *International Prognostic Scoring System, IPSS*) koji je zasnovan na broju loza zahvaćenih citopenijom, postotku blasta u koštanoj srži, te na citogenetskoj analizi koštane srži (15).

bodovi prognostička varijabla	0	0.5	1.0	1.5	2.0
blasti u koštanoj srži (%)	<5	5-10	-	11-20	21-30
kariotip	dobar	srednji	loš	-	-
citopenije	0/1	2/3	-	-	-

Kariotip se ocjenjuje dobrim ako je: normalan, izolirana (bez prisustva drugih kromosomskih abnormalnosti) monosomija Y kromosoma koja se označava –Y, izolirana delecija dugog kraka 5. kromosoma koja se označava del(5q), izolirana delecija dugog kraka 20. kromosoma koja se označava del(20q). Kariotip koji je povezan s lošom prognozom jest onaj koji ima kompleksne (≥ 3 abnormalnosti) ili anomalije kromosoma 7. Kariotip povezan sa srednje teškom prognozom je u slučaju ostalih abnormalnosti. Bolesnici niskog rizika progresije u AML su oni sa zbrojem bodova 0, srednjeg rizika progresije su oni sa zbrojem bodova 0,5-1 (skupina 1) i 1,5-2,0 (skupina 2), dok su visokog rizika oni sa zbrojem bodova višim od 2,5. Međutim, ovaj prognostički sustav ima nekoliko ograničenja: uključuje ograničen broj citogenetskih poremećaja koji je značajno manji od ukupno 17 rekurentnih kariotipskih abnormalnosti nađenih u bolesnika s ovim sindromom (16), ne vrednuje težinu citopenije pojedine krvne loze odnosno ovisnost o transfuzijama derivata krvi te ne uključuje procjenu izražaja fibroze u koštanoj srži. Osim toga, skoro polovica oboljelih od ovog sindroma ima normalne nalaze citogenetike (17). S druge strane fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je ograničena na otkrivanje poznatih genskih promjena, te nije prikladna metoda s obzirom na širok spektar genskih promjena koji različitih fenotipova ovog sindroma. Stoga se pored konvencionalne metafazne citogenetike, za određivanje prognoze pojedinog bolesnika koriste i nove tehnologije kao što je istraživanje genske ekspresije, kojom se nalaze promjene i kod bolesnika normalnih nalaza citogenetike.



Prema: Hasse D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. Ann Hematol. 2008;87:515-526.

II Genska ekspresija

1. Značenje genske ekspresije

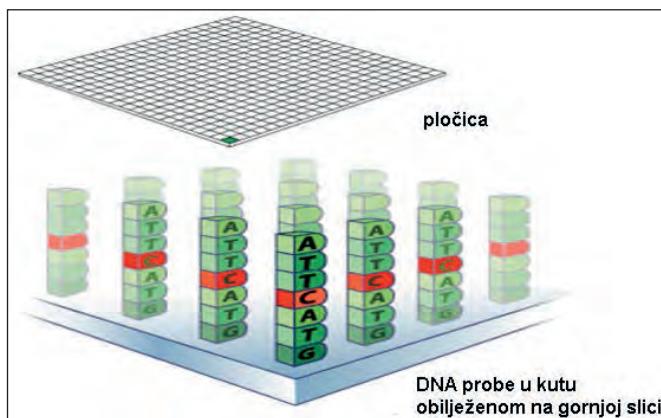
Centralna dogma biologije kazuje da po kalupu DNA dolazi do transkripcije genske informacije u RNA, te potom translacija RNA u određeni redoslijed aminokiselina koje čine protein. Genska ekspresija je proces pretvorbe informacije pohranjene u genima na razini DNA, u funkcionalne proteine. Stanice se prilagođavaju različitim životnim uvjetima regulacijom genske ekspresije na način da povećaju ili smanje proizvodnju određenih proteina. Iako sve tjelesne stanice imaju istu DNA, svega 3 do 5% gena je aktivno u pojedinoj stanici. Glasnička RNA (eng. *messenger, mRNA*) - RNA koja se translatira u protein čini svega oko 1% ukupne stanične RNA. Nakon transkripcije mRNA se transportira iz stanične jezgre u citoplazmu, gdje dolazi do translacije na ribosomima i zatim njenog razgrađivanja u vremenu koje varira od minuta do sati. Cijeli proces genske ekspresije od transkripcije do razgradnje mRNA u citoplazmi određen je interakcijom signala iz okoliša stanice s informacijama pohranjenim u genomu. Genska ekspresija može biti poremećena na svim razinama regulacije – od mutacija regulacijskih sklopova, pregradnje i metilacije DNA preko poremećaja faktora transkripcije do signalnih molekula. Kako je mRNA spona između DNA i proteina, promjene molekula mRNA odraz su aktivacije odnosno inhibicije gena, tako da analiza na razini mRNA može dati uvid u gensku ekspresiju pod različitim fiziološkim i patološkim okolnostima.

2. Genska ekspresija i tumori

Nastanak i razvoj tumora je u pravilu postupan proces, koji se odvija kroz više godina. Započinje načešće mutacijom koja dovodi do inaktivacije gena koji suprimiraju tumorski fenotip (geni tumorski supresori) ili aktivacije gena koji potiču tumorski fenotip (onkogeni). Promjene u strukturi kromosoma (translokacije, inverzije, delekcije) koje dovode do nastanka fuzijskih gena ili neregulirane ekspresije gena, promjene broja kromosoma (udvostručenjem ili gubitkom kromosoma) koje se očituju podvostručenjem ili gubitkom gena, kao i promjene koji nisu detektibilne analizom kromosoma – točkaste mutacije koje uključuju zamjene, gubitak ili umetanja baza u kodirajuće regije DNA dovode do poremećene funkcije gena uključenih u nastanak i razvoj tumora. Stoga ne iznenađuje da su tumori heterogena skupina bolesti čija je geneza i progresija posredovana promjenjenom funkcijom gena koji reguliraju popravak DNA, stabilnost genoma, angiogenezu, proliferaciju, adheziju, apoptozu i invazivnost stanica u interakciji s tkivnim okruženjem. Značajna varijabilnost je također prisutna i među tumorima koji spadaju u isti specifični histološki entitet. Unatoč tome, do prije nekoliko godina su se prognoze i odluke kliničara o terapiji oboljelih od tumora zasnivale samo na patohistološkoj analizi. Najprije eksperimentalnu, a potom i sve veću kliničku primjenu imaju analize ekspresije gena, koje doprinose i klasifikaciji i određivanju prognoze tumora. Aktivacija različitih signalnih puteva dovodi do promjena ekspresije gena. Ova karakteristika normalnih vrijedi i za tumorske stanice. Kliničarima je poznata pojava varijabilnog odgovora na istovrsnu terapiju tumora istog histološkog tipa u različitim bolesnika, što barem dijelom objašnjava njihova heterogenost na molekularnoj razini odnosno različit unutarstanični "milje". Analiza *Northern blot* je tradicionalna metoda određivanja ekspresije pojedinačnog gena testiranjem RNA. Razvoj metodologije mikročipova (eng. *microarray*) omogućio je da se istovremeno ispituje ekspresija tisuća gena. Ispitivanje genske ekspresije (eng. *gene expression profiling, GEP*) je analiza profila ("otiska") mnoštva gena ispitivane tumorske populacije stanica u određenoj fazi razvoja bolesti, čime se pruža mogućnost uvida u molekularnu razinu tumora pojedinog bolesnika. Molekularna heterogenost pojedinaca s genetskom predispozicijom ne samo da određuje kada će se tumor manifestirati, nego i kako će pojedinac odgovoriti na specifično liječenje tumora. Stoga bi se pomoću određivanja genske ekspresije mogla individualizirati i terapija oboljelih od tumora.

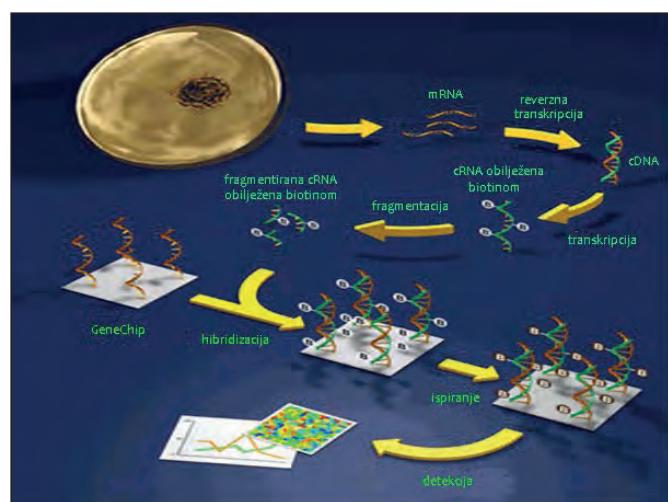
3. Tehnika genske analize

Zajednički pristup svim ispitivanjima genske ekspresije okviru tehnologije mikročipa je prepoznavanje i sparivanje baza komplementarne sekvene nukleinskih kiselina (18). Dvije su glavne metode tehnologije mikročipa. Prva se zasniva na standardiziranim mikroskopskim staklenim pločicama na koje se deponiraju molekule cDNA ili dugi (60-bazni) oligonukleotidi. Druga se naziva i oligonukleotidni mikročip - pločica s tisućama DNA molekula služi za istovremeno ispitivanje fluorescentno obilježenih uzoraka cDNA dobivenih iz mRNA. DNA molekule na pločici nazivaju se probe. Svaka proba je smještena na staklenoj podlozi, ima svoje jedinstvene dvodimenzionalne koordinate i prepoznaje ju samo jedna sekvenca nukleotida uzorka.



Prema: www.public.tgen.org/tgen/Genotypingessentials.pdf

Priprema uzorka počinje izolacijom RNA iz biološkog materijala koji se obrađuje. RNA se potom reverzno prepisuje u cDNA, a zatim se, uz istovremeno obilježavanje biotinom ("molekularnim ljevilom") procesom transkripcije *in vitro* prevodi u obilježenu cRNA (19). Hibridizacijom se vežu obilježene cRNA za komplementarne probe na čipu. Ispiranjem se uklanja nevezani materijal, te se potom hibridizirane molekule detektiraju pomoću fluorescentnih molekula. Jačina dobivenog signala razmjerna je jačini ekspresije određenog gena. Kompjutorskim očitanjem fluorescentnih signala se istovremeno detektira ekspresija tisuća gena.



Prema: www.empiregenomics.com

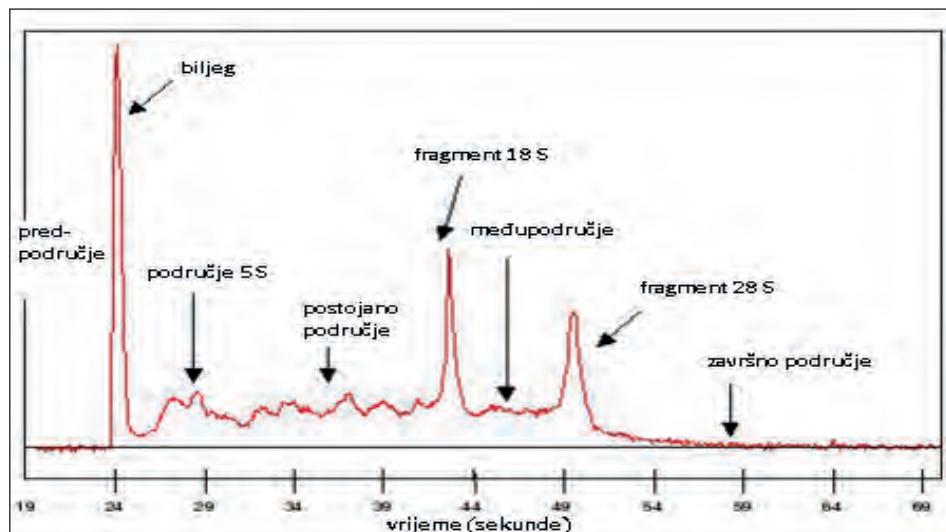
Kao i sve tehnologije, metoda oligonukleotidnog mikročipa također ima svoja ograničenja. Ovisno o tipu proizvoda razlikuju se genske probe, te je stoga otežana mogućnost višestruke provjere rezultata. Nadalje, pojedini kompleti ispituju samo određene gene, a ne ciljano tražene gene. Zbog male veličine (25 baza) oligonukleotida problematičan je omjer signala i pozadinskog signala pri obradi, što daje dodatnu težinu informatičkoj obradi (20). S druge strane, kvaliteta RNA dobivene iz bioloških uzoraka je ključna za krajnji rezultat istraživanja genske ekspresije (21). Na kvalitetu RNA utječe više faktora. Osnovni problem je aktivnost ribonukleaza zbog kojih dolazi do degradacije RNA. Što se tiče uzoraka mRNA dobivenih iz koštane srži, na kvalitetu očekivano utječu gensko naslijede, spol i dob oboljelih, kao i dodatni faktori kao što su način i vremenski termin aspiracije koštane srži, korištenje različitih antikoagulansa (EDTA ili heparin), temperatura pohrane i transporta uzoraka, vrijeme proteklo između uzimanja i obrade uzorka. Moguće je da utjecaj imaju i biološke osobitosti kao što su hipoksija, deplecija nutrijenata ili povećana apoptoza stanica. Osim toga, izolacija monocita centrifugiranjem u Fikolu isključuje granulocite i retikulocite, što umanjuje količinu RNA (22).

4. Mononuklearne stanice i genska analiza

Matične stanice iz koštane srži sadržavaju hematopoetske i nefematopoetske stanice, a sve one imaju potencijal samoobnavljanja i diferencijacije (23). Fikol predstavlja elegantnu metodu za izdvajanje mononuklearnih stanica, koje su najrelevantnije za analizu matičnih stanica tumora koštane srži (22). Po dobivanju RNA iz mononuklearnih stanica, potrebno je provjeriti njenu kvalitetu. Stoga je tvrtka

Agilent Technologies razvila softver koji analizira RNA, određivanjem broja koji označava integritet RNA (eng. *RNA Integrity Number*, RIN). Njime se analizira cjelokupni graf elektroforeze uzorka RNA,

uključujući prisutnost ili odsutnost produkata degradacije RNA. Elektroferogram je grafički prikaz signal dobivenih elektroforetskim razdvajanjem obilježenih fragmenata RNA.



Segmenti elektroferograma (Prema: Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassman M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN. An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. Mol Biol. 2006;7:3.)

Detektori provode analizu 9 segmenta elektroferograma. Zupci mogu imati visok šiljak, no moraju biti uski. Moraju imati određenu (ovisno o segmentu) površinu. Najveći šiljci su smješteni u području pruga koje označavaju 18S i 28S regije ribosomske RNA. Abnormalnosti pojedinih segmenta mogu biti kritične i nekritične s obzirom na njihov utjecaj na ukupni rezultat analize - klasifikaciju integriteta RNA koja se označava kategorijama od 1 (potpuno degradirana RNA) do 10 (intaktna DNA). Osim zasebne analize pojedinog segmenta u izračunavanju ukupnog rezultata sudjeluje i nekoli-

ko parametara koji obuhvaćaju nekoliko segmenta elektroferograma, među kojima su najvažniji su prosječna i maksimalna visina šiljka, odnosi njihovih površina, omjeri površine 28S fragmenta kao i svih koji pripadaju ribosomalnim RNA u odnosu na cjelokupnu površinu elektroferograma (24). Ključno je za RIN algoritam da se radi o interpretaciji koja je automatizirana, čim je isključen subjektivni dojam ispitivača, te se dobija univerzalni, nedvojbeni i reproducibilni nalaz kvalitete RNA. Optimalan nalaz kvalitete RNA izgleda ovako:



Prema: www.gene-quantification.de

Potencijalni problemi u dobijanju RNA optimalne kvalitete su korištenje epruveta bez reagensa za stabilizaciju RNA, involutivne promjene koštane srži s obzirom da je incidencija MDS-a značajno viša u starijih od 70 godina, te izražena apoptoza tumorskih stanica, pogotovo kod oboljelih od niskorizičnih oblika. Također, izolacija mononukleara centrifugiranjem u mediju Fikolu isključuje granulocite i retikulocite, što umanjuje dobivenu količinu RNA.

Literatura:

1. Albitar M, Mansouri T, Shen Y. Myelodysplastic syndrome is not merely „preleukemia“. *Blood*. 2002;100:791.
2. Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW, Hellstrom – Lindberg E. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (ed.) WHO Classification of Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. International Agency for Research on Cancer, 2008.
3. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*. 2007;109:1536.
4. Williamson PJ, Kruger AR, Reynolds PJ. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 1994;87:743.
5. Sekeres MA, Schoonen WM, Kantarjian H, List A, Fryzek J, Paquette R, Maciejewski JP. Characteristics of US patients with myelodysplastic syndromes: results of six cross-sectional physician surveys. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:1542.
6. Steensma DP, Bennett JM. The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:104-130.
7. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:451.
8. Ríos A, Cañizo MC, Sanz MA, Vallespí T, Sanz G, Torrabadella M, Gomis F, Ruiz C, San Miguel JF. Bone marrow biopsy in myelodysplastic syndromes: morphological characteristics and contribution to the study of prognostic factors. *Br J Haematol*. 1990;75:26.
9. Peters SW, Clark RE, Hoy TG, Jacobs A. DNA content and cell cycle analysis of bone marrow cells in myelodysplastic syndromes (MDS). *Br J Haematol*. 1986;62:239.
10. Seo IS, Li CY, Yam LT. Myelodysplastic syndrome: diagnostic implications of cytochemical and immunocytochemical studies. *Mayo Clin Proc*. 1993;68:47.
11. Nowell PC. Chromosome abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol*. 1992;19:25.
12. Kass L, Elias JM. Cytochemistry and immunocytochemistry in bone marrow examination: contemporary techniques for the diagnosis of acute leukemia and myelodysplastic syndromes. A combined approach. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1998;2:537.
13. Pellagatti A, Esoof N, Watkins F, Langford CF, Vetrie D, Campbell LJ, Fidler C, Cavenagh JD, Eagleton H, Gordon P, Woodcock B, Pushkar B, Kwan M, Wainscoat JS, Boultwood J. Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes using cDNA microarray technology. *Br J Haematol*. 2004;125:576.
14. Mohamedali A, Gäken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC, Hayden J, Donaldson N, Aul C, Gattermann N, Giagounidis A, Germing U, List AF, Mufti GJ. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2007;110:3365.
15. Bowen D, Culligan D, Jowitt S. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2003;120:187.
16. Hasse D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008; 87:515-526.
17. Makishima H, Rataul M, Gondev LP, Huh J, Cook JR, Theil KS, Sekeres MA, Kuczkowski E. FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: Improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8, and del(20q) *Leu Res*. 2010;34:447–453.
18. Southern E, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*. 1999;21:5-9.
19. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*. 2000;405:827-836.
20. www.empiregenomics.com
21. www.htg.ucsd.edu
22. Breit S, Nees M, Schaefer U, Pfoersich M, Hagemeier C, Muckenthaler M, Kulozik AE. Impact of pre-analytical handling on bone marrow mRNA gene expression. *J Haematol*. 2004;126:231-243.
23. Foret A, Quertainmont R, Botman O, Bouhy D, Amabili P, Brook G. Stem cells in adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise. *J Neurochem*. 2010;112:762-772.
24. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassman M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN. An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *Mol Biol*. 2006;7:3.

Učestalost leukemija i limfoma kod djece u Hrvatskoj

Ernest Bilić¹, Kristina Urch², Paško Konjevoda³, Filip Popović⁴, Ranka Femenić¹, Josip Konja¹, Maja Pavlović¹, Srđana Čulić⁵, Jelena Roganović⁶, Melita Nakić⁷, Tomislav Franjo Hajnžić⁸, Gordana Jakovljević⁷, Jasmina Stepan⁷, Višnja Armanda⁵, Dubravka Kuljiš⁵, Aleksandra Bonevski⁷, Ljubica Rajić¹

¹ Zavod za hematologiju i onkologiju, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb

² studentica Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

³ Institut Ruđer Bošković

⁴ Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

⁵ Klinika za dječje bolesti KBC Split

⁶ Klinika za pedijatriju KBC Rijeka

⁷ Klinika za dječje bolesti Zagreb, Odjel za hematologiju i onkologiju

⁸ KBC Sestre Milosrdnice, Klinika za pedijatriju

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Ernest Bilić, dr. med.

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

E-pošta: ernest.bilic@zg.t-com.hr

Uvod

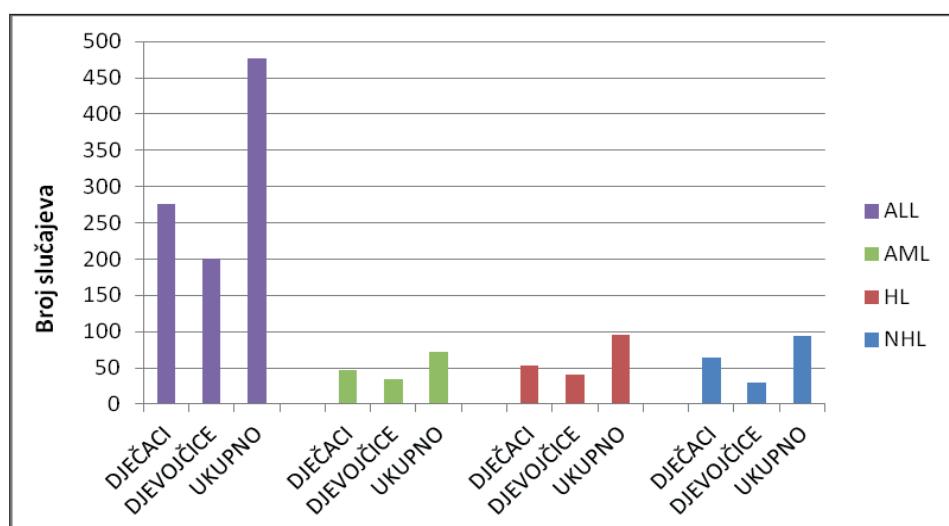
Maligne bolesti u djece su rijetke i čine svega 1% pobola dječje populacije. U razvijenim zemljama su drugi po redu uzrok smrtnosti, odmah nakon nesreća. Najčešće su akutne leukemije, tumori središnjeg živčanog sustava i limfomi. Leukemije i limfomi zajedno čine oko 40% svih malignoma u dobi do 18 godine. Ne postoje pouzdani podaci o učestalosti malignih bolesti kod djece u Republici Hrvatskoj (RH), budući da se dosta djece iz susjednih zemalja liječi kod nas, a službena ih statistika uvrštava u stanovnike RH.

Cilj rada

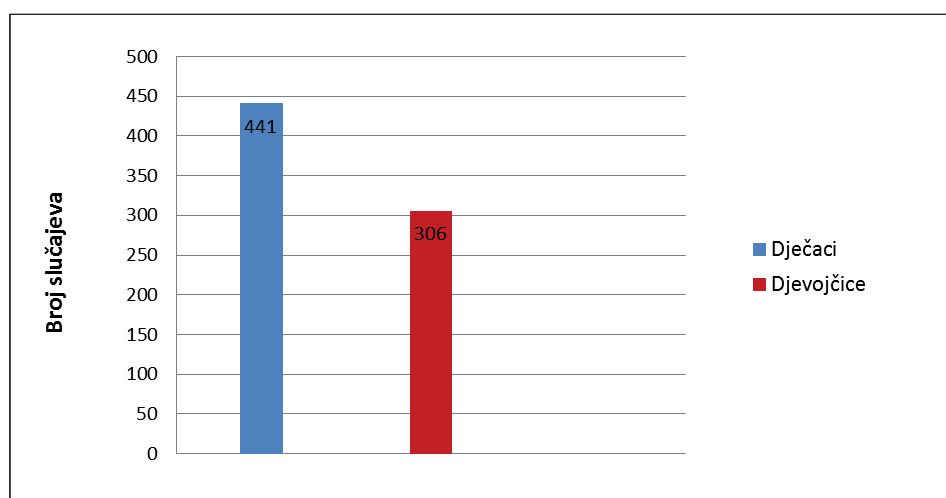
Cilj ovog rada bio je analizirati učestalost hematoloških malignih bolesti u RH te usporediti inciden-

cije po hrvatskim županijama. Pobrojena su djeca u dobi 0 - 18 godina liječena zbog akutne limfoblastične leukemije (ALL), akutne mijeloične leukemije (AML), Hodgkin limfoma (MH) i non Hodgkin limfoma (NHL) u razdoblju od 1.1.1992. do 31.12.2010. u sljedećim ustanovama: KBC Zagreb, KBC Split, KBC Rijeka, KBC Sestara Milosrdnica, te u Klinici za dječje bolesti Zagreb. U studiju nisu ušla djeca iz susjednih država liječena kod nas. U rad je uključeno 747 djece u dobi od 0 - 228 mjeseci (0-19 godina) kojima su dijagnosticirane ALL, AML, MH i NHL (Slika 1.) u razdoblju od 1992-2010. od kojih je bio 441 (59%) dječak i 306 (41%) djevojčica (Slika 2.).

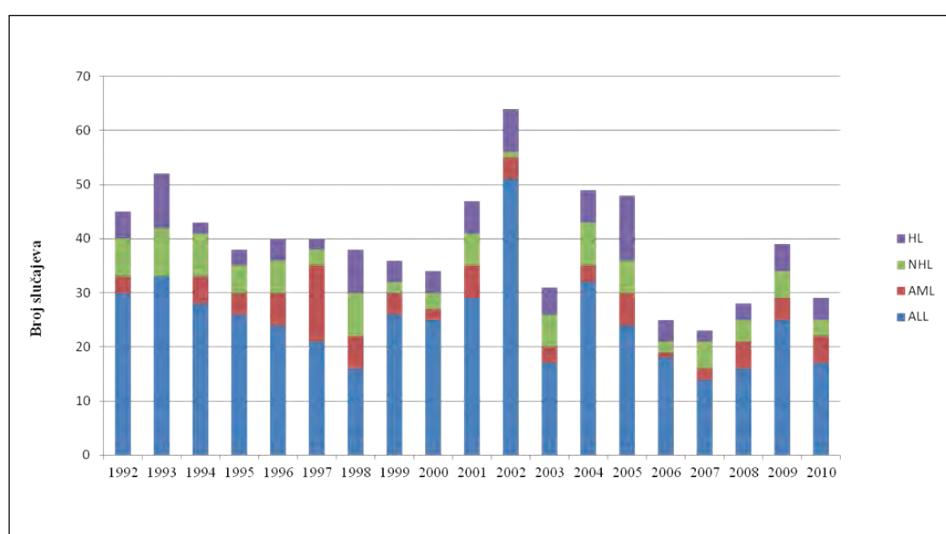
Rezultati su prikazani u slikama:



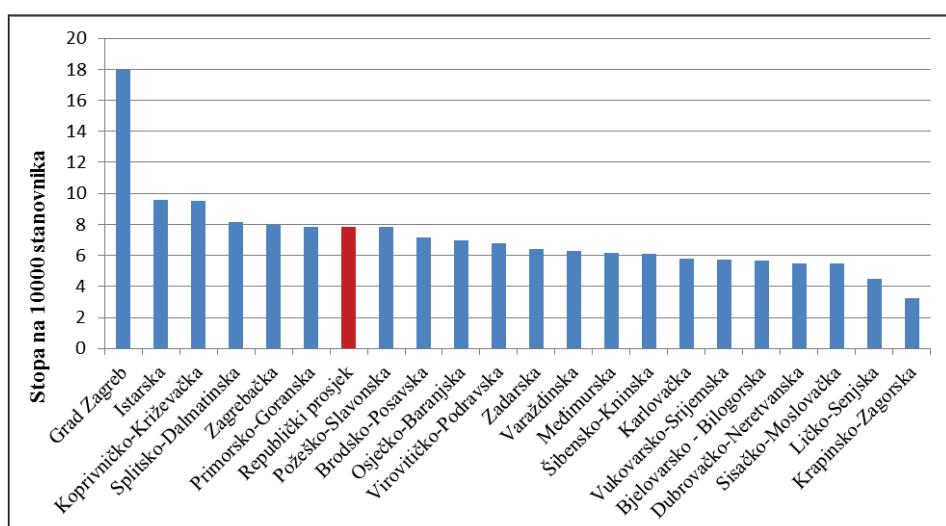
Slika 1. Razdioba bolesnika prema dijagnozama i spolu u razdoblju od 1992-2010. g.



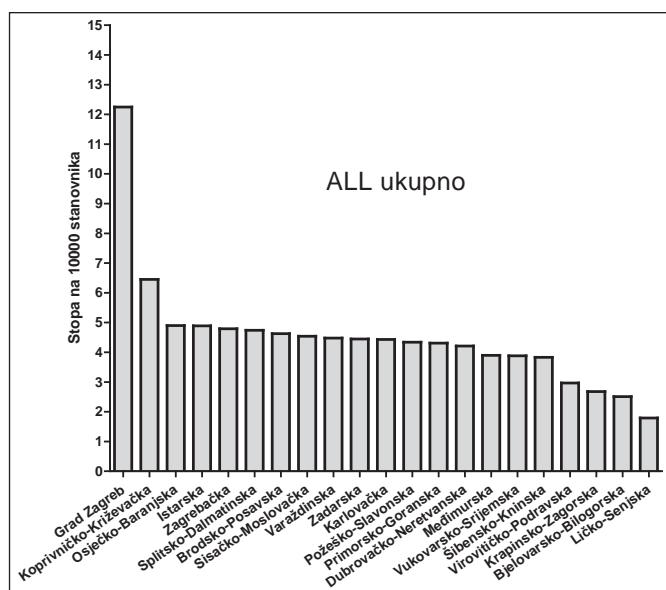
Slika 2. Razdioba prema spolu oboljelih od ALL-a, AML-a, MH-a i NHL-a u razdoblju od 1992-2010. g.



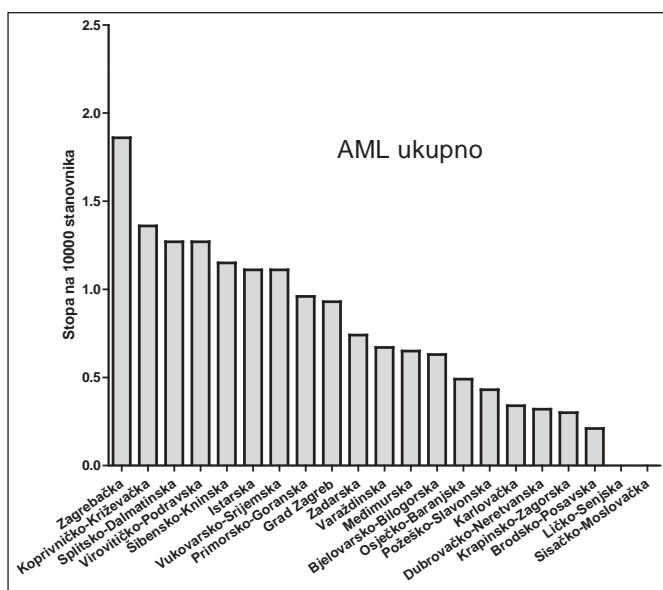
Slika 3. Učestalost AL-a i ML-a po godinama u razdoblju od 1992-2010. g.



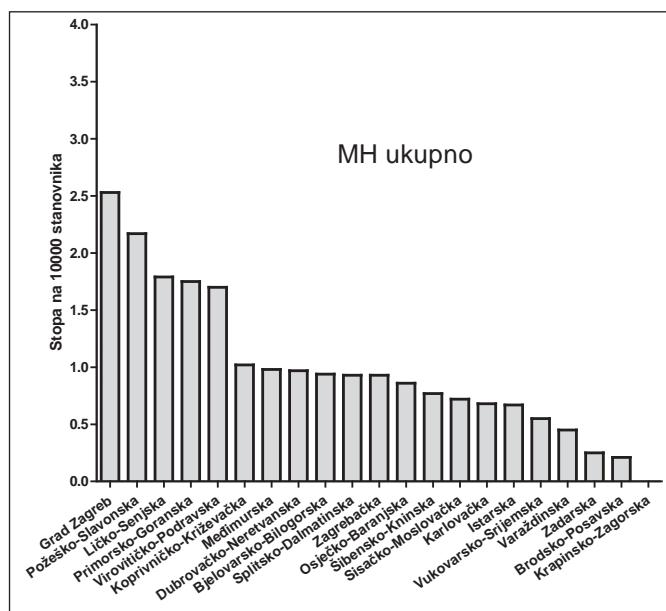
Slika 4. Učestalost oboljenja od ALL-a, AML-a, HL-a i NHL-a po županijama. Rezultati su izraženi kao stopa na 10000 stanovnika <18 god. Crveni stupac označava državni prosjek.



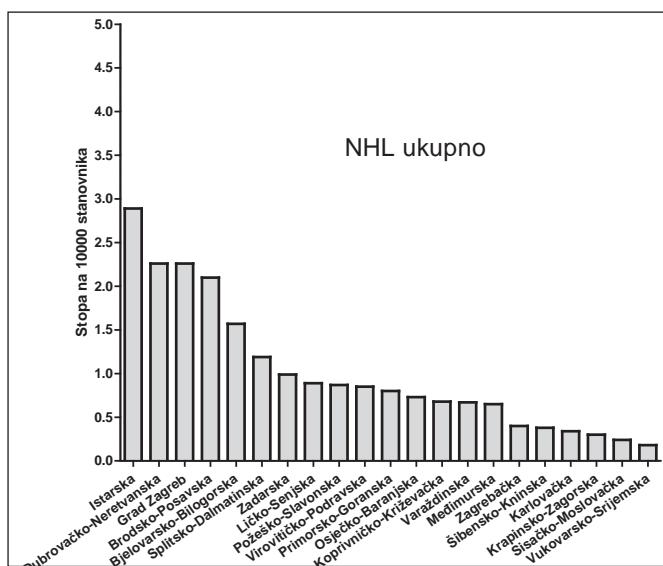
Slika 5. Učestalost obolijevanja od ALL-a po županijama za oba spola. Rezultati su izraženi kao stopa na 10.000 stanovnika .



Slika 6. Učestalost obolijevanja od AML-a po županijama za oba spola. Rezultati su izraženi kao stopa na 10000 stanovnika .



Slika 7. Učestalost obolijevanja od Mb. Hodgkin po županijama za oba spola. Rezultati su izraženi kao stopa na 10.000 stanovnika.



Slika 8. Učestalost oboljenja od NHL-a po županijama za oba spola. Rezultati su izraženi kao stopa na 10.000 stanovnika.

Rasprava

Prema podacima iz ENHIS (Environment and Health Information System, WHO Europe) i iz izvješća Bhatia S & Robison LL iz 2009., godišnja stopa incidencije ALL-a i AML-a (na 1.000.000 stanovnika, u djece 0 – 14 godina) u Danskoj iznosi 53, u Finskoj 49,9, u Italiji 49,1, u Njemačkoj 46,6, u Ujedinjenom Kraljevstvu 40,8, u Francuskoj 40,5, u Hrvatskoj 37,1, u Češkoj 37,1, u Bjelorusiji i Bugarskoj 35 te u Estoniji 34. Tijekom 19 godina (1992-2010.) u Republici Hrvatskoj je od hematoloških malignih bolesti oboljelo 747 djece, što godišnje prosječno iznosi 39,3 ($m=23,2 \ z=16,1$; prosječno je oboljevalo: 25 djece od ALL-a, 5 djece od NHL-a, 5 djece od MH-a i 4-5 djece od AML-a). Odnos dječaka prema djevojčicama je 3:2. Razlog takvog omjer mogao bi biti specifični imunološki odgovor muške djece na infekciju oko datuma rođenja (Nyári TA et al., 2008). Incidencija je 4,3 novooboljela na 100.000 i to akutne leukemije 3,3 na 100.000 djece, od čega ALL 2,8 na 100.000 djece (0-18 godina). U promatranom razdoblju od 1992 do 2010. godine nije nađen trend porasta niti smanjenja učestalosti hematoloških malignoma u djece. Premda se broj novooboljelih u navedenom razdoblju smanjuje u apsolutnim brojevima, manji je i broj djece u Republici Hrvatskoj. Prema popisu stanovništva iz 1991. godine u Republici Hrvatskoj je bilo oko 1.000.000 stanovnika mlađih od 18 godina, a prema popisu iz 2011. godine taj se broj smanjio na tek nešto više od 800.000.

Uspoređujući incidenciju po županijama, Grad Zagreb odskače od svih županija, ali i od državnog prosjeka (od 532 slučaja na grad Zagreb otpada čak njih 96, odnosno 7,81/10.000 promatrane dobne skupine, u razdoblju od 19 godina). Izračunato za grad Zagreb to bi iznosilo 41,1 novootkrivenih slučajeva na milijun djece promatrane dobne skupine. Odskakanje Zagreba moglo bi se objasniti urbanim načinom života, gustoćom prometa, učestalijim infekcijama, jer veći udio djece pohađa vrtiće i jaslice. Uspoređujući Republiku Hrvatsku s ostalim zemljama svijeta prema našim podacima Republika Hrvatska se nalazi negdje na sredini ljestvice učestalosti, najbliže Japanu. Niska godišnja stopa u zemljama s niskim nacionalnim dohotkom objašnjava se vjerojatnim problemom nedijagnosticiranja leukemija (Bhatia S & Robison LL, 2009).

Iako postoji mnoštvo literature koja opisuje vezanost raznih okolišnih čimbenika i hematoloških malignoma dječje dobi, nedovoljno je dokaza uzročno-posljedične veze, uz iznimku ionizirajućeg

zračenja. U većini slučajeva leukemija dječje dobi, uzrok je nepoznat. Do sada prepoznati uzroci i rizični čimbenici uključuju genetske čimbenike (2-3% slučajeva povezano je s Downovim sindromom) i izloženost ionizirajućem zračenju in utero i nakon rođenja (Belson M et al., 2007). Infektivne bolesti vjerojatno imaju ulogu u etiologiji leukemija dječje dobi, osobito kod ALL-a. Ostali čimbenici koji bi mogli biti povezani s leukemijama su elektromagnetsko polje niske frekvencije, benzen, pesticidi te visoki socioekonomski status (Poole et al., 2006). Kako bi se u dalnjim istraživanjima adekvatno ocijenila važnost izlaganja čimbenicima okoliša potrebno je poraditi na sljedećem: (1) usmjeriti se na izloženosti majki različitim agensima koji bi mogli dovesti do leukemogeneze (pesticidi, lijekovi, zračenje...); (2) obratiti pozornost na mehanizam, vrijeme i put izloženosti; (3) dokazati da je okruženje djeteta izloženo utjecajima čimbenika okoliša.

Zaključak

U Hrvatskoj je učestalost obolijevanja djece od leukemije i limfoma jedna od najnižih uspoređujući s učestalosti u ostalim europskim zemljama (37,1/1.000.000 stanovnika, u djece 0 – 14 godina). Leukemije i limfomi se značajno češće javljaju kod djece nastanjene u gradu Zagrebu, posebice ALL-a u prve četiri godine života.

Literatura:

1. Amigou A, Sermage-Faure C, Orsi L, Leverger G, Baruchel A, Bertrand Y, Nelken B, Robert A, Michel G, Margueritte G, Perel Y, Mechinaud F, Bordigoni P, Hémon D, Clavel J. Road traffic and childhood leukemia: the ESCALE study (SFCE). Environ Health Perspect. 2011;119(4):566-72.
2. Bhatia S & Robison LL. Epidemiology of leukaemia in childhood. U: Orkin SH, Fisher DE, Look TA, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG. Oncology of infancy and childhood. Philadelphia. 1 st ed, Saunders-Elsevier; 2009:4-25.
3. Bräuner EV, Sørensen M, Gaudreau E, LeBlanc A, Eriksen KT, Tjønneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. A prospective study of organochlorines in adipose tissue and risk of non-Hodgkin lymphoma. Environ Health Perspect. 2012;120(1):105-11.
4. Burkhardt B, Zimmermann M, Oschlies I, Niggli F, Mann G, Parwaresch R, Riehm H, Schrappe M, Reiter A; BFM Group. The impact of age and gender on biology, clinical features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma in childhood and adolescence. Br J Haematol. 2005;131(1):39-49.
5. Calvente I, Fernandez MF, Villalba J, Olea N, Nuñez MI. Exposure to electromagnetic fields (non-ionizing radiation) and its relationship with childhood leukemia: a systematic review. Sci Total Environ. 2010;408(16):3062-9.
6. Greaves MF, Maia AT, Wiemels JL, Ford AM. Leukemia in twins: lessons in natural history. Blood. 2003;102(7):2321-33.

7. Kelly JL, Drake MT, Fredericksen ZS, Asmann YW, Liebow M, Shanafelt TD, Feldman AL, Ansell SM, Macon WR, Herr MM, Wang AH, Nowakowski GS, Call TG, Habermann TM, Slager SL, Witzig TE, Cerhan JR. Early life sun exposure, vitamin Drelated gene variants, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control.* 2012.
8. Kinlen LJ. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *British Journal of Cancer.* 1995;71:1-5.
9. Ma X, Does MB, Metayer C, Russo C, Wong A, Buffler PA. Vaccination history and risk of childhood leukaemia. *Int J Epidemiol.* 2005;34(5):1100-9.
10. McNally RJ, Alexander FE, Vincent TJ, Murphy MF. Spatial clustering of childhood cancer in Great Britain during the period 1969-1993. *Int J Cancer.* 2009;124(4):932-6.
11. Menegaux F, Baruchel A, Bertrand Y, Lescoeur B, Leverger G, Nelken B, Sommelet D, Hémon D, Clavel J. Household exposure to pesticides and risk of childhood acute leukaemia. *Occup Environ Med.* 2006;63(2):131-4.
12. Nyári TA, Kajtár P, Bartyik K, Thurzó L, McNally R, Parker L. Seasonal variation of childhood acute lymphoblastic leukaemia is different between girls and boys. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(4):423-8.
13. Poole C et al. Socioeconomic status and childhood leukaemia: a review. *International Journal of Epidemiology.* 2006;35:370–384.
14. Reiter A & Ferrando AA. Malignant lymphomas and lymphadenopathies. U: Orkin SH, Fisher DE, Look TA, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG. *Oncology of infancy and childhood.* Philadelphia. 1 st ed, Saunders-Elsevier; 2009:418-427; 456-459.
15. Robison LL, Buckley JD, Daigle AE, Wells R, Benjamin D, Arthur DC, Hammond GD. Maternal drug use and risk of childhood nonlymphoblastic leukemia among offspring. An epidemiologic investigation implicating marijuana (a report from the Childrens Cancer Study Group). *Cancer.* 1989;63(10):1904-11.
16. Shu XO, Stewart P, Wen WQ, Han D, Potter JD, Buckley JD, Heineman E, Robison LL. Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukemia in offspring. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(9):783-91.
17. Taylor M, Hussain A, Urayama K, Chokkalingam A, Thompson P, Trachtenberg E, Buffler P. The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: an etiological hypothesis based on molecular mimicry. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;42(2):129-35.
18. Van Steensel-Moll HA, Valkenbueg HA, Van Zanen GE. Childhood leukemia and parental occupation, a register-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 1985;121:216-224.
19. Viana MB, Fernandes RA, de Carvalho RI, Murao M. Low socioeconomic status is a strong independent predictor of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer Suppl.* 1998;11:56-61.
20. Wakeford R, Mark P Little, and Gerald M Kendall. Risk of childhood leukemia after low-level exposure to ionizing radiation. *Expert Rev Hematol.* 2010;3(3):251-254.
21. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet.* 1999;354(9189):1499-503.
22. Xavier AC, Ge Y, Taub J. Unique clinical and biological features of leukemia in Down syndrome children. *Expert Rev Hematol.* 2010;3(2):175-86.

Citologija u pedijatrijskoj onkologiji

**Ika Kardum-Skelin^{1,2}, Gordana Kaić¹,
Biljana Jelić Puškarić¹, Marina Pažur¹, Maja Vanek¹**

¹Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa autora za kontaktiranje:

Doc. dr. sc. Ika Kardum-Skelin, dr. med.

Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, Klinička bolnica Merkur i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: ika.kardum-skelin@zg.t-com.hr

Uvod

Dijete nije „odrasli u malom“ te se iste ili slične bolesti ne prezentiraju jednako u dječjoj i odrasloj dobi. Iako kliničke i morfološke karakteristike mogu biti identične, sam tijek bolesti, prognoza i liječenje mogu biti različiti. Postoji nekoliko skupina bolesti karakterističnih za dječju dob kao što su: bolesti nakupljanja, solidni tumori dječje dobi te hemato-onkološke bolesti. Citomorfološke karakteristike različitih funkcionalnih stanja i bolesti dječje dobi predstavljaju pravi dijagnostički izazov za citologe (1).

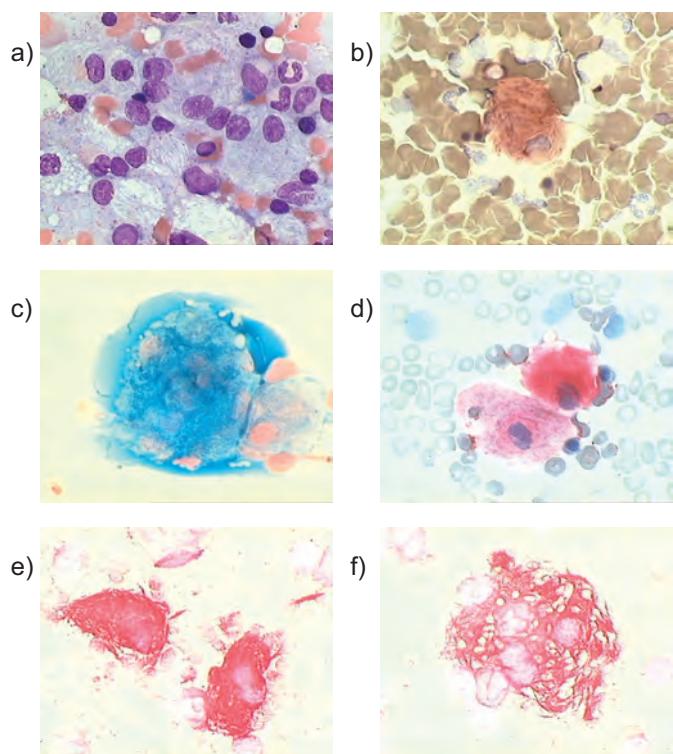
Bolesti nakupljanja

Bolesti nakupljanja su velika skupina prirođenih metaboličkih poremećaja koje uključuju Gaucherovu, Niemann-Pickovu, Farberovu bolest, itd. Tipične pjenušave stanice se mogu naći u cirkulaciji, odnosno perifernoj krvi i retikuloendotelnom sustavu koštane srži, jetre, slezene, itd. Citomorfološki, velike histiocitarne stanice poput zgužvanog papira predstavljaju Gaucherove stanice, morski plavi histiociti se nalaze u koštanoj srži bolesnika s Niemann-Pickovom bolesti i drugim sustavnim lipidozama. Citokemijske i imunocitokemijske karakteristike pjenušavih stanica u svakoj od bolesti nakupljanja omogućuju njihovo razlikovanje. Jedna od najčešćih je Gaucherova bolest.

Gaucherova bolest

Opisao ju je Gaucher 1882. godine, uzrokovana je naslijednim autosomnim recesivnim nedostatkom aktivnosti enzima glukocerebrozidaze, a klinički se prezentira u tri tipa, ovisno o tipu mutacije prisustvu neuroloških simptoma. Nasljeđuje se autosomno recesivno s prevalencijom od 1:100.000 stanovnika (u Židova 1:450-1:2.500 stanovnika). Poremećaj nakupljanja glikozilceramida izaziva multisistemsku

bolest s progresivnom organomegalijom (hepatosplenomegalija), infiltraciju koštane srži makrofagima krcatim lipidima, posljedične bolove u kostima, osteoporozu, patološke frakture, osteonekrozu te koštane deformacije i citopeniju (najčešće tromboцитopenija i anemija). Dijagnoza se obično postavlja kasno, u razmaku od 4-10 godina od početka simptoma i u prosjeku se pritom konzultira osam liječnika specijalista, uglavnom hematologa. Tipične Gaucherove stanice se mogu naći u koštanoj srži, slezeni, jetri... (Slika 1.).

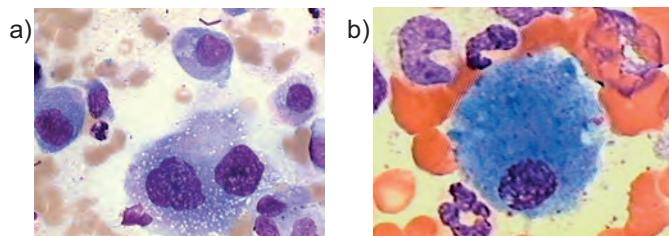


Slika 1. Punktat koštane srži. Gaucherove stanice:

a) obojene standardnim bojenjem po MGG-u; citokemijski pozitivne na b) nespecifičnu esterazu; c) na željezo reakcijom berlinskim modrilom i d) kiselu fosfatazu; imunocitokemijski fibrilarno pozitivne na e) CD68 i f) HLA-DR (LSAB x1000).

U standardno obojenim citološki preparatima po May-Grünwald-Giemsi (MGG) vide se kao velike stanice, ekscentričnih, manjih, okruglih jezgara i obilne, bijedo bazofilne, fibrilarne citoplazme, poput „zgužvanog papira“. Citokemijski su pozitivne na PAS, nespecifičnu esterazu, kiselu fosfatazu te željezo (zbog sadržaja feritina). Imunocitokemijski pokazuju jaku pozitivnost (u obliku fine linearne ispruganosti) na histiocitarne biljege CD68 i HLA-DR što govori za njihovu pripadnost histiocitarnom sistemu. Ponekad bolesnici s Gaucherovom bolesti

imaju relativno mali broj tipičnih Gaucherovih stanica u punktatu koštane srži te ih je teže uočiti svjetlosnim mikroskopom. Diferencijalno dijagnostički treba misliti i na pseudo-Gaucherove stanice koje se mogu naći kod drugih hematoloških bolesti (mijelodisplastični sindrom, kronična granulocitna leuke-mija, multipli mijelom, Hodgkinova bolest, akutna limfocitna leukemija, AIDS, itd.) (Slika 2.).



Slika 2. Pseudo-Gaucherove stanice: a) u bolesnika s akutnom limfocitnom leukemijom (MGG x1000); b) „sea blue“ histiociti u bolesnika s kroničnom granulocitnom leukemijom (MGG x1000).

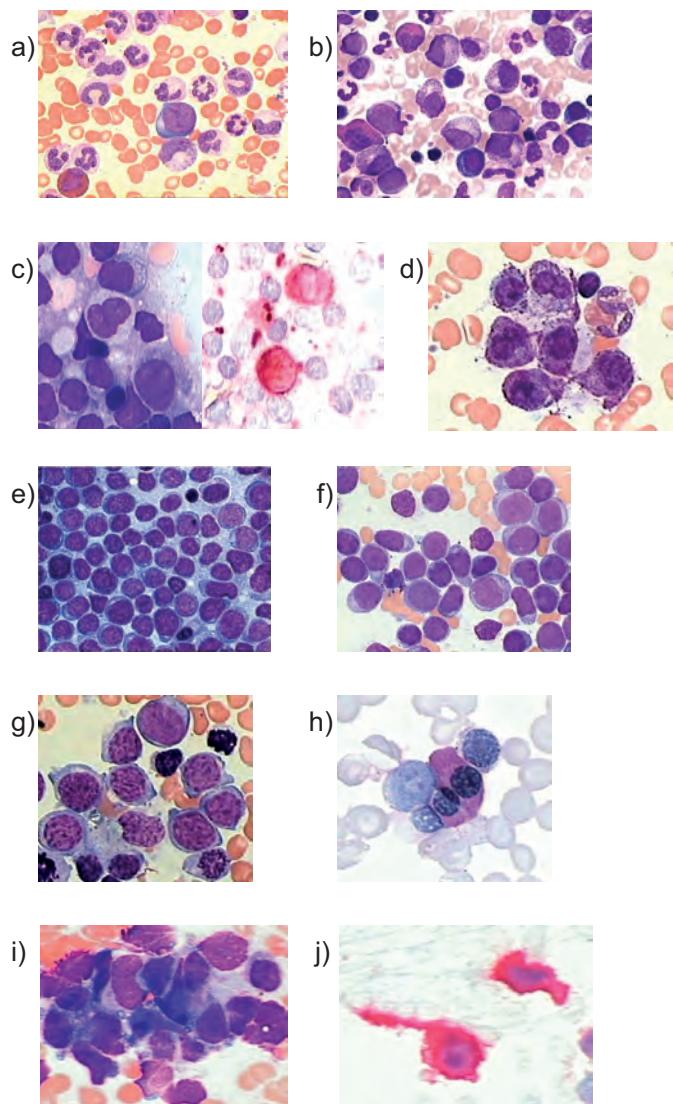
Citokemijski, pseudo-Gaucherove stanice pokazuju identičnu pozitivnost, ali su imunocitokemijski češće slabije pozitivne na ranije opisane biljege. Gaucherove stanice nisu tipične fagocitne stanice, već igraju aktivnu ulogu u kroničnoj stimulaciji imunog sistema (2).

Hematološke neoplazme

Prema važećoj klasifikaciji hematopoetskih i limfoidnih tumora Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) nalaze se i bolesti koje su manje ili više tipične za dječju dob (3).

Mijeloidne neoplazme

Mijeloidne neoplazme dječje dobi uključuju: dječji sindrom mijelodisplazije (najčešće refraktornu citopeniju u djece) u sklopu mijelodisplastičnog sindroma (MDS); juvenilnu mijelomonocitnu leuke-miju (JMML) u sklopu mijelodisplastičnih/mijeloproliferativnih neoplazmi (MDS/MPN) te iako rjeđe nego kod odraslih, kroničnu mijeloičnu leuke-miju (KML) (Slika 3a.) i mastocitozu kao subtipove mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN).



Slika 3. Mijeloične neoplazme: a) razmaz periferne krv - kronična granulocitna leukemija (MGG x1000); b) punktat koštane srži (KS) – mijelodisplastični sindrom – refraktorna anemija; c) punktat limfnog čvora – mijelodisplastična/ mijeloproliferativna neoplazma – juvenilna mijelomonocitna leukemija, MGG x1000 (slika lijevo) i monociti pozitivni na nespecifičnu esterazu (slika desno); d) punktat KS - mastocitoza (MGG x1000); e) punktat KS - akutna mijeloična leukemija s minimalnom diferencijacijom (MGG x1000); f) punktat KS - akutna mijeloična leukemija s minimalnom diferencijacijom – mijeloperoksidaza negativni blasti (imunocitokemija x1000); g) punktat KS - prava akutna eritroleukemija – nezreli eritroidni prekursori (MGG x1000); h) eritroleukemija – PAS pozitivni eritroblasti, x1000; i) punktat KS - akutna megakarioblastična leukemija, megakarioblasti u klasterima (MGG x1000); j) punktat KS - akutna megakarioblastična leukemija, blasti imunocitokemijski pozitivni na CD61 (LSAB x1000).

Sindrom mijelodisplazije dječje dobi

Javlja se vrlo rijetko i čini <5% svih hematoloških neoplazmi u djece do 14 godina (kod dijagnoze je potrebno isključiti sekundarni MDS). Mnoge morfološke, citogenetske i imunofenotipske karakteristike prisutne kod odraslih nalaze se i u ovom entitetu. Refraktorna anemija s prstenastim (engl. *ring*) sideroblastima (RARS) i MDS s del(5q) su izrazito rijetki kod djece. Odvajanje refraktorne anemije s viškom blasta u tip 1 i 2 (RAEB 1 i RAEB 2) kod djece nema prognostičko značenje. Čak i akutna mijeloična leukemija (AML) s 20-29% blasta u koštanoj srži (KS), koja ide često s karakteristikama displazije kod djece je sporo progresivna bolest. Hipocelularna KS kod MDS-a dječje dobi je češća nego kod odraslih te diferencijalno dijagnostički u tim slučajevima treba misliti na aplastičnu anemiju. Međutim, kod MDS-a je prisutna displazija na stanicama eritrocitopoeze (multinukleacija, lobulacija jezgara i megaloblastoidne promjene) i/ili granulocitopoeze (pseudo-Pelgerova anomalija, hipo/agranulacija citoplazme, nesrazmjer u sazrijevanju jezgre i citoplazme) i/ili trombocitopoeze (mikromegakariociti, multinukleacija) što se ne nalazi u slučajevima aplastične anemije. Najčešći oblik MDS-a dječje dobi je refraktorna citopenija (u 75% slučajeva se radi o hipocelularnoj KS s prisutnim displastičnim promjenama i <5% blasta, dok je postotak blasta u perifernoj krvi <2%) (Slika 3b.).

Juvenilna mijelomonocitna leukemija

Radi se o klonalnoj hematološkoj bolesti dječje dobi s proliferacijom granulocitne i monocitne linije. Blasta i promonocita u KS i PK je <20%, u PK se nalazi $\geq 1 \times 10^9/L$ monocita. Citogenetski nije prisutna t(9;22) – Philadelphia kromosom niti *BCR/ABL* fizijski gen. Budući se bolest često manifestira kao infekt (naznačena hepatosplenomegalija, limfadenopatija, povećane tonzile zbog leukocitne infiltracije, krvarenje, osip...) za dijagnozu moraju biti prisutna još barem dva navedena obilježja: hemoglobin F povišen za dob, nezreli granulociti u PK, broj leukocita $> 10 \times 10^9/L$, klonalne kromosomske abnormalnosti – najčešće monosomija 7, GM-CSF hipersenzitivnost mijeloidnih progenitora in vitro. Karakteristične su genetske mutacije RAS/MAPK, PTPN11, NF1 (Slika 3c.) (4).

Mastocitoza

Mastocitoza je klonalna neoplastična proliferacija mastocita koji se akumuliraju u jednom ili više

organu, često sa zahvaćanjem kože. O kliničkoj slici i distribuciji ovisi klasifikacija: kutana mastocitoza, indolentna sistemna mastocitoza, agresivna sistemna mastocitoza, mastocitna leukemija, mastocitni sarkom, ekstrakutana mastocitoza. Mastocitoza se javlja u bilo kojoj doboj skupini, ali je kutana najčešća u djece i može se javiti već pri porodu (kod 50% djece s kutanom mastocitozom bolest se javlja prije 6 mjeseci starosti djeteta). Citolisti su mastociti srednje velike do velike stanice, ovalnih ili okruglih jezgara, a citoplazma sadrži gruba, tamna, toluidin pozitivna metakromatska zrnca (Slika 3d.).

Atipični nezreli mastociti (engl. *metachromatic blast cells*) se nalaze u slučajevima mastocitne leukemije. Citomorfološka atipija, bi- ili multinukleacija i mitotske figure su tipične za agresivnije oblike.

Akutne mijeloične leukemije

Za razliku od akutnih limfoidnih leukemija, akutne mijeloične leukemije (AML) su bolesti koje se pretežno javljaju u odraslim. Svega nekoliko entiteta karakteristično se javlja u pedijatrijskoj populaciji. Akutne mijeloične leukemije s rekurentnim citogenetskim translokacijama kao što su akutna promijelocitna leukemija s najčešćom translokacijom - t(15;17) te akutna mijelomonocitna leukemija s eozinofilijom i citogenetskom abnormalnosti inv(16) ili t(16;16) se češće javljaju u mlađoj dobi, ali nisu predominantne. Najčešći tipovi koji se javljaju u djece su: akutna mijeloična leukemija s t(9;11), akutna megakarioblastična leukemija s t(1;22) i akutna mijeloična leukemija s minimalnom diferencijacijom. S druge strane, općenito rijetki tipovi poput akutne megakarioblastične leukemije, akutne panmijeloze s mijelofibrozom i prave eritroidne leukemije zahvaćaju bilo koju dob, uključujući i djecu. Posebno treba spomenuti mijeloične proliferacije udružene s Downovim sindromom karakteristične za dječju dob.

Akutna mijeloična leukemija s t(9;11)(p22;q23)

Ovaj oblik akutne mijeloične leukemije, iako se može javiti u bilo kojoj dobi, najčešći je u djece i predstavlja 9-12% pedijatrijskih AML. Morfološki su to najčešće monocitne ili mijelomonocitne leukemije, iako su opisani slučajevi i AML s ili bez sazrijevanja istih citogenetskih karakteristika. Tipičnog su citokemijskog i imunocitokemijskog profila ovisno o subtipu. Klinički se mogu prezentirati infiltracijom gingiva/kože ili se javljaju ekstamedularno kao mijeloidni sarkomi. Česta je i diseminirana intravaskularna koagulacija, a po kliničkom tijeku su

intermedijarnog rizika. Može se prezentirati s bazofilijom ako translokacija zahvaća regije p23;q34. Morfološka i citokemijska obilježja ovise o subtipu. Može odgovarati bilo kojem tipu prema FAB klasifikaciji (osim akutne promijelocitne i megakarioblastične leukemije), a najčešće se radi o AML sa sazrijevanjem ili akutnoj mijelomonocitnoj leukemiji.

Akutna megakarioblastična leukemija s t(1;22)

Javlja se pretežno u ženske djece, nevezano s Downovim sindromom. Morfološka slika u KS i PK se ne razlikuje od slične akutne megakarioblastične leukemije, NOS (*engl. not otherwise specified*), a sastoji se od umnoženih blasta i atipičnih mononuklearnih megakariocita pozitivnih na CD41 i/ili CD61, na PAS i kiselu fosfatazu te fokalno na nespecifičnu esterazu, negativnih na mijeloperoksidazu (MPO) i sudan black B (SBB) te limfoidne biljege.

Akutna mijeloična leukemija s minimalnom diferencijacijom

Najčešće se prezentira s pancitopenijom, iako se može javiti i s leukocitozom s upadljivim porastom broja blasta. Blasti varijaju u veličini, količini cito-plazme i vidljivosti nukleola. Najčešće se morfološki ne vidi diferencijacija prema lozi. Citokemijski su negativni na MPO, SBB i naftol-ASD-kloracetat esterazu (<3% pozitivnih nezrelih stanica), dok su nespecifične esteraze negativne ili nespecifično pozitivne. Po imunofenotipu su CD34 i HLA-DR pozitivni kao i CD33 u 60%, a negativni na biljege udružene s mijeloidnom ili monocitnom diferencijacijom (CD15 i CD14). Negativni su na B- i T-limfoidne biljege (Slika 3e,f.).

Prava akutna eritroidna leukemija (engl. pure erythroid leukemia)

Nediferencirana forma prave eritroidne leukemije morfološki je karakterizirana prisustvom srednje velikih do velikih eritroblasta tipa proeritroblasta pozitivnih na PAS, kiselu fosfatazu i α -naftil acetat esterazu, CD36, glikoforin (+/-) i hemoglobin A, a negativnih na MPO i SBB te mijeloidne biljege. Klinička slika je često rapidno progresivna (Slika 3g,h.).

Akutna megakarioblastična leukemija, NOS

Javlja se s podjednakom učestalosti u djece i odraslih. Isključuje akutnu megakarioblastičnu leukemiju s t(1;22) i nije vezana uz Downov sindrom. Blasti često imaju izdanke ili pupove, a često se javljaju u manjim nakupinama. Megakariasti, mikromegakariociti i displastični trombociti cirkuliraju u PK.

U nekim bolesnika javlja se fibroza u kosti. Cito-emijska i imunocitokemijska obilježja su identična s ranije opisanom akutnom megakarioblastičnom leukemijom s t(1;22).

Akutna panmijeloza s mijelofibrozom

Prvenstveno bolest odraslih, ali zahvaća i djecu. Najčešće je prisutna pancitopenija, a u razmazu PK uz eritroblaste mogu se naći neutrofilni prekursori uključujući i blaste te displastične promjene mijeloične loze. Dakriociti (eritrociti u obliku suza) se ne nalaze. Zbog fibrotične strome u koštanoj srži aspirati su često hipocellularni, a u biopsičkom uzorku je prisutna proliferacija eritroidnih i granulocitnih prekursora te megakariocita (panmijeloza). Karakteristična su područja nezrelih hematopoetskih stanica uključujući i blaste uz displastične megakariocite u koštanoj srži. Za panmijelozu je karakterističan citokemijski i imunocitokemijski nalaz kojim se dokazuje proliferacija sve tri loze.

Mijeloične proliferacije udružene s Downovim sindromom

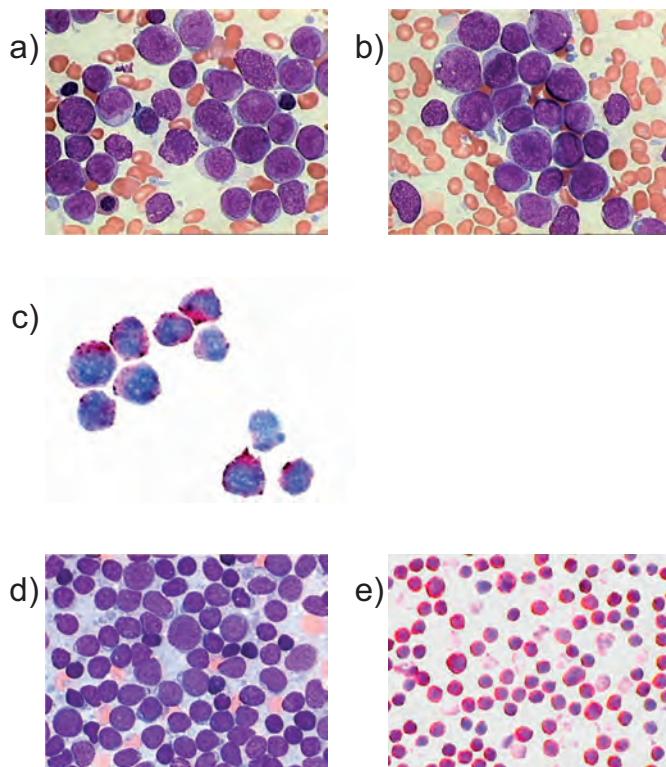
Djeca s Downovim sindromom (DS) imaju povećani rizik za nastanak akutnih leukemija. U djece s DS mlađe od 4 godine učestalije su AML (odnos ALL:AML je 1.0:1.2, u djece bez DS taj odnos je 4:1). U 70% djece mlađe od 4 godine s DS radi se o megakarioblastičnoj leukemiji (u djece bez DS incidencija je 3-6%), koja ponekad ima jedinstvene morfološke, imunofenotske, kliničke i molekularne karakteristike uključujući *GATA 1* mutaciju (Slika 3i,j.).

U oko 10% novorođenčadi s DS može se naći prolazna abnormalna mijelopoeza ili prolazna mijeloproliferativna bolest koja se teško može razlikovati od predominantne forme AML. Bolest prolazi spontano za nekoliko tjedana do tri mjeseca. U 20-30% slučajeva prelazi u megakarioblastičnu leukemiju u roku od 1-3 godine.

Prekursorske limfoidne neoplazme

Akutne limfoblastične leukemije (ALL) su prvenstveno bolesti djece; 75% slučajeva se javlja u djece mlađe od šest godina. Citomorfološki, limfoblasti su obično mali, srednje veliki do veliki blasti (B ili T podrijetla), koji zahvaćaju koštanu srž i krv (ALL) i/ili timus, limfne čvorove, slezenu ili ekstranodalna područja (limfoblastični limfomi). *Limfoblastična leukemija – NOS* čini 75% dječjih leukemija i ima dobru prognozu; *B limfoblastična leukemija/limfom*

s t(v;11q23) - MLL preuređeni javlja se u novorođenčadi (<1 godine starosti), ide s hiperleukocitom, zahvaća središnji živčani sustav (SŽS) i ima lošu prognozu; *B limfoblastična leukemija/limfom s t(12;21) (p13; q22) - TEL-AML1 (etv6-RUNX1)* čini 25% B-ALL-a, također bolest djeće dobi (ne vidi se kod novorođenčadi, a učestalost opada kod starije djece) s dobrom prognozom u >90% djece; *B limfoblastična leukemija/limfom s t(1,19)(Q23; P13.3) - E2A-PBX1(TCF3-PBX1)* je česta leukemija u djece (6% svih slučajeva dječjih B-ALL), izgleda sa boljom prognozom nego što se ranije mislilo; *B limfoblastična leukemija/limfom s hiperploidijom* zastupljena je u 25% svih slučajeva B-ALL-a djece najčešće ima >50<66 kromosoma, prognoza je dobra u >90% djece; *B limfoblastična leukemija/limfom s hipodiploidijom kada je prisutno <46 kromosma (45 kromosoma u oko 5% slučajeva B-ALL-a, <44 kromosoma u 1% slučajeva)* podjednako je zastupljena u djece i odraslih, a prognoza ovisi o broju kromosoma. Nema jedinstvenih morfoloških, citokemijskih ili imunofenotipskih karakteristika koje mogu sa sigurnošću razlikovati ove citogenetske podtipove ALL-a (Slika 4.).



Slika 4. Prekurske limfoidne neoplazme:

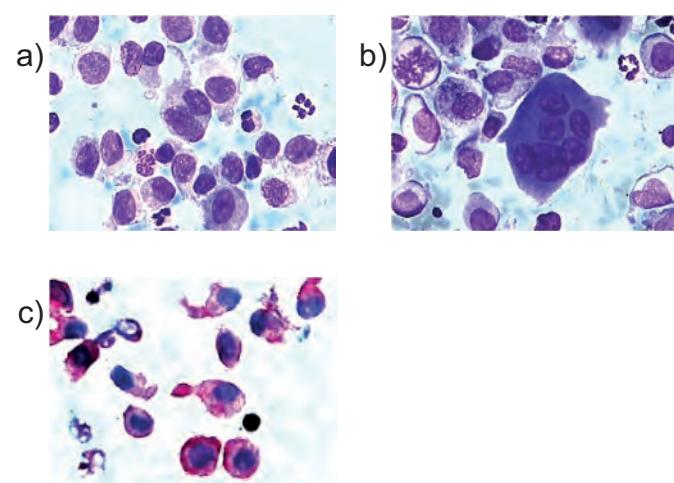
a, b) punktat KS - akutna pre-B limfatična leukemija (MGG x1000); c) imunocitokemijski CD10 pozitivni limfoblasti (LSAB x1000); d) punktat KS - akutna T limfoidna leukemija (MGG x1000); e) CD3 pozitivni T limfoblasti (LSAB x1000).

Histiocitne i dendritične neoplazme

Histiocitne neoplazme su klonalne bolesti podrijetla mononuklearnih fagocitnih stanica (makrofagi i dendritične stanice) ili histiocita. Najčešći oblik u dječjoj dobi je Langerhansova histiocitoza.

Langerhansova histiocitoza

Ova histiocitoza je klonalna neoplastična proliferacija koja uključuje Letterer-Siweovu bolest; eozinofilni granulom i Hand-Schuller-Christianovu bolest. Radi se o imunofenotipski i funkcionalno nezrelim, Langerhansovim stanica izmješanim s eozinofilima, makrofazima i često multinuklearnim orijaškim stanicama. Langerhanske stanice su citomorfološki velike, ovoidne mononuklearne stanice, preklopljenih jezgara s diskretnim nukleolima i s umjerenom količinom homogene citoplazme. Stanice su imunocitokemijski pozitivne na langeerin, S-100 protein, CD1a, CD207, CD68, vimentin i HLA-DR. Elektronskim mikroskopom vidljiva su Birbeckova granula. Nema tipičnog genetski detektibilnog defekta (Slika 5.).



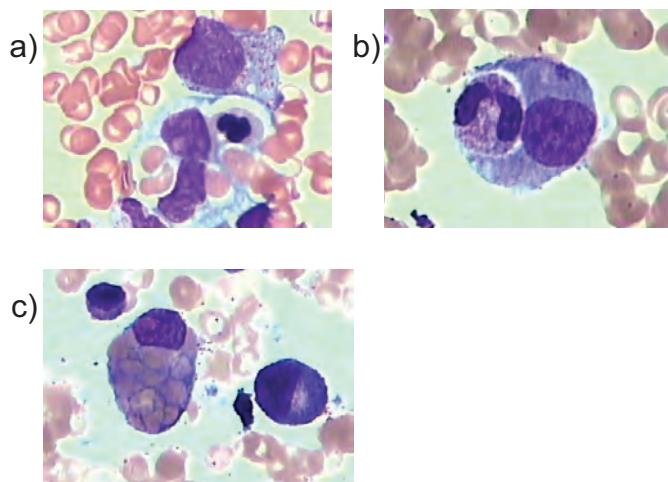
Slika 5. Maligna histiocitoza. Punktat tumora:
a, b) atipične histiocitarne stanice, prisutne mitoze i multinuklearne stanice (MGG x1000);
c) imunocitokemijski stanice izrazito pozitivne na CD1a (LSAB x1000).

Druge bolesti histiocitarnih stanica

Bolesti histiocitarnih stanica (histicitoza dendritičnih stanica, hemofagocitna limfohistiocitoza, maligna histiocitoza, kongenitalna „samoizlječujuća“ forma zvana Hashimoto-Pritzkerova bolest i sl.) je skupina idiopatskih poremećaja karakterizirana proliferacijom histiocitarnih stanica.

Hemofagocitna limfohistiocitoza

Hemofagocitna limfohistiocitoza (HLH) je potencijalno smrtonosna bolest, čije je rano prepoznavanje i liječenje od presudne važnosti. Karakterizirana je vrućicom, hepatosplenomegalijom, osipom, neurološkim manifestacijama i citopenijom nastalim zbog poremećaja stanične citotoksičnosti (prekomjerne upalne reakcije) s posljedičnom akumulacijom aktiviranih T limfocita i makrofaga pretežno u limfoidnim organima. Iako se može javiti u svim dobnim grupama, neonatalni početak bolesti je vrlo rijedak. Familijarna hemofagocitna limfohistiocitoza (FLH) je autosomno recesivna nasljedna multisistemska bolest. PRF1, UNC13D i STX11 genski defekti nalaze se u podlozi 40-50% slučajeva FLH (5,6). Sekundarna limfohistiocitoza se javlja sporadično bez poznatih genetskih promjenama, povezana s infekcijama, malignim, metaboličkim, autoimunim bolestima i jatrogenim imunodeficijecijama (Slika 6.) (7,8).



Slika 6. Hemofagocitna limfohistiocitoza. Citofazi u punktatu koštane srži: a) eritrocito/eritroblastofag; b) fagocitirani neutrofilni granulocit i c) eritrofag (MGG x1000).

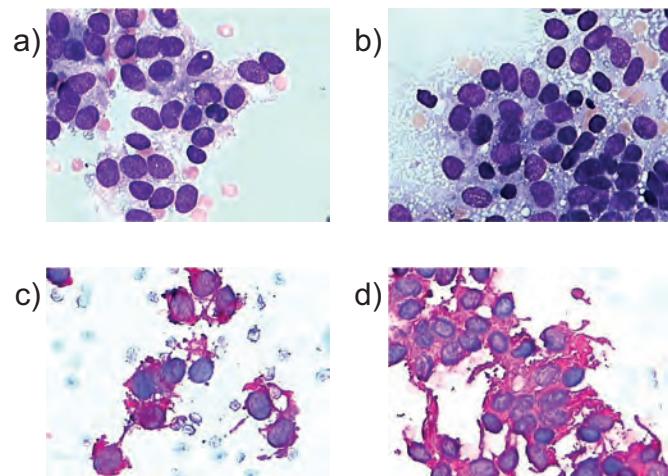
Solidni tumori dječje dobi

Tijekom posljednjih nekoliko godina, citološka punkcija i citomofologija se više koristi u dijagnostici pedijatrijskih solidnih tumora. Najčešći solidni tumori dječje dobi su tumori malih okruglih stanica (*engl. small round cell tumors - SRCT*) koji uključuju: Ewingov sarkom/primitivni neuroektodermalni tumor, neuroblastom, maligni limfom, nefroblastom (Wilmsov tumor), hepatoblastom, abdominosarkom, dezoplastični tumor malih okruglih stanica. Ovi tumori različitog podrijetla predstavljaju heterogenu skupinu malignih neoplazmi, vrlo sličnih histološki i citološki s prisutnim nediferenciranim, unifor-

mnim, malim okruglim stanicama velikih, hiperkromatskih jezgara. Citološka dijagnoza i subtipizacija tumora malih okruglih stanica povećava se ako se koriste klinički podaci te imunocitokemijska i genetska analiza u određenim slučajevima (9).

Ewingov sarkom

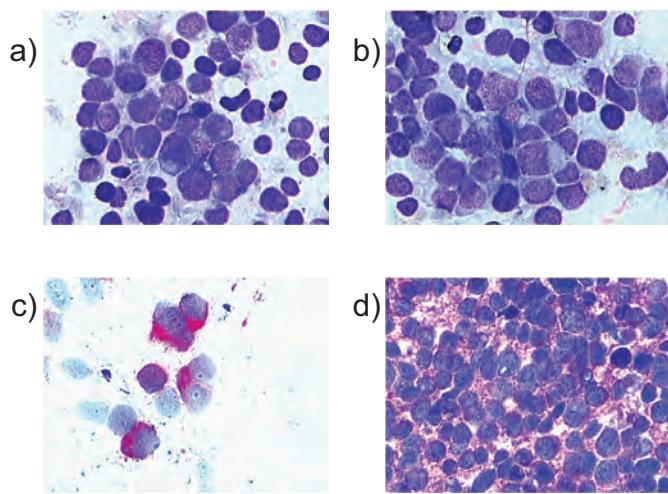
Predstavlja primitivni neuroektodermalni tumor u djece s medijanom dobi od 13 godina (80% u prva dva desetljeća života). Citološki se vide pojedinačne stanice ili male kohezivne grupe nediferenciranih malih okruglih stanica bez utiskivanja jezgara, ponekad prisutnih pseudorozeta, karakterističnog imunofenotipa (CD99 ++, Vimentin +, NSE+/-, Cytokeratin (CK) -/+), često s genetskim abnormalnostima (*t(11;22)(q24;q12)*, *MIC2* gen +) (Slika 7.).



Slika 7. Ewingov sarkom. Punktat tumora:
a) kohezivne grupe nediferenciranih malih okruglih stanica bez utiskivanja jezgara, prisutnih pseudorozeta (MGG x1000); c) stanice izrazito pozitivne na CD99 i d) vimentin (LSAB x1000).

Neuroblastom

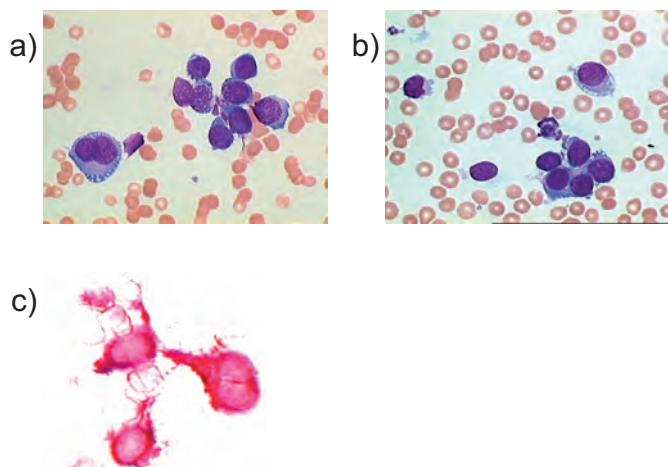
Preko 90% neuroblastoma se javlja do pete godine života, čak u 50% slučajeva do druge godine života (najveća učestalost s 18 mjeseci). To je ekstremno maligni solidni tumor dječje dobi, kod 25% djece je kongenitalan. Citomorfološki se nalaze male primitivne stanice s oskudnom citoplazmom uz slabo do dobro formirane rozete te fibrilarni matrix, a mjestimično i multinuklearne ganglijske stanice. Imunofenotipski su neuron specifična enolaza (NSE)++, CK-, neurofilament NF +, CD99-, Vimentin +/- i Sinaptofizin (SYN)+. Genetski se može naći *del1p*, *n-myc* i DNA hiperploidija (Slika 8.).



Slika 8. Neuroblastom. Punktat tumora: a, b) srednje velike stanice visokog nukleo-citoplazmatskog omjera, prisutne rozete i fenomen utiskivanja; c) imunocitokemijski stanice pozitivne na neuron specifičnu enolazu (NSE) i d) kromogranin (LSAB x1000).

Rabdomiosarkom

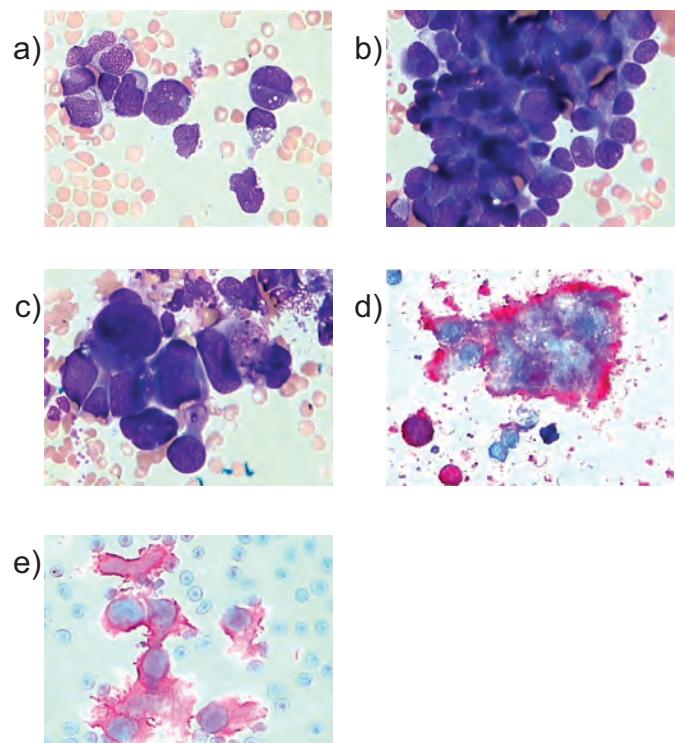
Ovaj tumor je najčešći sarkom mekog tkiva u djece mlađe od 15 godina, s predilekcijom u području glave i vrata, genitourinarnog trakta i donjih ekstremiteta. Razlikujemo tri subtipa: embrionalni, alveolarni te pleomorfni tip. Citološki se radi o nezrelim tumorskim stanicama koje su citokemijski i imunocitokemijski pozitivne na PAS, vimentin i dezmin, a negativne na limfomske i epitelne biljege, pri čemu dodatne tehnologije (citogenetska analiza, protočna citometrija, molekularna analiza) ne samo da mogu biti od pomoći već u nekim slučajevima dovode do definitivne dijagnoze (Slika 9.) (10).



Slika 9. Rabdomiosarkom. Embrionalni tip: a, b) nezrele primitivne tumorske stanice (MGG x1000); c) imunocitokemijski izrazito pozitivne stanice na dezmin (LSAB x1000).

Wilmsov tumor

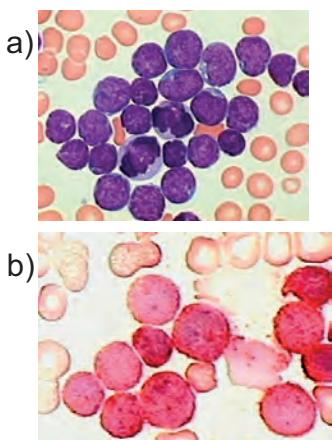
Citološki se sastoji od tri komponente: epitelne, sarkomske i blastomske u različitim proporcijama. Ovisno o tome nalazimo umjerenu celularnost pojedinačnih ili u rahlim nakupinama malih okruglih stanica, slabo vidljivih nukleola, srednje obilne citoplazme uz izvjestan polimorfizam. Prema imunofenotipu (CD10+, VIM+ i CK+), eventualnim citogenetskim abnormalnostima (del16p13, del11p13, del11p15.5) i ranije opisanoj morfologiji dijagnoza može biti decidirana (Slika 10.).



Slika 10. Wilmsov tumor. Punktat tumora: a) blastomska b) epitelna i c) sarkomska komponenta; d) izrazita imunocitokemijska reaktivnost na CD10 i e) epitelni biljeg BerEP4 (LSAB x1000).

Non-Hodgkin limfomi (NHL) - limfoblastični

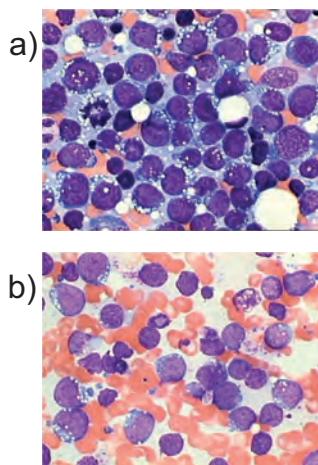
Limfoblastični (LBL) NHL-i u dječjoj dobi mogu biti T i B. T-LBL čine 85-90% limfoblastičnih limfoma, a leukemijska slika (T limfoblastična leukemia) 15% leukemija djece (češća je u adolescenata te muškaraca). Prognostički u djece su bolesti visokog rizika. Često je tumorska masa u medijastinumu (50% LBL) ili drugom tkivu, a nisu rijetki niti pleuralni izljevi (Slika 11.).



Slika 11. Ne-Hodgkin limfom. Limfoblastični subtip:
a) atipični limfoblasti konvolutnih jezgara (MGG x1000); b) imunocitokemijski pozitivni na CD3 (LSAB x1000).

Non-Hodgkin limfomi (NHL) – Burkittov limfom (BL)

Radi se o agresivnom limfomu koji čini 30 – 50 % limfoma dječje dobi. Poznate su tri kliničke varijante: endemični/sporadični oblik vezan uz imuno-deficijenciju, ekstranodalni oblik te leukemična faza (“bulky”disease) - ALL-L3. Po kliničkom tijeku je agresivan, iako potencijalno i izlječiv. Morfološke varijante dijele ga u *klasičan BL*, *BL s plazmacitoidnom diferencijacijom (cIg)* i *atipični Burkitt/Burkitt-like* (MYC translokacija). Najčešće se sastoji od monomorfnih limfatičnih stanica, okruglih jezgara, bazofilnih nukleola, bazofilne citoplazme s lipidnim vakuolama. Mogu se naći mitoze, a u pozadini se vide brojni makrofagi što daje sliku zvjezdanih neba (*engl. starry – sky*). Ima karakterističan imunofenotip IgM+, panB +, CD10+, BCL6+, Ki-67+, CD5-, CD23-, BCL2- i citogenetiku s t(8;14) (Slika 12.) (11).



Slika 12. Ne-Hodgkin limfom. Burkittov subtip:
a) punktat limfnog čvora (MGG x1000); b) punktat koštane srži (MGG x1000).

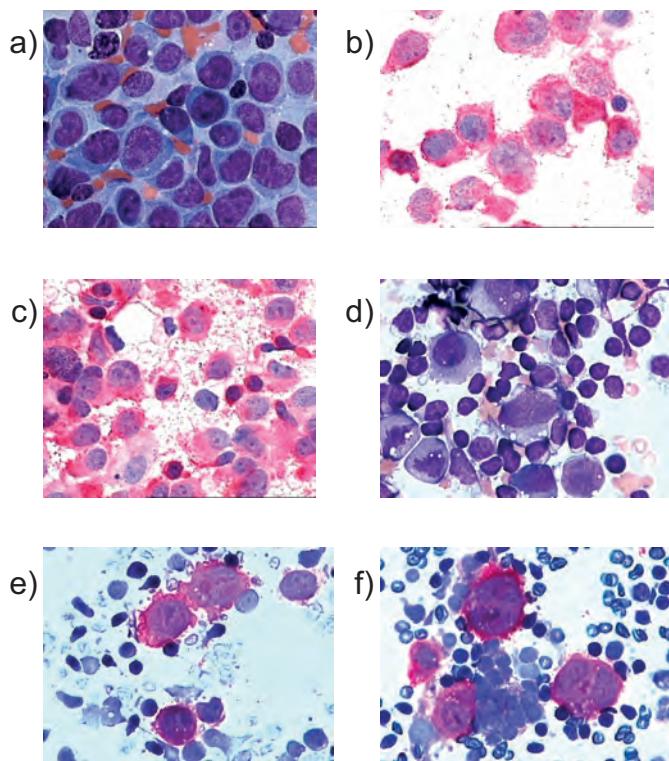
Drugi maligni limfomi sa značajnom učestalosti u dječjoj dobi

Hodgkinov limfom - HL

Ovaj tip limfoma predstavlja 30% svih limfoma. Klinički se prezentira kao spororastuća limfadenopatija, u 80% slučajeva iznad diafragme, s vrlo rijetkim ekstranodalnim primarnim lokalizacijama (SŽS, štitnjača, želudac, jednjak, ovarij, pluća). Morfološki se dijeli u dvije skupine: klasični HL (nodularna skleroza - NS, limfocitima bogat klasični HL - LBHL, miješana celularnost - MC te limfocitna deplecija - LD) i nodularna limfocitna predominalacija HL (NLPHL). Maligne stanice su mononuklearne Hodgkinove i multilobulirane, ponekad multinuklearne Reed-Sternbergove stanice. „Upalni“ pozadinski infiltrat je sastavljen od malih limfocita, histiocita, eozinofilnih i neutrofilnih granulocita te plazma stanica. Tipovi klasičnog HL imaju karakterističan fenotip: CD30+, CD15+/-, CD45-, CD20+/-, EBV+ (70% MC, 40% NS, 15% LBHL), ALK-, dok je imunofenotip LH stanice karakteristične za NLPHL: CD20+, CD30-, CD15-, ALK-, EBV-, EMA+/-, CD45+.

Anaplastični limfom velikih stanica – NHL – ALCL

ALCL je uglavnom T stanični limfom koji čini 10-30% NHL-a dječje dobi. Vrlo je karakteristične morfološke slike s velikim, pleomorfnim limfatičnim stanicama koje su pozitivne na CD30 i EMA-u, u 75% slučajeva na CD3 (veća pozitivnost na CD4), a u 60-85% na ALK. U 90% slučajeva je prisutna preuredba gena za T-stanični receptor (TCR), u 70-80% t(2;5), a u 10% t(1;2). Stanice su negativne na EBV. Morfološki se razlikuju tri varijante (commom, limfohistiocitna i varijanta malih stanica), dok se klinički prezentira kao sistemni oblik (karakteristično za dječju dob) ili kao kožni tip (kod djece rijetko) (Slika 13.).



Slika 13. Anaplastični limfom velikih stanica: a) punktat kožne tvorbe s atipičnim polimorfnim stanicama (MGG x1000); b) izrazito pozitivne stanice na CD30 i c) CD4 (LSAB x1000); d) punktat limfnog čvora – mješavina malih limfocita i krupnih atipičnih retikularnih stanica s prisutnim mitozama (MGG x1000); e) atypične retikularne stanice imunocitokemijski pozitivne na CD30 i f) CD3 (LSAB x1000).

Zaključak

Interpretacija citološkog nalaza kod bolesti dječje dobi je lagana ako se citolomorfologija korelira s relevantnim citokemijskim, imunocitokemijskim, genetskim i kliničkim nalazima.

Senzitivnost i specifičnost citologije za tumore malih okruglih stanica prelazi 90% ako je uzorak adekvatan. Dijagnostička točnost je i veća ako se koriste dodatne tehnologije (specijalno citogenetika ili molekularna analiza) (12).

Literatura:

1. Kocjan G, Gray W, Levine T, Kardum-Skelin I, Vielh P. Diagnostic Cytopathology Essentials. Churchill Livingstone; 2013.
2. Mrsić M, Stavljenić-Rukavina A, Fumić K, Labar B, Bogdanović V, Potočki K, Kardum-Skelin I, Rovers D. Management of Gaucher disease in a post-communist transitional health care system: Croatian experience. Croat Med J 2003;44(5):606-9.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organization. Lyon: IARC Press; 2008.
4. Jakovljević G, Kardum-Skelin I, Rogošić S, Čulić S, Stepan J, Gagro A, Škaric I, Mikecic L, Bonevski A, Barišić I, Nakić M. Juvenile Myelomonocytic Leukemia with PTPN11 Mutation in a 23-Month-Old Girl. Coll Antropol 2010;34(1):251-4.
5. Jakovljević G, Kardum-Skelin I, Rogošić S, Čulić S, Stepan J, Gagro A, Škaric I, Mikecic L, Bonevski A, Barišić I, Nakić M. Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in a 6-Week-Old Male Infant. Coll Antropol 2010;34(2):631-4.
6. Roganović J, Kvenić B, Jonjić N, Seili-Bekafigo I, Kardum-Skelin I. Neonatal Hemophagocytic Lymphohistiocytosis - Case Report. Coll Antropol 2010;34(1):285-290.
7. Raić Lj, Dejanović S, Femenić R, Pavlović M, Konja J, Kardum-Skelin I, Tešović G, Batinić D, Dubravčić K, Bilić E. Hemofagocitna limfohistiocitoza: smjernice za dijagnostiku i liječenje. Bilten Krohema 2012;4(2):60-3.
8. Rajić Lj, Bilić E, Femenić R, Meštrović D, Ilić I, Kardum-Skelin I, Tešović G, Konja J. Subcutaneous Panniculitis-Like T-Cell Lymphoma in a 19 Month-Old Boy Treated with ALL-IC-BFM 2002 Protocol. Coll Antropol 2010;34(2):679-82.
9. Kardum-Skelin I, Fabijanić I, Jelić-Puškarić B, Šiftar Z, Kardum Paro MM, Lasan-Trčić R, Mahovlić V, Kušec R, Seili-Bekafigo I. Jedna stanica - konačna dijagnoza! Gdje prestaje struka i počinje umjetnost? Acta Med Croatica 2008;62(4):334-49.
10. Jelić-Puškarić B, Rajković-Molek K, Raić Lj, Batinić D, Konja J, Kardum-Skelin I. Rhabdomyosarcoma with Bone Marrow Infiltration Mimicking Hematologic Neoplasia. Case Report. Coll Antropol 2010;34(2):639-9.
11. Lasan Trčić R, Šušterčić D, Kuspilic M, Jelić Puškarić B, Fabijanić I, Kardum-Skelin I. Recurrent Chromosomal Abnormalities in Lymphoma in Fine Needle Aspirates of Lymph Node. Coll Antropol 2010;34(2):387-93.
12. Cibas ES, Ducatman BS. Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009.

Prof. dr. sc. Srđana Čulić, prim. dr. med.
Klinika za dječje bolesti KBC Split i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu
E-pošta: srdjana.culic@st.htnet.hr

Cerebrovaskularna tromboza je najčešća manifestacija trombofilije u novorođenčeta. Nastaje zbog utjecaja jednog ili više protrombotskih čimbenika. Može kako neurološki oštetiti dijete i rezultirati smrtnim ishodom. Najčešći su arterijsko ishemski moždani udar (AIS) i sinovenска tromboza (SVT). Iako se smatraju rijetkim, incidencija AIS-a je 2.7, a SVT-a 0.67 na 100.000 djece. Poznavanje etiologije je iznimno važno s obzirom na primarnu ili sekundarnu prevenciju protrombotske bolesti.

Trombofiliju u djece mogu uzrokovati protrombotske abnormalnosti koagulacijskog i fibrinolitičkog sustava. Tu spadaju nedostatak prirodnih antikoagulanata tj. nasljedni poremećaji kao što su nedostatak antitrombina III (AT III), proteina C (PC), proteina S (PS), plazminogena te prisutnost disfibrinogenemije, FV Leidena, protrombin-20210 mutacije ili metilen tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) (1).

Stečenu trombofiliju susrećemo u djece sa stavnim lupusom eritematodesom (SLE), malignom bolesti, prilikom primjene L-asparaginaze zbog nedostatka AT III, kod vaskulitisa, pojave antifosfolipidnih protutijela, rezistencije na aktivirani protein C (APC), hiperhomocisteinemije, hiperlipidemije, policitemije, trombocitoze zbog sideropenične anemije ili nakon splenektomije te uz bolesti trombocita (2). Važna je identifikacija visoko rizične djece za nastanak tromboze, jer rana dijagnostika, lijeчењe i moguća profilaksa mogu spriječiti iznimno teške posljedice nastale nakon cerebralne tromboze u novorođenačkoj i dojenačkoj populaciji (3).

Teške neurološke sekvele nastaju u 40% djece koja prežive SVT, a mortalitet je oko 10%. Nažalost nema randomiziranih studija koje opisuju prevenciju ili antikoagulacijsko liječeњe u ovoj populaciji (4).

Upravo zbog toga potrebno je osvijestiti ovaj problem i potaknuti provođenje randomiziranih studija koje bi unaprijedile ranu dijagnostiku pa i profilaksu ovih multilirajućih događaja nastalih intrauterino ili u ranoj novorođenačkoj dobi.

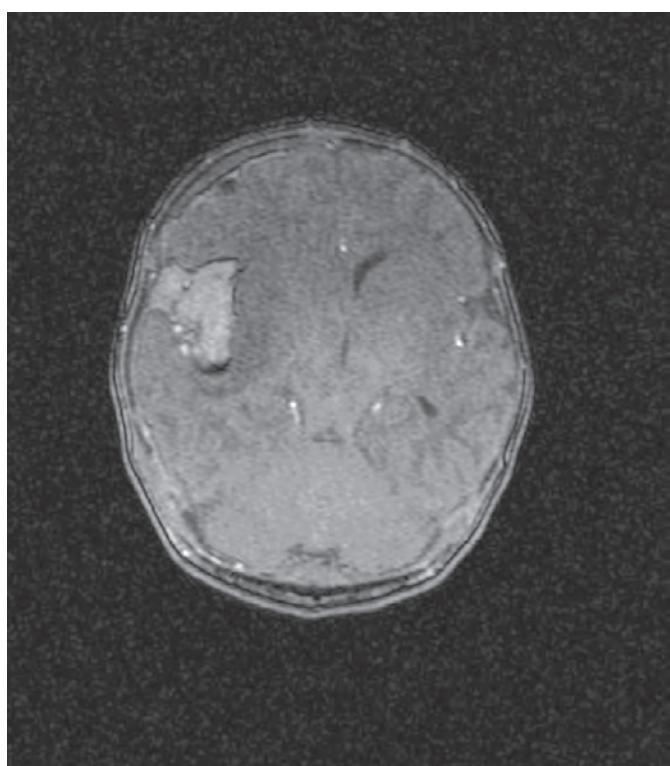
Prikaz bolesnika

Dijete je rođeno iz 1. uredne trudnoće i poroda, rodne mase RM 2850 g, dužine 49 cm i Appgar Score 10. Otpušten iz rodilišta zajedno s majkom urednog kliničkog statusa.

Prvi put je boravilo na Klinici za dječje bolesti KBC-a Split u jedinici intenzivnog liječenja djece (JILD) od 27.06.2010. - 07.07.2010. godine kao novorođenče staro 15 dana zbog konvulzivnog napada. Bio je blijed, marmorizirane kože i hladnih okrajina uz diskretni makulozni osip po potkoljenicama. Ostali klinički status je bio neupadan. Majka je bila zdrava, a anamnestički podaci o ocu su bili nepoznati. Učinio se MSCT mozga koji je pokazao subarahnoidalnu i intracerebralnu hemoragiјu desno silvično temporoparietalno okruženu uskom zonom edema s kompresivnim efektom na desnu postraničnu klijetku i subfalksnom hernijacijom mediosagitalnih struktura za cca 8 mm (Slika 1.). MR-angiografija cerebralne cirkulacije u TOF tehniци pokazala je sporu cirkulaciju ili spazam desne a. cerebri anterior te veliki hematotoksočni krvarenje u okolici fissure Sylvii koji lučno potiskuje velike ogranke a. cerebri medije.

Dijagnosticirana je intrauterina tromboza. Neurokirurškim zahvatom je učinjena osteoplastična kraniotomija desno frontotemporalno i evakuacija hematomu. Postoperativni tijek bio je uredan.

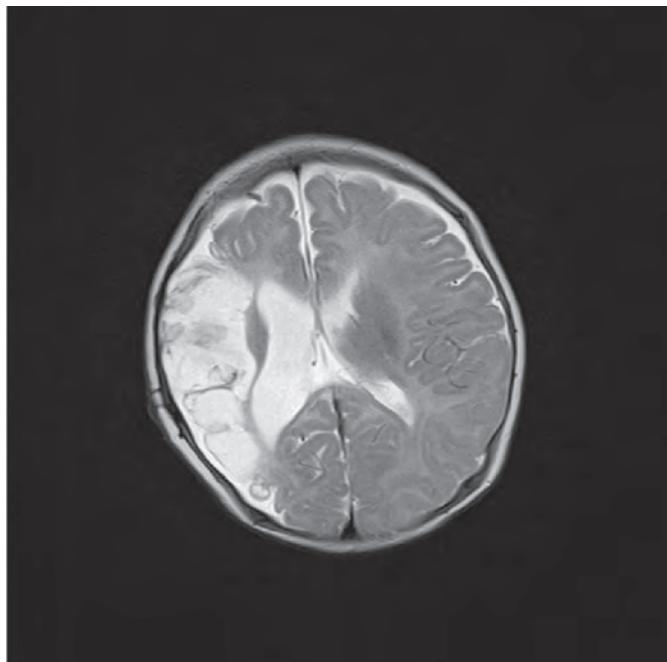
Slika 1. MSCT mozga - postinfarktno krvarenje: veliki hematotoksočni krvarenje u okolici fissure Sylvii.



Kontrolni nalazi

UZV mozga pokazao je desno frontalno, parijetalno i okcipitalno hiperehogenost mlječnog stakla uz stvaranje porencefalične šupljine 3 x 3 cm. Nakon toga se učinio MRI mozga koji je ukazao na rezidualni masivni postresorptivni hipodenzitet odnosno na porencefaličnu šupljinu u irigaciji desne a. cerebri mediaje (Slika 2., 3. i 4.).

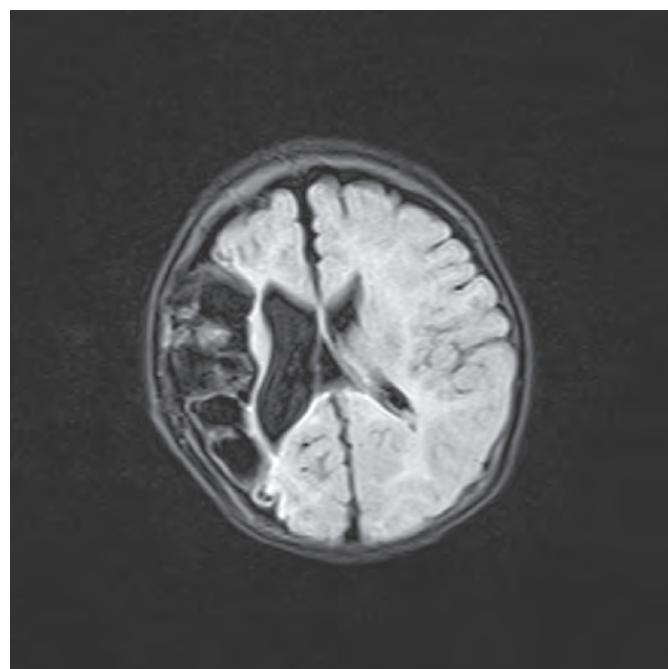
Slika 2. MRI mozga - hiperintenzivni signal u TI vremenu pokazuje cističnu encefalomalaciju.



Slika 3. MRI mozga - sagitalni presjek pokazuje masivnu leziju koja zahvaća temporoparietalni dio mozga desno.



Slika 4. MRI mozga - rezidualni masivni postresorptivni hipodenzitet - porencefalična šupljina u irigaciji desne a. cerebri medije.



Laboratorijski su dokazane snižene vrijednosti proteina C. EEG nalaz bio je uredan dok su ostali nalazi bili neupadni. Dijete je otpušteno pod dijagnozom hemoragičnog infarkta a. cerebri medije desno nerazjašnjene etiologije.

Iz neurološkog statusa pri otpustu za izdvojiti je lošu kontrolu glave pri testu trakcije uz asimetriju spontane motorike.

Sljedeća hospitalizacija djeteta je uslijedila je 27.7.2010. godine zbog neutješnog plača. Po prijemu EEG nalaz bio je specifično epileptogeno promijenjen te je u terapiju uveden valproat. UZV mozga bio je bez značajnih promjena od prethodne hospitalizacije. Prethodno registrirane niže vrijednosti proteina C bile su uredne.

Nakon toga je uslijedio prijem u studenome 2010. godine zbog kontrolnog MRI mozga koji je pokazao cističnu encefalomalaciju i fokalnu atrofiju.

Zbog ponavljajućih epileptičkih napadaja tipa infantilnih spazama dijete je ponovo primljeno 02.12.2010. godine. U međuvremenu je razvilo kontralateralnu hemiparezu kao posljedicu infarkta desne a. cerebri medije. U terapiju su uvedena tri anti-epileptika ali bez značajne redukcije napada i bez poboljšanja EEG-a koji je pokazivao hipsaritmiju. Uvedena je i terapija kortikosteroidima (tetracosactid) zbog koje je dijete razvilo nuspojave (kušingoidan izgled, hipertenzija, hipokalemija). Tijekom boravka u bolnici obolio je od influence tip H1N1 te je razvio akutni respiratorni distres sindrom (ARDS)

i desnostrani pneumotoraks te je strojno ventiliran. Od zadnjeg boravka u bolnici do danas dijete se redovno pratilo u ambulanti za neuropedijatriju.

Konzultiran je hematolog te je učinjena laboratorijska obrada.

Molekularna analiza gena za trombofiliju pokazala je: FV, FII i metilen-terahidro folat reduktaza (MTFHR) normalni tip gena, dok je gen za plazminogen aktivator inhibitor (PAI-1) pokazao insercijsko delecijski polimorfizam (4G/4G), a gen za angiotenzin konvertirajući enzim (ACE) delecijski genotip (DD).

U serumu PS 0.96, PC 0.83, homocistein 6.45 µmol/L (5.9–16), AT III 1.17 dok je PAI 1-aktivnost bila snižena 1.00 IU/ml.

Zaključak

Tromboembolijska bolest se događa u značajnom broju hospitalizirane djece (5.3/10.000 hospitaliziranih ili 0.07/10.000 djece), a mortalitet je 2.2% (5). Predominira u novorođenčadi i adolescenata. Cerebralna tromboza u novorođenačkoj dobi ili nastala intrauterino može uzrokovati teške neurološke sekvele i invaliditet djeteta. U literaturi ne nalazimo usvojene smjernice o primjeni i praćenju oralne preventivne antikoagulacijske terapije u djece.

Literatura:

1. Barnes C, Deveber G. Prothrombotic abnormalities in childhood ischaemic stroke. *Thromb Res.* 2006;118(1):67-74.
2. Leniček Krleža J. Laboratorijska dijagnostika trombofilije. *Paed Croat.* 2005;49(2):95-100.
3. Yager JY, Black K, Bauman M, Massicotte P. Cerebral venous thrombosis in newborns, infants and children. *Front Neurol Neurosci.* 2008;23:122-31.
4. Dlamini N, Billinghurst L, Kirkham FJ. Cerebral venous sinus (sinovenous) thrombosis in children. *Neurosurg Clin N Am.* 2010;21(3):511-27.
5. Andrew M, David M, Adams M, i sur. Venous thromboembolic complications (VTE) in children: first analyses of the Canadian Registry of VTE. *Blood.* 1994;83(5):1251-7.

Internacionalni registar za kroničnu mijeloičnu leukemiju u djece i adolescenata (I-CML-Ped Study)

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

Klinika za dječje bolesti KBC Split i Medicinski fakultet
Sveučilišta u Splitu
E-pošta: srdjana.culic@st.htnet.hr

Kronična mijeloična leukemia (KML) (engl. *Chronic Myeloid Leukemia, CML*) je vrlo rijetka bolest u pedijatrijskoj i adolescentnoj populaciji i iznosi oko 5% svih bolesnika s KML-om. Godišnja incidencija 1/1.000.000 djece. U literaturi nema dovoljno podataka o epidemiologiji, načinu prezentiranja bolesti i ishodu oboljenja. Zbog toga je teško organizirati klinička istraživanja kojima bi mogli uspostaviti utjecaj inhibitora tirozin kinaze (TKI) ili transplantacije krvotornih matičnih stanica (TKMS) na uspjeh liječenja. S obzirom na to da bi djeca ili adolescenti u kroničnoj fazi bolesti mogli primati TKI dugi niz godina trebalo bi definirati dugotrajne komplikacije primjene TKI-a (smanjeni rast, kardijalne i hepaticne komplikacije) u odnosu na TKMS (smanjeni rast, infertilitost, GVHD, metabolički sindrom, sekundarne maligne bolesti). Suttorp sa suradnicima preporučuje u inicijalnoj fazi liječenja u djece i adolescenata u kroničnoj fazi KML-a primjenu imatinib-a i nastavak terapijom održavanja ako je na primjenu imatinib-a dijete imalo dobar odgovor. U slučaju lošeg odgovora na imatinib ili relapsa nakon primjene druge generacije TKI-a preporučuje TKMS HLA identičnog donora (1,2).

S obzirom na hitnu potrebu za randomiziranim internacionalnim istraživanjima organiziran je pri BFM grupi Internacionalni registar I-CML-Ped Study sa ciljem evaluacije najbolje terapije pedijatrijske KML, kvalitetne obrade epidemioloških podataka, načina liječenja te uspjeha odnosno ishoda liječenja u ovoj populaciji.

Cilj I-CML-Ped Study je opisati kliničke i biološke karakteristike KML-a u bolesnika mlađih od 18 godina, odrediti prognostičke čimbenike, odrediti neposredne ili dugotrajne neželjene pojave liječenja, odrediti utjecaj primjene TKI-a na rast i razvoj pedijatrijskih bolesnika. Koordinatori studije će inicirati istraživanja, analizirati, prezentirati te publicirati rezultate. Nacionalni koordinatori će: uspostaviti nacionalni registar, prikupiti nalaze bolesnika iz svoje zemlje, slati nalaze u centar Clinical Investigation Centar u Univesity Hospital Poitiers, Francuska. Studija će trajati 5 godina, očekuje se 100 – 150 novih bolesnika godišnje. Finalna anali-

za svih podataka će se učiniti na kraju razdoblja od 5 godina upotrebom SAS softvera (SAS institute, CARY, NC, SAD). Ova internacionalna studija će se koristiti garantom Novartis kompanije. Pozvane su sve nacionalne pedijatrijske grupe da participiraju u ovoj studiji, da prijave bolesnike čija je bolest dijagnosticirana nakon siječnja 2000. godine. Studija je opservacijska i informirani pristanak roditelja je obavezan, a započeta je u siječnju 2011 godine. Rezultati dosadašnjeg istraživanja prikazani su u obliku postera na 54th ASH Annual Meeting and Exposition održanom u Atlanti u prosincu 2012. godine (Slika 1.).

Do srpnja 2012. godine registrirano je 200 bolesnika iz 9 zemalja, pretežno muške djece 59%, srednje dobi kod dijagnoze 11,6 godina. Najmlađi bolesnik imao je 8 mjeseci, a najstariji 18 godina, dok je samo 8% bolesnika bilo mlađe od 4 godine. Prema European Leukemia Net kriterijima kod dijagnoze 92% djece bilo je u kroničnoj fazi bolesti, 6% u akceleriranoj fazi, a 2% u blastičnoj fazi. Splenomegalija je registrirana u 76% bolesnika, a medijan veličine slezene bio je 8 cm (od 0 - 25 cm), dok je medijan broja leukocita bio $250 \times 10^9 / L$ (5–1037). Dodatne kromosomske aberacije u Ph+ stanicama nađene u 2,3% bolesnika. BCR-ABL translokacija u 100 bolesnika tipizirana je kao b3a2 u 51%, b2a2 u 40%, b3a2 + b2a2 u 7%, b2a3 u 2%. Medijan praćenja bio je 28 mjeseci (od 2 do 38 mjeseci). Petero bolesnika je umrlo. Zemlje koje participiraju za sada su: Francuska, Njemačka, Češka, Nizozemska, Kina, Poljska, Danska, Hrvatska, Belgija i Italija.

Specifične smjernice u dijagnostici i liječenju KML-a u djece još nisu određene. S obzirom na uspjeh liječenja u odraslih bolesnika imatinib se sada primjenjuje i u dječjoj populaciji. Za sada nemamo podataka o kasnim posljedicama ove primjene u djece pa su ovakvi internacionalni registri vrlo vrijedni zbog dugotrajnog praćenje većeg broja djece s KML-om. Ovaj projekt je značajan jer će pomoći kvalitetnoj izradi smjernica u dijagnostici i liječenju KML-a u pedijatrijskoj populaciji (3).

Instituts thématiques Inserm Institut national de la santé et de la recherche médicale

THE INTERNATIONAL REGISTRY FOR CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (CML) IN CHILDREN AND ADOLESCENTS (I-CML-Ped Study): OBJECTIVES AND PRELIMINARY RESULTS

International-BFM Study Group

Frederic Millot¹, Meinolf Suttorp², Joelle Guihot¹, Petr Sedlacek³, Eveline De Bont⁴, Chi Kong Li⁵, Krzysztof Kalwak⁶, Birgitte Lausen⁷, Culic Srdjana⁸, Marie-Françoise Dresse⁹, Andrea Biondi¹⁰, André Baruchel¹¹

1 Inserm CIC 0802, University Hospital, Poitiers, France; **2** Department of Pediatrics, University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden, Germany; **3** Department of Pediatric Hematology–Oncology, University Hospital Motol, Charles University, Prague, Czech Republic; **4** Children's Hospital, Groningen, The Netherlands; **5** Department of Pediatrics, Prince of Wales Hospital, Hong Kong, China; **6** Department of Pediatric Hematology Oncology and Transplantation, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland; **7** Department of Pediatrics, Rigshospitalet, University hospital, Copenhagen, Denmark; **8** Department of Pediatric Hematology Oncology Immunology and Medical Genetic, Split, Croatia; **9** Department of Pediatrics, CHR La Citadelle, Liège, Belgique; **10** Department of Pediatrics, University of Milano-Bicocca, San Gerardo Hospital, Monza, Italy; **11** Department of Hematology, Robert Debré Hospital, Paris, France.

MAIN OBJECTIVES:

- to describe the clinical and biological characteristics of CML in children and adolescents
- to identify prognostic factors in this age-group in order to optimize individual treatment choices
- to determine side effects and potential long term effects of tyrosine kinase inhibitors on growth and development

INCLUSION CRITERIA:

- patients less than 18 years at diagnosis
- CML diagnosed later than January 2000 whatever the treatment planned
- informed consent (patient and/or the legal guardians)

METHODOLOGY:

- a national representative is identified in each participating country
- pseudonymised data were collected by each national representative
- data were transferred to the international data base (CIC 0802 Inserm, Poitiers, France) according to regulatory authorities

PARTICIPATING COUNTRIES

200 patients registered from 10 countries since January 2011

RESULTS:

Patients characteristics at diagnosis		%
Gender	boys	59%
	girls	41%
Age (median)		11.6 yrs (range 8 months-17.5 yrs)
	< 4 years	8 %
Phase at diagnosis	Chronic	92%
	Accelerated	6%
	Blastic	2%
Sokal risk group (Sokal definition in pts < 45 yrs)		
	Low risk:	13%
	Intermediate risk:	33%
	high risk:	54%
Lansky Score	100	68%
	90	16%
	80	10%
	< 70	6%
Splenomegaly median below the costal margin		77% 11 cm (range: 1 to 25)
Leukocyte count		251x10 ⁹ /L (range: 5.2 to 1037)
Additional chromosome abnormalities in Ph+ cells		2.3%
BCR-ABL transcript type:	b3a2	51%
	b2a2	40%
	b3a2 and b2a2	7%
	b2a3	2%

Treatment

Treatment	No patients
Treatment without imatinib: Hydroxyurea, interferon (IFN) +/- cytosine arabinoside (AraC), chemotherapy, dasatinib, nilotinib	15 pts
Treatment with imatinib - imatinib front line - hydroxyurea before imatinib - IFN+AraC and switch to imatinib	165 pts 62 pts 89 pts 14 pts
Hematopoietic stem cell transplantation - within 1 year since diagnosis - more than 1 year after diagnosis	32 pts 23 pts 9 pts

Survival, cytogenetic responses and toxicity:
median follow-up time : 28 months (range, 2-138)
Five deaths recorded
Overall survival rate at 42 months : 97% (CI 95%, 91-99)
Cytogenetic response (75 assessable patients):
47 (63%) achieved complete cytogenetic response 12 months after the start of the treatment (imatinib: 43 pts, switch to dasatinib after imatinib failure: 3 pts, interferon + cytosine arabinoside: 1 pt).
Side effects reported in 93 patients receiving imatinib:
- 68% developed hematologic toxicities
- 97% developed non hematologic toxicities
most of the fully documented cases were grade 1-2 toxicities.

Conclusion

This is the largest study reporting on children and adolescents with CML in and out clinical trials
First results indicate that children-adolescents with CML presented with clinical and biological differences compared to adult patients.
Whether these differences translate into a different outcome still remains to be determined.

Funding: supported by a grant of Novartis Pharma Ltd

There are no relevant conflicts of interest to disclose

Slika 1. Poster koji prikazuje dosadašnje rezultate I-CML-Ped Study prikazane na 54th ASH Annual Meeting and Exposition Atlanta 2012.

Literatura:

1. Suttorp M, Yaniv I, Schultz KR. Controversies in the treatment of CML in children and adolescents: TKIs versus BMT? Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17(1 Suppl):S115-22.
2. Suttorp M, Millot F. Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010: use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010;2010:368-76.
3. Suttorp M, Eckardt L, Tauer JT, Millot F. Management of chronic myeloid leukemia in childhood. Curr Hematol Malig Rep. 2012;7(2):116-24.

Analiza mutacija u kinaznoj domeni fuzijskog gena BCR-ABL1 u bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom liječenih inhibitorima tirozin kinaze

Bojana Mohar¹, Miljenko Katunarić¹,
Irena Drmić Hofman², Blaženka Grahovac¹

¹ Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i KBC Rijeka

² Klinički bolnički centar Split i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Adresa autora za kontaktiranje.

Prof. dr.sc. Blaženka Grahovac

Laboratorij za molekularnu dijagnostiku

Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i KBC Rijeka

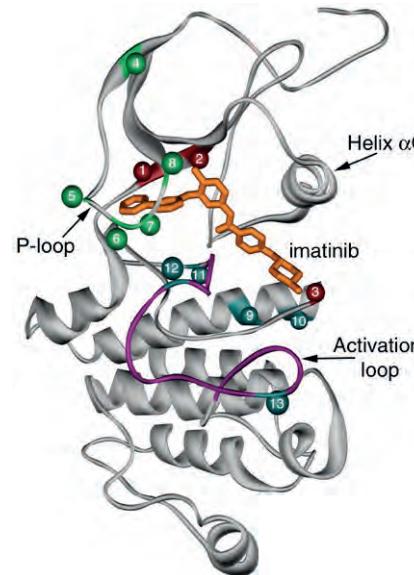
E-pošta: blazenka.grahovac@medri.hr

Uvod

Kronična mijeloična leukemija (KML) je klonalna bolest matičnih krvotvornih stanica i prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) ubraja se u mijeloproliferativne zločudne tumore (1). KML je prva humana neoplazija za koju je dokazana specifična stečena genetska lezija – recipročna t(9;22)(q34;q11) translokacija koja se prepoznaje kao skraćeni 22. kromosom nazvan Philadelphia (Ph) kromosom. U osnovi genetskog preuređenja je novonastali fuzijski gen BCR-ABL1 koji kodira fuzijski onkoprotein s konstitutivno aktiviranim tirozin kinazom koja u citoplazmi fosforilira niz staničnih proteina uključenih u regulaciju proliferacije, blokirajući apoptozu, neučinkovitu adheziju i genomsku nestabilnost. Liječenje kronične mijeloične leukemije bitno je napredovalo tijekom posljednjeg desetljeća, uvođenjem prve generacije inhibitora tirozin kinaze (TKI) - imatinib mesilata u kliničku praksu 1998/2000. godine. Imatinib selektivno inhibira ABL1 kinazu i inducira hematološku i citogenetsku remisiju. Međutim ubrzo je postalo evidentno da oko 20-40% pacijenata koji su liječeni imatinibom u prvoj liniji, razvijaju rezistenciju na terapiju. Studije su pokazale da je rezistencija na imatinib koja se očitovala u gubitku hematološkog, citogenetskog i molekularnog terapijskog odgovora uzrokovana u oko 90% slučajeva mutacijama u ABL1 kinaznoj domeni i u oko 10% slučajeva amplifikacijom BCR-ABL1 gena (2,3).

Rezistencija i smanjena osjetljivost na terapiju imatinibom

Već 2001. godine kod prvih imatinib-rezistentnih slučajeva, pokazano je kako točkaste mutacije u domeni kinaze (KD) BCR-ABL1 fuzijskog gena mogu narušiti ili čak potpuno onemogućiti vezanje imatiniba (Slika 1.) (4,5).

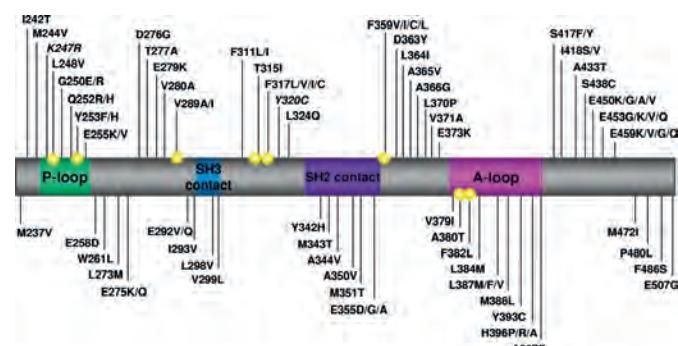


Struktura ABL kinazne domene s prikazom interpolacije imatiniba i lokalizacije mutacija odgovornih za rezistenciju ili smanjenu osjetljivost na liječenje imatinibom.

Pozicija br. 2 je pozicija mutacije T315I koja sprječava vezanje imatiniba u pukotinu ABL1 kinazne domene (imatinib = narandasti lanac).

Slika 1. Struktura ABL1 kinazne domene s prikazom mesta vezanja imatiniba. (Preneseno iz Talpaz et al. N Engl J Med. 2006;354:2531-41.)

Više od 60 različitih mutacija opisano je u radovima objavljenim od 2001-2009. godine, od čega 7 mutacija ukupno čine 85%, što pokazuje da su neke mutacije definitivno češće od drugih (5,6). Tijekom posljednjeg desetljeća mnogo je učinjeno u proučavanju bioloških i kliničkih značajki mutacija. Pokazano je da se ovisno o tipu aminokiseline koja je definirana određenom mutacijom, mijenja stupanj rezistencije/ osjetljivosti na terapiju imatinibom (Slika 2.).



Slika 2. Mapa mutacija (prikaz izmijenjenih aminokiselina, AK) u BCR-ABL kinaznoj domeni koje su identificirane u kliničkim uzorcima pacijenata rezistentnih na terapiju imatinibom.

P-loop: petlja u strukturi gdje se veže fosfatna grupa; **SH2 i SH3 contact:** kontaktna regija sa SH2 i SH3 domenama; **A-loop:** aktivirajuća domena.

Zvjezdice pokazuju AK pozicije koje su uključene u vezanje imatiniba. Podaci su prikupljeni iz 27 studija objavljenih između 2001. i 2009. (Preuzeto iz Soverini S et al. Blood. 2011;118(5):1208-1215.)

Inhibitori tirozin kinaze druge generacije

Ove spoznaje potaknule su razvoj novih TK inhibitora, od kojih su u kliničkoj primjeni dasatinib i nilotinib, tzv. TKI druge generacije, veće učinkovitosti u inhibiciji proliferacije BCR-ABL1 mutiranih varijanti (7).

Kliničko iskustvo u liječenju s dasatinibom i nilotinibom je pokazalo da puno uži spektar mutacija pokazuje neosjetljivost na te lijekove i da se te mutacije ne preklapaju. Izuzetak je mutacija T315I budući da izaziva rezistenciju (neosjetljivost) na sva tri lijeka (Tablica 1).

Mutacije smanjene osjetljivosti na nilotinib	Mutacije smanjene osjetljivosti na dasatinib
T315I*	T315I*
Y253H	T315A
E255K/V	F317L/V/I/C
F359V/C/I	V299L

Tablica 1. Mutacije rezistentne* i smanjene osjetljivosti na terapiju nilotinibom i dasatinibom (6).

Kako je sve više terapijskih mogućnosti dostupno pacijentima koji ne postignu optimalan odgovor na imatinib, analiza mutacija u kinaznoj domeni BCR-ABL1 fuzijskog gena je važan i koristan podatak za liječnike u donošenju odluke o najboljoj terapijskoj strategiji za svakog pojedinog pacijenata. Terapijske opcije su sljedeće: povećanje doze imatiniba, primjena lijeka druge generacije TKI - nilotiniba ili dasatiniba, transplantacija hematopoetskih matičnih stanica kada je u pitanju mutacija T315I, ili pokušaj liječenja eksperimentalnim lijekom. Međutim, treba imati na umu da osim prisutnosti mutacija postoje i drugi mehanizmi rezistencije na TKI koje nije jednostavno detektirati, tako da svaki neuspjeh terapije treba pažljivo procjenjivati.

Nekoliko je značajnih pitanja na koja treba dati odgovor kako bi se pomoglo liječnicima u kliničkoj primjeni podataka o BCR-ABL1 mutacijama:

1. Kada treba zatražiti analizu mutacija?
2. Koje metode analize su najpogodnije?
3. Kako podatke o mutacijama koristiti u kliničkoj praksi?

Preporuke stručnjaka imenovanih od strane European Leukemia Net (ELN) grupacije, koje imaju za cilj racionalno korištenje testiranja BCR-ABL mutacija u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji su navedene u Tablicama 2. i 3.

Preporuke European Leukemia Net (ELN) ekspertne grupe

ANALIZA MUTACIJA U BCR-ABL1 fuzijskom genu

1. Prilikom postavljanja dijagnoze

- samo u ubrzanoj fazi bolesti/blastnoj krizi (AP/BC)

2. Tijekom 1. linije terapije imatinibom

- neuspjeh terapije
- povećanja omjera kopija bcr- abl/abl s naznakama gubljenja velikog molekularnog odgovora (MMR)
- suboptimalni terapijski odgovor

3. Tijekom 2. linije terapije (nilotinib/dasatinib)

- gubitak hematološkog ili citogenetskog odgovora

- Pozitivan rezultat upućuje na promjenu terapije
- Tip mutacija značajan je za odabir TKI

Tablica 2. Preporuke European Leukemia Net (ELN) ekspertne grupe: Algoritam za analizu mutacija u BCR-ABL1 kinaznoj domeni u KML pacijenata liječenih inhibitorima tirozin kinaze. (Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE et al. Blood. 2011;118(5):1208-1215.).

TIP MUTACIJE	PREPORUKA ZA TERAPIJU
T315I	Transplantacija hematopoetskih matičnih stanica ili eksperimentalna terapija
V299L, T315A, F317L/V/I/C	Preporučuje se terapija s nilotinibom
Y253H, E255K/V, F359V/C/I	Preporučuje se terapija s dasatinibom
Ostale mutacije	Preporučuje se povećanje doze imatiniba, ili uvođenje TKI druge generacije - nilotiniba ili dasatiniba

Tablica 3. Alternativne terapijske opcije temeljene na statusu BCR-ABL1 KD mutacija (Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE et al. Blood. 2011;118(5):1208-1215.).

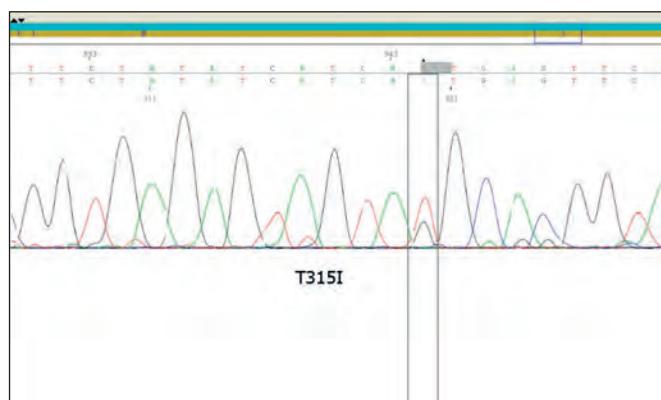
Metode za analizu mutacija

Prema preporukama ekspertne grupe ELN-a iz 2011. (6) metoda direktnog sekvenciranja je metoda izbora. U primjeni su i druge metode (ASO-PCR - Alel specifični PCR; pirosekvenciranje, metoda subkloniranja i sekvenciranja, fluorescentni alel specifični PCR) koje imaju veću osjetljivost, od 0,01 do 5%. Međutim, retrospektivne studije provedene kod pacijenata pri dijagnozi ili u kompletном citogenetskom odgovoru su pokazale da mutacije prisutne u vrlo malom broju Ph+ stanica ne moraju nužno biti

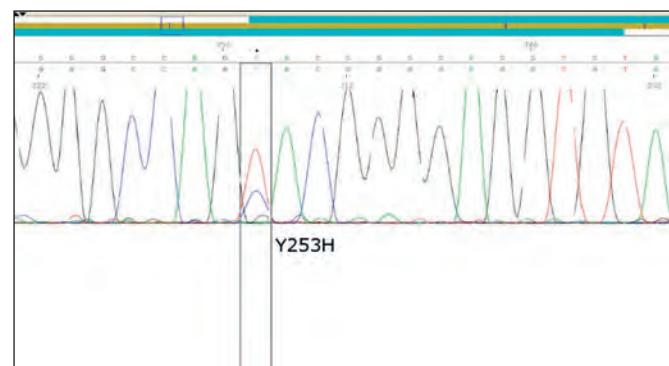
terapijski selektirane i da nalaz mutacija ne korelira s neuspjehom terapije (7-9). Metodom direktnog sekvenciranja postiže se osjetljivost detekcije mutacija prisutnih u 10 do 20% Ph+ stanica, što zadovoljava važeće spoznaje o biodinamici i utjecaju mutiranih klonova na hematopoezu.

Svakako treba istaknuti da je područje analize mutacija i njihovog kliničkog značaja vrlo dinamično, posebno u svjetlu najnovijih tehničkih mogućnosti koje pružaju uređaji nove generacije sekvencera. Oni će vrlo brzo omogućiti tzv. "deep sequencing" analize mutacija podižući osjetljivost detekcije mutacija u granično područje "deep molecular response". Budućnost i studije koje su u tijeku, pokazat će relativno brzo značaj novih mogućnosti analize mutacija za kliničku praksu.

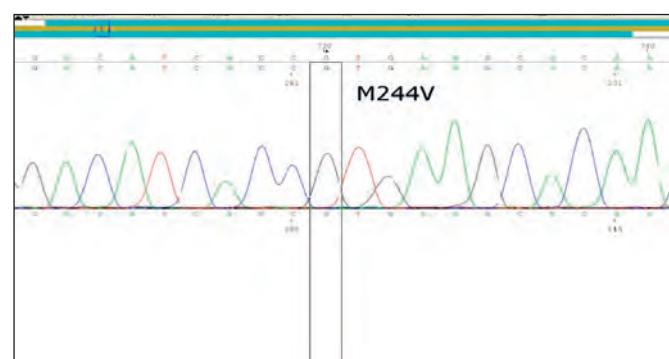
U prilogu je predstavljeno nekoliko informativnih rezultata sekvencijskih analiza mutacija (Slike 4., 5. i 6.), kao i zbirne tablice s rezultatima analiza mutacija i tipa transkripta za prvu grupu pacijenata za koje je indicirana analiza BCR-ABL1 KD mutacija (Tablice 4. i 5.).



Slika 4. Sekvencijska analiza s prikazom pozicije točkaste mutacije 1308 C>T, koja formira promjenu aminokiseline T315I. Prikaz ima i semikvantitativnu vrijednost jer se uočava da je prisutno oko 50% kloni s mutacijom T315I u odnosu na divlji tip (uokvireni crni pik u odnosu na crveni pik na prikazu).



Slika 5. Sekvencijska analiza s prikazom pozicije točkaste mutacije 1121 T>C, koja formira promjenu aminokiseline Y253H. Prikaz ima i semikvantitativnu vrijednost jer se uočava da je prisutno oko 40% kloni s mutacijom Y253H u odnosu na divlji tip (uokvireni plavi pik u odnosu na crveni pik na prikazu).



Slika 6. Sekvencijska analiza s prikazom pozicije točkaste mutacije 1094 A>G, koja formira promjenu aminokiseline M244V. Na prikazu je uočljivo dominantno prisustvo kloni s mutacijom M244V. (uokvireni crni pik na prikazu).

Broj pacijenata - ukupno	15	
Pacijenti s mutacijama	6	
Jedna mutacija	5	
Više mutacija	1 (ukupno 3 mutacije)	
Tip mutacija	5 poznatih	G 250 E M 244 V T 315 I F 359 V Y 253 H
	1 - bez podataka o kliničkoj značajnosti	N 499 S

Tablica 4. Analiza mutacija metodom sekvenciranja u skupini od 15 bolesnika.

Broj pacijenta	ABL1 mutacija	Tip transkripta
Pacijent 1	G250E	B2a2 + B3a2
Pacijent 2	M244V	B2a2 + B3a2
Pacijent 3	T315I	B2a2
Pacijent 4	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + B3a2
Pacijent 5	F359V 03. 04. 2012 Y253H 03. 04. 2012 F359V 26.09. 2012. G250E 26.09. 2012. Y253H 26. 09. 2012.	B2a2 B2a2 + B3a2
Pacijent 6	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + B3a2
Pacijent 7	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + B3a2
Pacijent 8	Nisu utvrđene mutacije	B3a2
Pacijent 9	Nisu utvrđene mutacije	B2a2
Pacijent 10	Nisu utvrđene mutacije	B2a2 + B3a2
Pacijent 11	N499S – klinički nepoznate značajnosti	B3a2
Pacijent 12	Nisu utvrđene mutacije	B3a2

Tablica 5. Rezultati analize mutacija i tipa transkripta u skupini 12 KML bolesnika.

Zaključak

Optimizacija KML terapije je kontinuiran proces. Nova saznanja i terapijski algoritmi vezani za primjenu nilotiniba i dasatinib-a u prvoj liniji terapije zahtjevati će nove kliničke procjene značaja BCR-ABL KD mutacija. U kojoj mjeri će se mijenjati naši stavovi i terapijski pristupi u svjetlu neslućenih potencijala nove generacije sekvencera koji će omogućiti detekcije mutacija na granici dubokog molekularnog odgovora? I kakve će utjecaje imati ta nova saznanja na krajnji cilj liječenja KML – remisiju bez terapije, pokazat će vrijeme.

Uloga analize mutacija i dalje je značajna; nalaz bilo koje mutacije je znak genetske nestabilnosti, a utvrđivanje specifičnog tipa mutacija ima neposredni utjecaj na izbor TKI terapije (Tablica 6.).

Terapija s TKI nove generacije (nilotinib, dasatinib) u 1. liniji

– kada tražiti mutacije ?

Kriteriji za analize mutacija u slučaju nepostizanja odgovarajućeg terapijskog odgovora:

1. BCR-ABL > 10% (manje od parcijalnog citogenetskog odgovora) nakon 3 mjeseca terapije?
2. BCR-ABL > 1% (manje od kompletног citogenetskog odgovora) za 6 mjeseci ?
3. Gubitak molekularnog odgovora u dva uzastopna testiranja (u razmaku od 3 mjeseca), uz slijedeće nalaze:
 - razlika veća od 0,5 log
 - jedan test > 1,0% ?

Tablica 6. Preporuka za razmišljanje predstavljena na skupu u Helsinkiju CML Goals 2013 (predavanje dr. Simona Soverini, Bologna, Italija).

Literatura:

1. Sertić D, Labar B, Zadro R, Kušec R, Grahovac B et al. Nove dijagnostičke preporuke za Philadelphia pozitivnu kroničnu mijeloičnu leukemiju – prijedlog radne skupine KROHEM-a za KML. Bilten Krohema 2012; vol. 4(br. 2): 18-23.
2. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 2001;293(5531):876-880.
3. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (ST1571) therapy. Leukemia. 2002;16(11):2190-2196.
4. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (ST1571) resistance. Blood. 2002;99(9):3472-3475.
5. Branford S, Melo JV, Hughes TP. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation really matter? Blood. 2009;114:5426-5435.
6. Soverini S, Hochhaus A, Nicolini FE, et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. Blood. 2011;118(5):1208-1215.
7. Ernst T, Gruber FX, Pelz-Ackermann O, et al. A co-operative evaluation of different methods of detecting BCR-ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia on second-line dasatinib or nilotinib therapy after failure of imatinib. Haematologica 2009;94(9):1227-1235.
8. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. Dasatinib in Imatinib-resistant Philadelphia Chromosome-positive leukemias. N Eng J Med. 2006;354:2531-2541.
9. Hughes T, Saglio G, Branford S, et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. J Clin Oncol. 2009;27(25): 4204-4210.

Imunonefelometrijsko određivanje monoklonskog proteina

**Dragana Šegulja¹, Danica Matišić¹, Josip Batinić²,
Damir Nemet²**

¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb

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

Adresa autora za kontaktiranje:

Dragana Šegulja, mag. med. biokem.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb

E-pošta: dsegulja@kbc-zagreb.hr

Sve imunokemijske metode temelje se na reakciji između antiga i antitijela pa precipitacija nastalih netopivih kompleksa u zoni ekvivalencije, čini osnovu za mjerjenje koncentracije antiga u većini neposrednih imunokemijskih tehniki. Za razliku od posrednih imunokemijskih metoda, koje koriste različite obilježivače, zamućenost otopine zbog nastalog kompleksa antiga i antitijela može se kod neposrednih imunokemijskih metoda mjeriti imunoturbidimetrijski gdje mjerimo apsorpciju svjetla ili imunonefelometrijski gdje mjerimo intenzitet rasapa svjetla. Danas raspoloživi nefelometri mogu mjeriti intenzitet rasapa svjetla u odnosu na smjer početne zrake, pod kutem od 13-24°. Osjetljivost imunonefelometrije je nešto veća od imunoturbidimetrije i iznosi 1-10 µg/mL.

Razvojem analizatora za turbidimetrijsko i nefelometrijsko praćenje imunokemijskih reakcija, u laboratorijskoj medicini razvile su se suvremene vrlo osjetljive metode za određivanje koncentracija proteina.

Od 2009. godine dostupan je reagens, poliklon sko ovčje antitijelo, usmjereni na epitope u području konstantne regije imunoglobulina (Ig). Ciljni epitopi su dio veznog mjesta teškog i lakog lanca imunoglobulina čime je omogućeno razlikovanje lako (kapa i lambda) lanaca uz isti teški lanac (gama, alfa, mi). Tako je danas moguće imunonefelometrijski odrediti koncentraciju IgG kapa, IgG lambda, IgA kapa, IgA lambda, IgM kapa i IgM lambda tipa.

Naše ispitivanje obuhvatilo je 20 bolesnika Zavoda za hematologiju KBC Zagreb kojima je imunoturbidimetrijski određena koncentracija ukupnih imunoglobulin A, G i M. Nakon razdvajanja proteina u serumu kapilarnom zonskom elektroforezom denzitometrijski su određeni gama globulini te imunofiksacijom tipiziran monoklonski protein (M-

protein). Nakon određivanja razreda i tipa M-proteina odredili smo imunonefelometrijski koncentraciju odgovarajućeg monoklonskog imunoglobulina i njegovog izotipa te ih stavili u omjer (Ig'kapa, Ig'lambda, Ig'kapa/lambda).

Kod svih bolesnika koncentracije ukupnih imunoglobulina nisu bile usporedive sa onima određenim nefelometrijski, što je vjerojatno posljedica različitosti upotrebljenih metoda i još uvjek nedovoljne standardizacije imunokemijskih metoda. Denzitometrijski je iz elfelograma bilo moguće kvantificirati M-protein samo u slučaju kada se M-protein nalazio u području gama globulina i uz supresiju sinteze ostalih imunoglobulina. Kada je detektirani M-protein bio IgA razreda, koji najčešće nalazimo u području beta globulina, zajedno sa transferinom i C3 komponentom komplementa, denzitometrijski nalaz nije se pokazao korisnim. Međutim, omjeri Ig'kapa/Ig'lambda kod svih su bolesnika s dokazanim M-proteinom bili izvan referentnog raspona koji proizvođač preporučuje što ukazuje da bi omjer Ig'kapa/Ig'lambda mogao biti dobri pokazatelj klonalnosti.

Naše iskustvo potvrđuje da je imunofiksacija „zlatni standard“ u detekciji i tipizaciji monoklonskog proteina te da imunonefelometrijsko određivanje koncentracije M-proteina može pomoći u praćenju bolesnika sa M-proteinom.

Literatura:

1. Keren DF. Heavy/Light-Chain Analysis of monoclonal gammopathies. Clin Chem 2009;55:1606-1608
2. Bradwell A, Harding S, Fourrier N et al. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'kapa/Ig'lambda ratios in multiple myeloma patients. Leukemia advance online publication, 3 August 2012, doi:10.1038/leu2012.159
3. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med. 2006;354:13
4. Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P, et al. Automated multi-capillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. Clin Chem. 2003;49:1909-1915
5. Bossuyt X, Bogaerts A, Schietekatte G, et al. Detection and classification of paraproteins by capillary immunofixation/subtraction. Clin Chem. 1998;44:760-764.
6. Henskens Y, de Winter J, Pekelharing M, et al. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. Clin Chem. 1998;44:1184-1190.

Indikacije, način prikupljanja i liječenje transfuzijama granulocita – preporuke KROHEM-a

Ines Bojanić¹, Sanja Mazić¹, Branka Golubić Ćepulić¹, Maja Tomičić², Irena Jukić², Mirta Mikulić³, Njetočka Gredelj Šimec⁴, Radovan Vrhovac⁵

¹ Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb

² Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

³ Registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih maticnih stanica, KBC Zagreb

⁴ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KB Merkur

⁵ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa autora za kontaktiranje:

Dr. sc. Ines Bojanić, dr. med.

Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb

E-pošta: ines.bojanic@kbc-zagreb.hr

Uvod

Unatoč primjeni suvremenih antimikrobnih lijekova infekcije i dalje vitalno ugrožavaju neutropenične bolesnike. Transfuzije koncentrata granulocita u neutropeničnih bolesnika primjenjuju se međutim izuzetno rijetko. Dugogodišnja zapostavljenost transfuzija granulocita posljedica je dostupnosti učinkovitijih antimikrobnih lijekova te rekombinantnih citokina i čimbenika rasta koji potiču mijelopoezu, kao i nedovoljnog broja granulocita u pripravcima koji su se nekad dobivali iz krvi nestimuliranih davatelja. Međutim, danas su na raspolaganju kvalitetniji pripravci dobiveni leukaferezom koji sadrže velik broj granulocita prikupljenih iz krvi davatelja stimuliranih G-CSF-om i kortikosteroidima, što je obnovilo interes za transfuzije granulocita (1, 2). Granulociti dobiveni aferezom za razliku od pripravaka proizvedenih iz trombocitno leukocitnog međusloja “buffy coat”-a omogućuju transfuziju više od $1,5 \times 10^8/\text{kg TT}$ što je praćeno boljim kliničkim ishodom, sadrže manji volumen eritrocita i izlažu bolesnika manjem broju davatelja (3, 4). Primjena G-CSF u davatelja stimulira stvaranje, diferencijaciju i funkciju mijeloidnih stanica te smanjuje apoptozu granulocita, a u kombinaciji s kortikosteroidima mobilizira 75% zrelih neutrofila iz koštane srži (5). Granulociti mobiliziranih davatelja imaju *in vitro* normalnu baktericidnu i kemo-taktičnu aktivnost, povećanu fungicidnu aktivnost i pojačan oksidativni metabolizam – respiracijski prasak (5-7).

Većina studija ukazuje kako se pozitivan učinak na infekciju može očekivati kod transfuzije granulocita od $1,5-3 \times 10^8/\text{granulocita po kg tjelesne težine (TT)}$ bolesnika (8, 9). Nakon transfuzije, broj granulocita u perifernoj krvi se može povećati gotovo do

normalnih vrijednosti i zadrži se do 24 sata. Budući da granulociti moraju biti transfundirani veoma brzo nakon prikupljanja, nije moguće organizirati zalihu iz kojih bi se mogli odabrati podudarni pravci. Transfuzije granulocita se većinom primjenjuju terapijski kod postojećih infekcija koje ne reagiraju na antimikrobno liječenje, ali i profilaktički tijekom razdoblja postkemoterapijske neutropenije kao sekundarna profilaksa kod bolesnika koji su već liječeni zbog invazivne gljivične infekcije (10). Rezultati istraživanja provedenih posljednjih 10 godina pokazuju da su terapijske transfuzije granulocita učinkovite kod bakterijskih infekcija, dok su opsežne gljivične infekcije rezistentne čak i na velike doze granulocita (2, 6, 7, 9, 11). Jedino do sada provedeno kontrolirano randomizirano istraživanje prekinuto je prije vremena zbog premalog broja bolesnika, budući da vitalno ugroženi bolesnici iz etičkih razloga nisu bili randomizirani već su bili liječeni transfuzijama granulocita (12). Prema NCCN v 2012 smjernicama transfuzija granulocita je svrstana u kategoriju 2B za liječenje životno ugroženih bolesnika s vjerojatnom ili dokazanom invazivnom gljivičnom infekcijom ili sepsom uzrokovanom gram negativnim štapićima koji nisu odgovorili na adekvatnu antibiotsku terapiju (13). U trenutku pisanja ovog teksta, u tijeku je velika prospektivna randomizirana klinička studija (RING study: Resolving Infection in People with Neutropenia) koja ispituje učinkovitost transfuzije velikih doza granulocita (14).

Indikacije

1. Terapijske transfuzije granulocita

- 1.1. Terapijske transfuzije granulocita su indicirane samo za bolesnike s teškom neutropenijom koji ispunjavaju sve navedene kriterije:
 - teška neutropenija, definirana kao broj neutrofila $< 0,5 \times 10^9/L$ koja će vjerojatno trajati dulje od 5 dana
 - dokazana ili suspektna invazivna gljivična ili bakterijska infekcija koja ugrožava život bolesnika, a ne odgovara na primjenu adekvatnih antimikrobnih lijekova tijekom 72 sata
 - bolest koja je uzrokovala neutropeniju aktivno se liječi i ima dobru dugoročnu prognozu te se ubrzo očekuje oporavak mijelopoeze.
- 1.2. Terapijske transfuzije granulocita mogu biti indicirane za bolesnike s dokazanim prirođenim poremećajem funkcije neutrofila, bez obzira na broj neutrofila, koji imaju dokazanu ili suspektnu invazivnu gljivičnu ili bakterijsku infekciju koja im ugrožava život, a ne odgovara na primjenu adekvatnih antimikrobnih lijekova tijekom 72 sata.

2. Profilaktičke transfuzije granulocita

Minimalni kriteriji za profilaktičku transfuziju granulocita jesu:

- teška neutropenija, definirana kao broj neutrofila $< 0,5 \times 10^9/L$ koja će vjerojatno trajati dulje od 5 dana kod bolesnika koji su tijekom prethodnog liječenja za vrijeme neutropenije imali po život opasnu bakterijsku ili gljivičnu infekciju, a primili su kemoterapiju nakon koje su izloženi velikom riziku ponovnog razvoja iste
- bolest koja je uzrokovala neutropeniju aktivno se liječi i ima dobru dugoročnu prognozu te se ubrzo očekuje oporavak mijelopoeze.

Budući da je proizvodnja koncentrata granulocita i njihova primjena rizična kako za davatelja tako i za primatelja, a dosadašnja izvješća nisu jasno potvrdila korist od profilaktičkih transfuzija granulocita, njihovu primjenu u ovoj indikaciji valja uvijek vrlo pažljivo razmotriti (10).

Kontraindikacije

Transfuzije granulocita su kontraindicirane kod:

- bolesnika sa zatajenjem koštane srži kod kojih se ne očekuje spontani oporavak neutrofila i ne planira se daljnje aktivno liječenje
- sepse u odsustvu neutropenije ili dokazanog prirođenog poremećaja funkcije neutrofila
- vrućice nepoznatog uzroka
- bolesnika koji su na mehaničkoj ventilaciji ili imaju teške respiratorne poremećaje.

Pripravci granulocita

Za transfuzije granulocita koriste se pripravci proizvedeni aferezom od stimuliranih davatelja kod kojih je cilj prikupiti više od 1×10^{10} granulocita ($1,5 \times 10^8/kg$ granulocita) ili za pedijatrijske bolesnike više od $2 \times 10^8/kg$ granulocita. Volumen pripravka granulocita je 300-400 mL, a sadrži od 1 do 10×10^{10} granulocita.

Koncentrat granulocita koji se proizvodi dvostrukim diferencijalnim centrifugiranjem iz trombocitno leukocitnog međusloja “buffy coat”-a zbog malog broja granulocita od 0,8 do 1×10^9 u pojedinačnoj dozi, velikog volumena eritrocita te mogućnosti nastanka HLA aloimunizacije nije pogodan za primjenu kod odraslih bolesnika te se može primijeniti samo za pedijatrijske bolesnike tjelesne težine do 5 kg.

Davatelji

Davatelji granulocita mogu biti članovi obitelji bolesnika ili nesrodnici davatelji koji su detaljno upoznati s rizicima povezanim s mobilizacijom i donacijom te su potpisali obaviješteni pristanak. U bolesnika kod kojih se planira liječenje alogenom transplantacijom su relativno kontraindicirani obiteljski davatelji zbog mogućnosti HLA imunizacije.

Odabir davatelja obuhvaća:

- klinički pregled davatelja
- RTG pluća i EKG
- laboratorijsko testiranje:
 - biljega krvlju prenosivih bolesti: hepatitis B, hepatitis C, HIV, sifilis, citomegalovirus
 - ABO i Rh(D) krvne grupe
 - HLA i antineutrofilnih protutijela.

Testiranje biljega zaraznih bolesti treba provesti dan prije donacije kako bi se granulociti mogli izdati na vrijeme.

Davatelji granulocita moraju:

- ispuniti zdravstveni upitnik i zadovoljiti kriterije propisane za davatelje homologne krvi (15).
- Zbog primjene lijekova za stimulaciju kod odabira davatelja osobitu pozornost treba обратити na prisustvo šećerne bolesti, ulkusne bolesti i srčanih bolesti
- biti ABO i Rh(D) podudarni s primateljem
- biti CMV negativni ako je primatelj CMV negativan
- biti negativni na HLA i antineutrofilna protutijela
- biti HLA podudarni samo ako je primatelj aloimuniziran na HLA antigene i u prethodnom liječenju je imao teške poslijetransfuzijske reakcije.

Mobilizacija granulocita

Mobilizacija granulocita u perifernu krv provodi se primjenom mijeloidnog čimbenika rasta G-CSF-a filgrastima u dozi od 300 mcg s.c. i deksametazona u dozi od 8 mg peroralno 12 sati prije svakog prikupljanja. Budući da do sada u zdravih davatelja nisu provedene studije primjene lijekova biosličnih filgrastimu, EBMT i WMDA ih ne preporučuju za mobilizaciju u zdravih davatelja (16). Za mobilizaciju se stoga smije koristiti samo originalni filgrastim.

Češće nuspojave primjene lijekova su:

- deksametazon: glavobolja, nesanica, glad, hipertenzija, hiperglikemija
- G-CSF: prolazna mišićno koštana bol, glavobolja, slabost
- makromolekularna otopina HES-a: svrbež.

Prikupljanje granulocita

Prikupljanje granulocita provodi se staničnim separatorom postupkom leukafereze. Za prikupljanje dovoljnog broja granulocita potrebno je pojačati sedimentaciju eritrocita što se postiže primjenom makromolekularne otopine HES-a. Leukaferezom se obradi 6-10 L krvi davatelja tijekom 3 sata.

Za jedan ciklus od 5 dana liječenja transfuzijama granulocita potrebno je osigurati više davatelja. Davatelj može dati granulocite 2 do 3 puta na tjedan. Iza donacije granulocita može nastaviti davati punu krv u redovnim razmacima: muškarci nakon 3 mjeseca i žene nakon 4 mjeseca. S obzirom na stimulaciju davatelja filgrastimom broj donacija granulocita treba ograničiti na najviše 3 donacije.

Prijettransfuzijsko ispitivanje

Zbog količine eritrocita u pripravku, granuloci moraju biti podudarni u ABO, Rh(D) i drugim krvnogrupnim antigenima na koje je primatelj imuniziran. Prije svake transfuzije obavezna je križna reakcija.

Primatelje granulocita treba testirati na prisutnost HLA protutijela i antineutrofilnih protutijela. U HLA imuniziranih primatelja treba tipirati HLA antigene i razmotriti primjenu granulocita od HLA podudarnih davatelja. Pronalaženje HLA podudarnih davatelja predstavlja ozbiljan organizacijski problem, a nema dokazane koristi primjene pripravaka koji nemaju antigen na koji je primatelj imuniziran (11). Stoga transfuzije HLA podudarnih granulocita treba ograničiti na bolesnike s HLA protutijelima kod kojih je dokazana refrakternost na transfuzije trombocita zbog HLA protutijela (tj. terapijski odgovor na HLA podudarne trombocita, a refrakternost na trombocite od slučajnih davatelja) i bolesnike koji su prethodno zbog HLA imunizacije imali teške transfuzijske reakcije (gušenje, transfuzijom uzrokovanu akutno zatajenje pluća (TRALI) i ili hipotenziju).

Tijekom liječenja transfuzijama granulocita ispitivanje HLA protutijela i antineutrofilnih protutijela treba ponoviti u slučaju pojave teške transfuzijske reakcije.

Transfuzija granulocita

Pripravak granulocita valja obavezno ozračiti s 25 Gy kako bi se spriječio nastanak reakcije transplantata protiv primatelja.

Zbog brzog gubitka funkcije stanica koncentrat granulocita se mora transfundirati što je prije moguće. Pripravak se do transfuzije pohranjuje na temperaturi od 20-24° C bez agitacije, a svaka 2 sata treba stanice lagano resuspendirati. Rok valjanosti pripravka granulocita je 24 sata.

Transfundira se kroz standardni set za transfuziju s filterom veličine pora 170-200 mcg. Transfuzija treba trajati 1 do 2 sata. Transfuzija granulocita mora biti od infuzije amfotericina B odvojena nekoliko sati.

Nuspojave

Tijekom primjene granulocita mogu se javiti sljedeće nuspojave (17):

- febrilne nehemolitičke transfuzijske reakcije
- transfuzijom uzrokovanu akutno zatajenje pluća (TRALI)

- imunizacija na HLA i neutrofilne antigene
- refrakternost na transfuzije trombocita.

Praćenje učinkovitosti transfuzija granulocita

Učinkovitost transfuzija granulocita se prati klinički i laboratorijski. Transfuzije granulocita se primjenjuju svakodnevno, a nakon 5 dana primjene potrebno je učiniti reevaluaciju bolesti i odlučiti o nastavku liječenja. Transfuzije granulocita se prekidaju kada dođe do:

- izlječenja infekcije
- oporavka funkcije koštane srži i povećanja broja granulocita $> 1 \times 10^9/L$ bez transfuzije
- pogoršanja kliničkog stanja usprkos transfuziji granulocita tijekom najmanje 5 dana
- pojave neprihvatljive toksičnosti transfuzije granulocita.

U bolesnika je potrebno mjesec dana nakon prestanka liječenja ponoviti testiranje HLA protutijela i antineutrofilnih protutijela kako bi se provjerilo jesu li se imunizirali transfuzijom granulocita.

Literatura:

1. Elebute M, Massey E, Benjamin S, et al. Clinical guidelines for the use of granulocyte transfusions 2011. <http://www.transfusionguidelines.org.uk/index.aspx?Publication=DL&Section=12&pageid=1336>.
2. Bux J, Cassens U, Dielschneider T, et al. Tolerance of granulocyte donors towards granulocyte colony-stimulating factor stimulation and of patients towards granulocyte transfusions: results of a multicentre study. *Vox Sang.* 2003;85:322-5.
3. Liles W, Rodger E, Dale D. Combined administration of G-CSF and dexamethasone for the mobilization of granulocytes in normal donors: optimization of dosing. *Transfusion.* 2000;40:642-4.
4. Leitner G, Panzer S, Reesink HW, et al. Preparation of granulocyte concentrates by apheresis. *Vox Sang.* 2010;98:567-75.
5. Dale D, Liles W, Llewellyn C, et al. Neutrophil transfusions, kinetics and functions of neutrophils mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone. *Transfusion.* 1988;38:713-21.
6. Worel N, Kurz M, Peters C, et al. Serial granulocytapheresis under daily administration of rhuG-CSF: effects on peripheral blood counts, collection efficiency, and yield. *Transfusion.* 2001;41:390-5.
7. Price T, Bowden R, Boeckh M, et al. Phase I/II trial of neutrophil transfusion from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2000;95:3302-9.
8. Adkins D, Spitzer G, Johnston M, et al. Transfusions of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized granulocyte components to allogenic transplant recipient, analysis of kinetics and factors determining posttransfusion neutrophil and platelet counts. *Transfusion.* 1997;37:737-48.
9. Peters C. Granulocyte transfusions in neutropenic patients: beneficial effects proven? *Vox Sang.* 2009;96:275-83.
10. Massey E, Paulus U, Doree C, et al. Granulocyte transfusions for preventing infections in patients with neutropenia or neutrophil dysfunction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 21;(1):CD005341.
11. Adkins D, Goodnough L, Shenoy S, et al. Effect of leukocyte compatibility on neutrophil increment after transfusion of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized prophylactic granulocyte transfusions and on clinical outcomes after stem cell transplantation. *Blood.* 2000;95:3605-12.
12. Seidel MG, Peters C, Wacker A, et al. Randomized phase III study of granulocyte transfusions in neutropenic patients. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:679-84.
13. Prevention and treatment of cancer related infections. NCCN Guidelines Version 1.2012 2012. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#supportive.
14. Dale DC, Price TH. Granulocyte transfusion therapy: a new era? *Curr Opin Hematol.* 2009;16:1-2.
15. Pravilnik o posebnim tehničkim zahtjevima za krv i krvne pripravke. Zagreb: Narodne novine 79/06; 2006.
16. Shaw BE, Confer DL, Hwang WY, et al. Concerns about the use of biosimilar granulocyte colony-stimulating factors for the mobilization of stem cells in normal donors: position of the World Marrow Donor Association. *Haematologica.* 2011;96:942-7.
17. Goldman J, Madrigal J, Pamphilon D. Possible harmful effect of short course granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Br J Haematol.* 2006;135:651-2.

Prevencija reaktivacije HBV infekcije u bolesnika liječenih zbog zločudnih hematoloških bolesti

Adriana Vince^{1,2}, Davorka Dušek¹, Igor Aurer^{2,3}

¹Klinika za infektivne bolesti Fran Mihaljević, Zagreb

²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,

KBC Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Adriana Vince, dr. med.

Klinika za infektivne bolesti Fran Mihaljević, Zagreb

i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: avince@bfm.hr

Hepatitis B (HBV) predstavlja veliki svjetski javnozdravstveni problem. Smatra se da je diljem svijeta 2 milijarde ljudi bilo izloženo virusu, a 350 milijuna ih je kronično inficirano. Hrvatska spada u zemlje s relativno niskom prevalencijom HBsAg nosilaštva u općoj populaciji (oko 0.5-1% stanovništva). HBV infekcija može dovesti do razvoja kroničnog hepatitisa, ciroze jetre i razvoja hepatocelularnog karcinoma. Budući da se radi o DNA virusu čiji genom u obliku ccc DNA ostaje trajno u jezgri hepatocita nakon infekcije, reaktivacija HBV infekcije je česta kod imunokompromitiranih osoba, uključujući bolesnike liječene zbog malignih hematoloških bolesti. Reaktivacija HBV infekcije može ugroziti život bolesnika, bilo zbog razvoja jetrene bolesti, bilo zato što se zbog hepatitisa mora odgađati terapija zločudne bolesti. Učestalost HBV reaktivacije ovisi o konstelaciji seroloških biljega (HBsAg, anti-HBc pozitivitet), viremiji te vrsti imunosupresivne terapije. Visoka viremija (HBV DNA > 10⁵ IU/mL), muški spol, upotreba kortikosteroidea, rituksimaba, antraciklina te kondicioniranje prije alogene transplantacije krvotvornih matičnih stanica važni su rizični čimbenici za HBV reaktivaciju. Iako je HBV reaktivacija najčešća kod HBsAg + bolesnika, moguća je i kod bolesnika koji su samo anti HBc+, pa čak i kod anti HBs+ bolesnika. Reaktivacija HBV infekcije može se prezentirati na različite načine - od asimptomatskog povišenja aminotransferaza i viremije pa sve do fulminantnog hepatitisa sa smrtnim ishodom. Podaci iz literature ukazuju da se reaktivacija HBV infekcije događa u oko 50% HbsAg+ bolesnika liječenih CHOP-om koji nisu primali nikakve antivirusne lijekove u usporedbi s manje od 10% onih koji su antivirusne lijekove dobili profilaktički. Zbog

toga je profilaksa reaktivacije HBV u ovih bolesnika standardan pristup u razvijenom svijetu pri čemu se koriste nukleozidni analozi (lamivudin, entekavir ili tenofovir).

Za nas su najrelevantnije preporuke EASL-a (*European Association for the Study of the Liver – European* društvo za istraživanje jetre). Članovi KROHEM-a smatraju da bi u Hrvatskoj trebalo postupati prema tim preporukama na način kako slijedi:

- Svim bolesnicima sa zločudnim hematološkim bolestima treba odrediti biljege infekcije virusom hepatitisa B (HBsAg i anti-HBc) prije započinjanja kemoterapije.
- Bolesnike koji su HBsAg- i anti- HBc- korisno je cijepiti protiv HBV-a.
- Bolesnicima koji su HBsAg+ ili antiHBc+ treba odrediti HBV viremiju.
- Svi HBsAg+ bolesnici moraju primati profilaksu nukleozidnim analogima ne čekajući nalaz viremije. Ukoliko se radi o bolesnicima s niskom viremijom (HBV DNA < 2000 IU/mL, odnosno 10 000 kopija/mL) kod kojih se planira kemoterapija koja neće trajati duže od 8-9 mjeseci (npr. CHOP), koristi se lamivudin 1x100 mg dnevno p.o. Kod HBsAg+ bolesnika koji imaju visoku viremiju (HBV DNA > 2000 IU/mL, odnosno 10 000 kopija/mL) ili kod kojih se planira dugotrajna kemoterapija (npr. terapija ALL), preporuča se profilaksa tenofovirom u dozi 1x300 mg p.o., odnosno entekavirom 1x0.5-1 mg p.o. Tijekom liječenja treba prije svakog ciklusa terapije kontrolirati transaminaze, a po mogućnosti i viremiju. Antivirusnu profilaksu je bitno provoditi tijekom cijele kemoterapije, kao i 12 mjeseci nakon završetka kemoterapije kako bi se izbjeglo pogoršanje bolesti nakon naglog ukidanja nukleozidnih analoga (engl. *withdrawal flare*).
- Bolesnicima koji su HBsAg-, a anti HBc+, treba inicijalno odrediti viremiju. Ukoliko takvi bolesnici imaju detektibilnu viremiju, postupak je isti kao kod HBsAg + bolesnika.
- Kod HBsAg-, a anti-HBc+ bolesnika koji nemaju detektibilnu viremiju, potrebno je tijekom kemoterapije redovito kontrolirati aminotransferaze (najmanje jednom mjesečno) te viremiju (svaka 3 mjeseca). Ukoliko viremija

tijekom praćenja postane detektabilna, odmah treba započeti profilaksu nukleozidnim analozima prije porasta aminotransferaza.

- Bolesnicima koji su HBsAg-, a antiHBc+, a kod kojih se planira transplantacija krvotvornih matičnih stanica se također preporuča antivirusna profilaksa.

Tablica 1. Prevencija reaktivacije HBV infekcije kod hematoloških bolesnika.

Kliničko-laboratorijska konstellacija	Postupak*
HBsAg +, niska viremija** i kraća kemoterapija	Lamivudin 1x100 mg
HBsAg+, visoka viremija ili dugotrajna kemoterapija	Tenofovir 1x300 mg ili Entekavir 1x0.5-1 mg
HBsAg-, anti-HBc+, prisutna viremija	postupak kao za HBsAg+
HBsAg-, anti-HBc+, nedetektibilna viremija na terapiji citostaticima i/ili rituksimabom	Uvesti terapiju kada poraste viremija (neki autori preporučuju lamivudin 100 mg)
HBsAg-, anti-HBc+, nedetektibilna viremija tijekom transplantacije KS/PBSCT	Lamivudin 1x100 mg ili tenofovir 1x300 mg kroz 6 mjeseci (eventualno nastavak profilakse u konzultaciji s infektologom)
HBsAg-, anti-HBc+, nedektabilna viremija na terapiji održavanja rituksimabom	Procjena individualnog rizika, kontrola aminotransferaza prije svakog ciklusa

* profilaksa se provodi tijekom kemoterapije te 12 mjeseci nakon završetka kemoterapije

** niska viremija <2000 IU/mL ili 10 000 kopija/mL

Literatura:

1. Lok AS, Liang RH, Chiu EK, Wong KL, Chan TK, Todd D. Reactivation of hepatitis B virus replication in patients receiving cytotoxic therapy. Report of a prospective study. Gastroenterology. 1991;100(1):182-8.
2. Hsu C, Hsiung CA, Su IJ, Hwang WS, Wang MC, Lin SF, Lin TH, Hsiao HH, Young JH, Chang MC, Liao YM, Li CC, Wu HB, Tien HF, Chao TY, Liu TW, Cheng AL, Chen PI. A revisit of prophylactic lamivudine for chemotherapy-associated hepatitis B reactivation in non-Hodgkin's lymphoma: a randomized trial. Hepatology. 2008;47(3):844-53.
3. Hoofnagle JH. Reactivation of hepatitis B. Hepatology 2009;49:S156.
4. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol. 2012;57(1):167-85.
5. Vigano M, Vener C, Lampertico P, Annaloro C, Pichoud C, Zoulim F, et al. Risk of hepatitis B surface antigen seroreversion after allogeneic hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 2011;46:125–131.
6. Evens AM, Jovanovic BD, Su YC, Raisch DW, Ganger D, Belknap SM, Dai MS, Chiu BC, Fintel B, Cheng Y, Chuang SS, Lee MY, Chen TY, Lin SF, Kuo CY. Rituximab-associated hepatitis B virus (HBV) reactivation in lymphoproliferative diseases: meta-analysis and examination of FDA safety reports. Ann Oncol. 2011;22(5):1170-80.

Uloga mikrookoliša u limfomu stanica plaštene zone

Ksenija Lučin, Manuela Avirović

Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Ksenija Lučin, dr. med.

Zavod za patologiju

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: ksenija.lucin@medri.uniri.hr

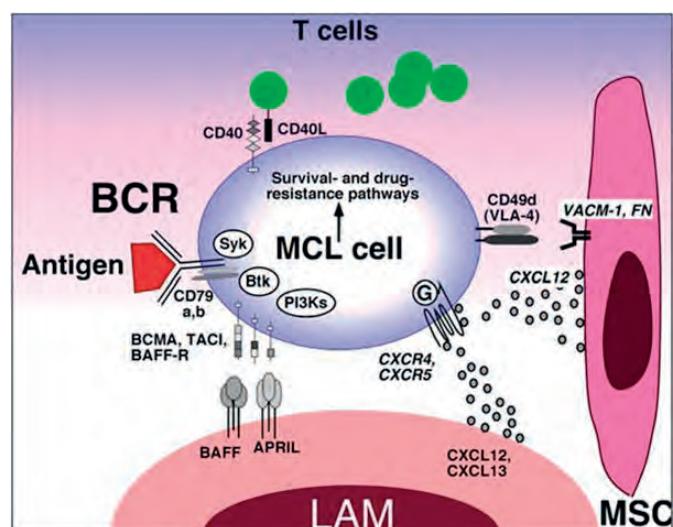
Limfom stanica plaštene zone (MCL, od engl. mantle-cell limfom) je ne-Hodgkinov limfom (NHL) perifernih limfocita B, a nastaje iz stanica plaštene zone, tj. pregerminalnih limfocita koji nisu bili u kontaktu s antigenom. Čini približno 4% svih NHL-a i javlja se većinom u muškaraca starijih od 50 godina. Ključna genetska promjena u patogenezi MCL-a je translokacija t(11;14) koja gen za ciklin D1 na 11. kromosomu smješta uz imunoglobulinski gen na 14. kromosomu i koja karakterizira "rani" MCL, a nagomilavanjem drugih genetskih promjena dolazi do progresije bolesti (1). Klasični oblik MCL-a karakteriziraju stanice monomorfnog izgleda koje su nešto veće od malih limfocita i imaju nepravilne jezgre, neupadljive nukleole i oskudnu citoplazmu (2). Rijetko stanice pokazuju morfologiju blasta ili su izrazito pleomorfne (blastoidna i pleomorfna varijanta). Način rasta je difuzni, nodularni te rast u području mantle zone. Imunofenotip stanica je CD20+, CD5+, CD23-, CD43+, CD10-, ciklin D1+. Klinički, radi se o neizlječivoj bolesti koja je najčešće u trenutku dijagnoze već prisutna u uznapredovalom stadiju bolesti sa zahvaćanjem limfnih čvorova, koštane srži i ekstranodalnih područja kao što je crijevo. Nakon terapije zaostaje minimalna rezidualna bolest koja čini osnovu za relapse. Srednje prezivljavanje iznosi 30-40 mjeseci. To je izrazito heterogena bolest s različito dugim prezivljavanjem bolesnika, a za sada Ki67 proliferacijski indeks čini jedini poznati prognostički čimbenik.

Translokacija t(11;14) je "unutrašnji" poremećaj koji potiče rast stanice i kod kojeg je narušena normalna regulacija ciklina pomoću mitogena limfocita B. Ipak, kada stanice MCL-a rastu u kulturi, one podliježu spontanoj apoptozi in vitro, što znači da čimbenici bitni za prezivljavanje stanice nisu "unutrašnji", već se nalaze u mikrookolišu i doprinose rastu i diseminaciji tumora (3). Također, u kokulturi sa stromalnim stanicama stanice MCL-a postaju otporne na konvencionalne lijekove, što govori u

prilog pretpostavke da se čimbenici bitni za progresiju MCL-a nalaze u mikrookolišu. Nedavna istraživanja bioptičkog materijala MCL-a s usporedbom stromalnih staničnih komponenti MCL-a i kliničkih parametara upućuju na to da bi razlika u staničnoj komponenti ne-neoplastičnog odjeljka MCL-a mogla činiti temelj heterogenog kliničkog ponašanja MCL-a (4).

Mikrookoliš čine stromalne stanice poput fibroblasta, folikularnih dendritičkih stanica, endotelnih stanica, makrofaga i limfocita T. On osigurava potporni milje, tzv. niše koje tumor opskrbljuju s nutrijentima i omogućuju preživljavanje stanica sprječavajući apoptozu te stvarajući imunološki privilegiran milje. Komunikacija tumorskih stanica i mikrookoliša odvija se pomoću kemokina i njihovih receptora te adhezijskih molekula, a ravnoteža među njima određuje da li će doći do promocije ili inhibicije rasta tumora.

Molekularni putevi "razgovora" B limfocita i mikrookoliša obuhvaćaju aktivaciju putem kemokinских receptora i adhezijskih molekula, signaliziranje putem receptora limfocita B (BCR, od engl. B-cell receptor), aktivaciju porodice TNF receptora (CD40) i aktivaciju putem Toll-like receptora i citokina (3). Izgleda da stanice MCL-a, kao i drugih ne-Hodgkinovih limfoma, koriste iste receptore i mehanizme interakcije sa svojim mikrookolišem (Slika 1.).



Slika 1. Stanične i molekularne interakcije između stanica MCL-a i mikrookoliša (preuzeto iz Burger JA and Ford RJ. Seminars Cancer Biol. 2011;21:308-312.).

Uloga receptora za kemokine i adhezijskih molekula

Kemokinski sustav čovjeka uključuje više od 40 kemokina i 18 kemokinskih receptora, a definira ga sposobnost da izaziva usmjereno kretanje stanica u smjeru gradijenta kemotaktičkog citokina (kemotaksija). Kemokini su obitelj malih secerniranih proteina koji se mogu podijeliti u 2 glavne potporodice ovisno o tome da li se 2 konzervirana cisteinska rezidua odvojena aminokiselinom (CXC) ili nisu (CC) (5). Kemokinski receptori prisutni su na različitim vrstama stanica. U početku su prepoznati na leukocitima, gdje je utvrđena njihova uloga u "homingu" na mesta upale. Zadnjih godina utvrđeno je da hematopoetske i nehematopoetske stanice ispoljavaju receptore za različite kemokine koji su konstitutivno izraženi unutar određenog mikrookoliša. Interakcije između receptora i njihovih kemokina pomažu u koordinaciji transporta i organizacije stanica unutar različitih tkivnih odjeljaka.

Transport limfocita između krvi i sekundarnih limfatičnih organa je proces koji je reguliran tkivno-specifičnom ekspresijom kemokina. Cirkulirajući limfociti su prolazno i reverzibilno u interakciji s vaskularnim endotelom pomoću adhezijskih molekula (selektini, integrini) u procesu koji se zove „rolling“ (2). Kasnije, kemokini na luminalnoj endotelnoj površini dovode do aktivacije integrina, što rezultira u zadržavanju, čvrstoj adheziji i transendotelnoj migraciji u tkiva gdje kemokinski gradijent usmjerava retrutiranje stanica. Te stepenice značajne su i za tumorske stanice poput stanica kronične limfocitne leukemije i MCL-a (3). Usprkos ranoj diseminaciji MCL-a, ekspresija i funkcija kemokinskih receptora i adhezijskih molekula u MCL-u slabo je istražena. Utvrđeno je da stanice MCL-a izražavaju visoku razinu CXCR4 i CXCR5 kemokinskih receptora i adhezijske molekule VLA-4 (CD49d) (6) pa se pretpostavlja da te molekule imaju ulogu u progresiji MCL-a, tj. širenju u limfne čvorove i koštanu srž. Mezenhimalne stanice ili stromalne stanice porijeklom iz koštane srži, koje čine veliki udio ne-neoplastičnih stanica unutar tumorskog mikrookoliša, konstitutivno luče kemokin SDF-1 ili CXCL12 (od engl. stromal-derived factor-1) (7). Djelujući putem svojeg receptora CXCR4 koji je izražen na hematopoetskim i nehemotopoetskim stanicama raka, ovaj ligand privlači tumorske stanice i promovira progresiju tumora direktnim i indirektnim mehanizmima. Kao prvo, CXCR4 je neophodan za širenje tumora u organe u kojima je CXCL12 izražen, kao što je koštana srž, koja omogućuje rast i preživljavanje

tumorskih stanica (pristup nišama s protektivnim učinkom). Drugo, CXCL12 može sam stimulirati preživljavanje i rast tumorskih stanica parakrinim putem, vežući se za CXCR4 na stanci MCL-a. Treće, CXCL12 može poticati tumorsku angiogenezu privlačenjem endotelnih stanica u tumorski mikrookoliš (7). U eksperimentima in vitro, Plerixafor, antagonist CXCR4 receptora nedavno odobren u terapiji mobilizacije autolognih matičnih stanica i Natalizumab, anti-VLA4 protutijelo odobreno u terapiji multiplog mijeloma, blokirali su interakcije između stanica MCL-a i mezenhimalnih stromalnih stanica. Očekuje se da će in vivo ovi lijekovi omotati adhezivne interakcije između tumorskih stanica i mikrookoliša, mobilizirajući ih iz tkivnih odjeljaka u krv i tako ih učiniti dostupnijim i osjetljivijim na konvencionalne lijekove.

Pored CXCR4 i VLA-4, opisani su i drugi kemokinski receptori i adhezijske molekule, uključujući CD44 koji je opisan kod većine slučajeva MCL-a (8). Ekspresija alfa4beta7 integrina tipično je udružena sa zahvaćanjem probavnog sistema, analogno mehanizmima "hominga" normalnih limfocita (9).

Uloga receptora za antigen limfocita B

Antigena stimulacija putem receptora za antigen limfocita B (BCR od engl. B cell receptor) prepoznata je kao ključan čimbenik koji potiče klonalnu ekspanziju nekih non-Hodgkin limfoma, uključujući i MCL (1). U stanica MCL-a primijećena je konstitutivna aktivacija SYK i PKC β II signalnih molekula koje se nalaze nizvodno od BCR-a. Novi usmjereni agensi koji interferiraju sa signaliziranjem putem BCR-a ušli su u kliničku fazu ispitivanja (3,10). Početna klinička testiranja dala su rezultate u bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom, MCL-om i drugim limfomima porijekla limfocita B.

Uloga akcesornih (stromalnih) stanica

Ekspresija CD40 molekule i odgovor na CD40 ligand (CD154) upućuje na to da su stanice MCL-a u interakciji sa CD154+ limfocitima T u tkivima, gdje takve interakcije mogu podržavati preživljavanje i rast stanica MCL-a. Stanični sastav mikrookoliša MCL-a nije sustavno istražen. U studiji B limfoma koja je uključivala malo slučajeva MCL-a opisano je prisustvo CD154+ limfocita T. Autori su opisali infiltraciju limfoma velikim brojem CD4+CD25+ T stanica koje izražavaju CTLA-4 i Foxp3 (intartumoralne regulatorne T stanice koje imaju imunosupresivnu ulogu), a koje su činile oko 17% stanica u biopsiji (11). Na stanicama MCL-a primijećena je po-

većana ekspresija CCL4 i CCL5 kemokina i 4-IBB liganda, uključenih u imunu regulaciju, a koji su u interakciji s limfocitima T i folikularnim dendritičnim stanicama (12). Ekspresija tih proteina upućuje na uključivanje stromalnih stanica iz mikrookoliša koje mogu utjecati na preživljavanje tumorskih stanica.

Interakcija stanica MCL-a i mezenhimalnih stromalnih stanica dovodi do povećane sekrecije BAFF-a (od engl. B-cell activating factor) i aktivacije kanonikalnog i ne-kanonikalnog NF- κ B signalnog puta. Uz mezenhimalne stromalne stanice BAFF luče i makrofagi i tzv. akcesorne stanice. Aktivacija NF- κ B signalnog puta sprječava spontanu apoptozu i apoptozu izazvanu lijekovima i tako doprinosi dužem preživljavanju tumorske stanice i povećanju tumorske mase. Nadalje, povećana sekrecija BAFF-a dovodi i do pojačane aktivnosti CXCL12 i CXCL13 liganda tj. pojačane kemotaktičke aktivnosti (13).

Uloga makrofaga

Uloga makrofaga u MCL-u slabo je istražena. Makrofagi se u tkivu tumora mogu polarizirati u 2 populacije s različitim fenotipom i oprečnim djelovanjem na rast tumora: jedna je populacija tzv. M1 makrofaga koja suprimira rast tumora i stimulira imunološki odgovor, a druga je populacija M2 makrofaga koja podržava angiogenezu, imunosupresiju, rast i metastaziranje tumora te lučenje čimbenika rasta tumorskih stanica (14). U MCL-u opisana je uloga makrofaga poput LAM-a (od engl. lymphoma-associated macrophages) u drugim limfomima, tj. veće prisustvo makrofaga udruženo je s agresivijim oblicima s više mitoza i blastoidnom morfolijom (15). U literaturi se navodi svega jedan rad koji je ispitao udruženost broja makrofaga u tkivu MCL-a i kliničkih parametara tj. preživljjenja bolesnika (4). Rezultati su pokazali ulogu LAM-a kao nezavisnog čimbenika slabijeg preživljavanja u bolesnika s MCL-om. U tom kontekstu treba spomenuti lučenje CXCL12 i CXCL13 od strane makrofaga, liganda koji se vežu za CXCR4 i CXCR5 receptore na tumorskim stanicama MCL-a u području gradijenta liganda i na taj način određuju kretanje tumorskih stanica.

Lijekovi koji "ciljaju" mikrookoliš nalaze se u određenim fazama kliničkih ispitivanja (3,16). Ti lijekovi blokiraju interakcije stanica limfoma i stanica u mikrookolišu ili blokiraju signaliziranje posredovano BCR-om u tumorskim stanicama. Ukoliko se preliminarni rezultati potvrde u većim kliničkim

studijama, novi lijekovi trebali bi proširiti spektar terapijskih mogućnosti i unaprijediti ishod bolesnika s MCL-om.

Literatura:

- Perez-Galan P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle-cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2010;117:26-38.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 2013. 9th Edition, Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Burger JA, Ford RJ. The microenvironment in mantle cell lymphoma: Cellular and molecular pathways and emerging targeted therapies. *Seminars Cancer Biol*. 2011;21:308-312.
- Farinha P, Opat S, Boyle M et al. Number of Lymphoma-Associated-Macrophages (LAM) Is An Independent Predictor of Survival in Patients with Mantle Cell Lymphoma (MCL). 2009. Presented at the 51st ASH annual meeting and exposition, New Orleans, LA. Abstract 3944
- Ward SG, Westwick J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem J*. 1998;333:457-470.
- Kurtova AV, Tamayo A, Ford RJ et al. Mantle cell lymphoma express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interaction with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*. 2009;113:4604-4613.
- Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006;107:1761-1767.
- Drillenburg P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*. 2000;95:1900-1910.
- Geissman F, Ruskone-Fourmestraux A, Hermine O et al. Homing receptor alpha4beta7 integrin expression predicts digestive tract involvement in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol*. 1998; 153:1701-5.
- Advani R, Sharman JP, Smith SM et al. Effect of Btk inhibitor PCI-32765 monotherapy on responses in patients with relapsed aggressive NHL: evidence of antitumor activity from a phase I study (abstract). *J Clin Oncol*. 2010;28 (15S): abstract 8012
- Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ et al. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107:3639-46.
- Ek S, Bjorck E, Hogerhorp CM et al. Mantle cell lymphomas acquire increased expression of CCL4, CCL5 and 4-IBB-L implicated in cell survival. *Int J Cancer*. 2006; 118:2092-2097.
- Medina DJ, Goodell L, Glod J et al. Mesenchimal stromal cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor κ B pathways. *Haematologica*. 2012; 97(8):1255-1263.
- Mantovani A. Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas. *Blood*. 2006; 108(2):408-409.
- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ et al. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997; 89:2067-78.
- Burger JA, Ghia P, Rosenwald A. The microenvironment in B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009; 114:3367-3375.

Mikrookoliš u kroničnoj limfocitnoj leukemiji

Gorana Aralica^{1,2}, Čedna Tomasović-Lončarić²,

Tajana Štoos-Veić², Ozren Jakšić^{3,4}

¹ Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

² Klinički zavod za patologiju Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb

³ Katedra za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

⁴ Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Doc. dr. sc. Gorana Aralica, dr. med.

Zavod za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i

Klinički zavod za patologiju Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb

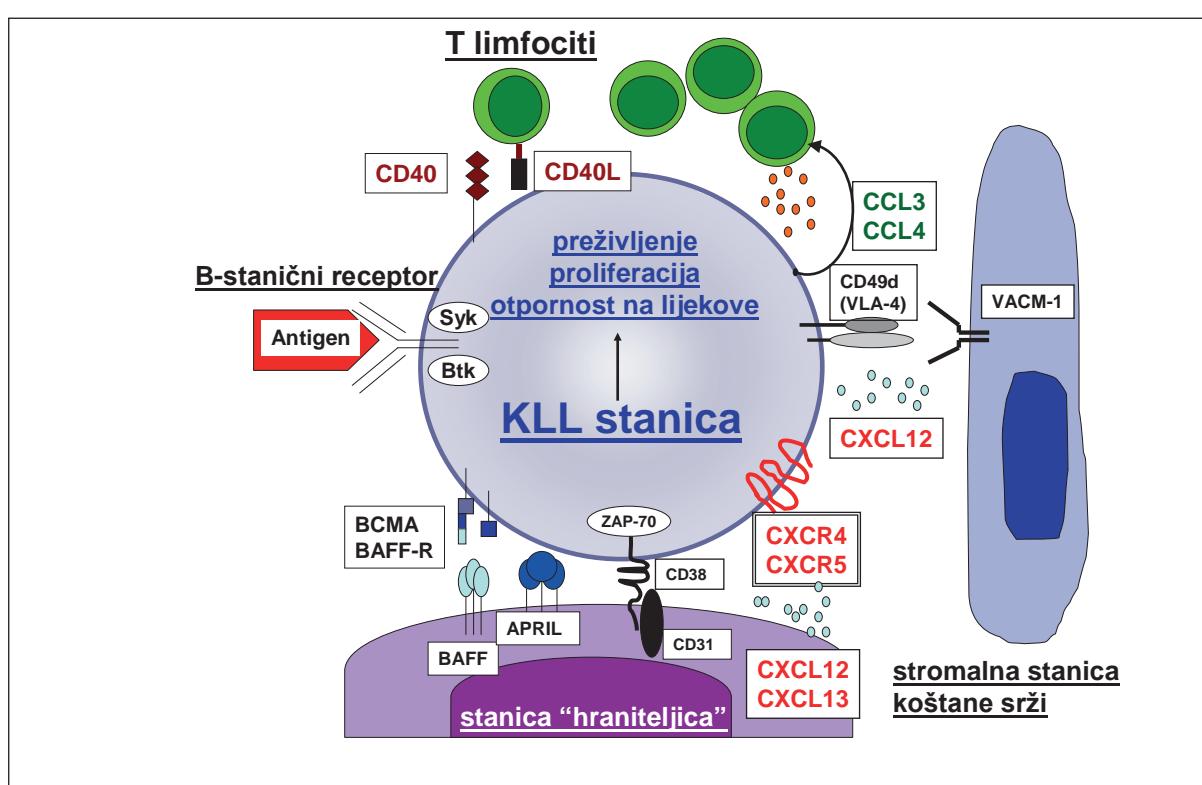
E-pošta: garalica@kbd.hr

Kronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita (KLL/LML) je neoplazma malih ili blago nepravilnih limfocita B imunofenotipa te, u manjem broju, pridruženih prolimfocita i paraimunoblasta

koji formiraju proliferacijske centre. Tumor zahvaća koštanu srž, limfne čvorove, slezenu i perifernu krv. Imunohistokemijskim metodama mogu se dokazati antigeni na površini tumorskih stanica. Tumorske stanice su pozitivne na CD20 (što dokazuje njihovo B-stanično porijeklo), CD5 (aberantni pozitivitet na uobičajeno T-stanični marker) i CD23, uz nizak indeks proliferacije koji se prikazuje imunohistokemijskim bojenjem na MIB-1 (Ki-67). Također, tumorske stanice se mogu prikazati i u citološkim razmazima periferne krvi i aspirata koštane srži te protočnom citometrijom.

Niti definicija Svjetske zdravstvene organizacije niti rutinski patohistološki i citološki pregledi tkiva i stanica, ne opisuju složenost interakcija tumorskih stanica s njihovim okolišem u kojemu rastu, tj. sa stanicama koštane srži, limfnih čvorova te drugih stanica periferne krvi kao tri odjeljka u kojima se KLL stanice (ili limfociti) nalaze.

Interakcije KLL stanica s mikrookolišem možemo podijeliti u 4 skupine (Slika 1.).



Slika 1. Tumorska stanica i njene interakcije. Preuzeto uz dopune iz: Burger J. Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. Hematology. 2011;96-103.

Prva skupina interakcija je posljedica antigene stimulacije B-staničnog receptora. Smatra se da fiziološke molekule koje sudjeluju u uklanjanju staničnog debrija, vezanju apoptotskih tjelešaca i odgovoru na patogene bakterije mogu potaknuti i ili pojaviti pojавu i evoluciju barem nekih KLL klonova. Također, strani mikrobiološki agensi mogu podržati rast KLL stanica *in vivo* preko Toll-like receptora. Jedno od obilježja KLL limfocita je stalna (re)cirkulacija između tkiva i periferne krvi. Stalno prisutni endogeni antigeni mogu stimulirati ponovni ulazak i KLL stanica u tkiva te oblikovati mikrookoliš tako što stimuliraju preživljenje i proliferaciju. Osim toga, posljedica aktivacije B-staničnog receptora je i akumulacija stanica u tkivima, vjerojatno preko 2 mehanizma: proizvodnje CD138 (syndecan-1) koji pomaže u adheziji neoplastičnih stanica te pomoću brojnih površinskih adhezijskih molekula na KLL stanicama, prvenstveno integrina (CD29 – β -1, CD18 - β -2, CD49c,d,e) imunoglobulinskih molekula (ICAM-1,2,3) L-selektina i CD44 adhezijske molekule.

Stromalne stanice limfnih čvorova i koštane srži su također izuzetno važne za integraciju tumorskih stanica. Stromalne stanice koštane srži (engl. *bone marrow stromal cell*, BMSC) su odgovorne za normalnu hematopoezu i stvaraju "utočišta" u kojima su tumorske stanice zaštićene od citotoksičnih tvari. Te stanice imaju ista svojstva kao stanice limfatičnih organa mezenhimalnog porijekla koje su pozitivne na α -glatkomišićni aktin. Folikularne dendritične stanice (engl. *follicular dendritic cell*, FDC) imaju nejasno porijeklo, no slične su stromalnim progenitorskim stanicama koštane srži i sliče miofibroblastima. To su nemigrirajuće stanice, a nalaze se u primarnim i sekundarnim B-staničnim folikulima. Uloga im je skladištenje antiga u vidu imunog kompleksa na površini stanice te prezentacija antiga limfocitima. *Nurse-like* stanice, stanice "hraniteljice", su stanice koje *in vitro* nastaju iz mononuklearne ćelije. To su velike, okrugle, prijelazne stanice koje štite KLL stanice od spontane ili lijekom izazvane smrti. Imaju iste karakteristike kao potporne stanice timusa i mogu se naći u slezeni i limfatičnim organsima bolesnika sa KLL-om, a izražavaju: CXCL12, CXCL13, CD31, plexin B1, BAFF, APRIL, vimentin i CD68. Važnost uloge stromalnih stanica u patogenezi KLL-a je dokazana *in vitro* studijama gdje je pokazano da tumorske stanice ne idu u apoptozu jedino ako su u ko-kulturi s različitim stromalnim stanicama (FDC, fibroblasti) koje izražavaju CD40-ligand (CD154).

Uloga T limfocita je vrlo kontroverzna. Primijećeno je kako je broj cirkulirajućih i CD4+ i CD8+ T-limfocita kod neliječenih KLL bolesnika povećan, ali nije razjašnjeno da li je to posljedica interakcije s nekim tumorskim klonom, mikrobioloških utjecaja ili drugih utjecaja. Također je primijećeno kako su T-limfociti imunološki deficijentni u kontaktu s KLL stanicama, a u proliferacijskim centrima CD4+ T-limfociti se nalaze uz CD38+ KLL stanice.

Navedene interakcije odvijaju se preko nekoliko komunikacijskih puteva između tumorskih stanica i elemenata mikrookoliša. Histološki preparati, odnosno uporaba imunohistokemije nije dovoljno primjenjivana u dosadašnjim istraživanjima. Najviše se primjenjuje protočna citometrija na različitim odjelicima u kojima mogu biti tumorske stanice. Najvažniji komunikacijski putevi su:

1. CXCR4-CXCL12 osovina

CXCR4 (CD184) je receptor za kemokin CXCL12. Na tumorskim stanicama u perifernoj krvi je u visokim koncentracijama, a kod stanica u limfnim čvorovima u niskim koncentracijama. Također, koncentracija je viša na stanicama koje proliferiraju. CXCR4 je odgovoran za kemotaksiju, migraciju tumorskih stanica kroz vaskularni endotel, polimerizaciju aktina te migraciju oko BMSC-a (pseudoemperipoleza). CXCL12 se nalazi i na stanicama "hraniteljicama" te inhibira CXCR4, usporedno sa stimulacijom B staničnog receptora. Za inhibiciju ove osovine moguća je primjena Plerixafora, koji je antagonist CXCR4 receptora.

2. CXCR5-CXCL13 osovina

CXCR5 (CD185) je receptor za kemokin CXCL13. Regulira udomljavanje limfocita i njihov smještaj unutar limfnih čvorova. CXCR5 je nazočan u visokoj koncentraciji na tumorskim stanicama u perifernoj krvi. Odgovoran je za polimerizaciju aktina, endocitozu i kemotaksiju. CXCL13 se nalazi na stanicama "hraniteljicama".

3. CCL3, CCL4

CCL3 i CCL4 su kemokini koji se vežu na T-limfocite i monocyte. Normalni su produkt B limfocita nakon aktivacije BCRA i CD40 liganda. Smatra se da je razina CCL3 u krvi važna za početak terapije. Aktivirani T limfociti djeluju na CD38+/Ki-67+ stanice i stimuliraju proliferaciju.

4. Adhezijske molekule

Adhezijske molekule su odgovorne za kontakt između tumorskih stanic i tumorskih stanic i međustaničnog matriksa. Najvažniji su α 4 β 1 integratori.

grin VLA-4 (CD49d) koji je receptor za fibronektin te VCAM-1/CD106 koji je adhezijska molekula za vaskularne stanice. U dosadašnjim analizama prikazano je da je koncentracija CD49d podjednaka na tumorskim stanicama u perifernoj krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima.

5. CD40-CD154 interakcije

Uz pomoć ovog puta tumorske stanice izbjegavaju apoptozu. Dolazi do aktiviranja KLL stanica u efektivne T-stanične stimulatore te do aktiviranja specifičnog imunološkog odgovora. CD154 je naviše izražen na tumorskim stanicama u limfnim čvorovima, a najmanje u perifernoj krvi, dok je CD40 izražen na suprotni način. Izražaj CD154 na T limfocitima je nizak u sva tri odjeljka.

6. BAFF i APRIL

To su TNF ligandi, a dovode do aktivacije NF κ B puta i izbjegavanja apoptoze. BAFF je na tumorskim stanicama podjednako izražen u sva tri odjeljka.

7. BCR i BCR pridružene kinaze (Syk, Btk, PI3K delta)

Aktivacija BCR-a mikrobiološkim ili autoantigenima dovodi do produljenja preživljjenja, migracije, proliferacije te sekrecije kemokina iz tumorskih stanica. U ovoj interaciji moguće je terapijski djelovati pomoću inhibicije splenične tirozin kinaze (lijek fostamatinib), inhibicije Brutonove tirozin kinaze (lijek ibrutinib) te inhibicije PI3K delta (lijek GS-1101).

Zaključno možemo reći kako su interakcije između tumorskih stanica KLL-a i elemenata okoliša u kojem rastu vrlo intenzivne i raznolike. Njihovim proučavanjem otvaraju se brojne mogućnosti terapijskog djelovanja te se nadamo kako će liječenje ovakvih bolesnika u budućnosti biti još uspješnije.

Literatura:

1. Burger J. Nurture versus Nature: The Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology*. 2011;96-103.
2. Caligaris-Cappio F, P. Novel Insights in Chronic Lymphocytic Leukemia: Are We Getting Closer to Understanding the Pathogenesis of the Disease? *J Clin Oncol*. 2008; 26:4497-503.
3. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, Gibellini F, Njuguna N, Lee E, Stennett L, Raghavachari N, Liu P, McCoy JP, Raffeld M, Stetler-Stevenson M, Yuan C, Sherry R, Arthur DC, Maric I, White T, Marti GE, Munson P, Wilson WH, Wiestner A. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011; 117:563-74.
4. Jaksic B, Jaksic O, Kardum-Paro MM, Kardum-Skelin I. Differences between peripheral blood, lymph nodes and bone marrow in expression of integrins, ICAMs, CD38 and CD31 correlate with clinical characteristics in B-CLL. *Blood*. 2005;106(11):326B-B.
5. Jaksic O, Gzdic B, Veic TS, Jaksic VP, Kusec R, Pejsa V, et al. Different Pattern of CD154 and CD40 Expression On B-CLL and T Lymphocytes In Peripheral Blood, Bone Marrow and Lymph Node Microenvironment In B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL). *Blood*. 2010;116(21):1485.
6. Jaksic O, Gzdic B, Veic TS, Jaksic VP, Kusec R, Pejsa V, et al. Different Pattern of Expression of CD52, CD20 and CXCR-4 in Peripheral Blood, Bone Marrow and Lymph Nodes in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL). *Blood*. 2011;118(21):1657.
7. Jaksic O, Gzdic B, Veic TS, Pirsic M, Kusec R, Jaksic VP, et al. Different CXCR4, CXCR3, CXCR5, CCR7 and Ki-67 expression in peripheral blood, bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Haematologica-the Hematology Journal*. 2009;94:368-9.
8. Jaksic O, Kardum-Skelin I, Jaksic B. Chronic Lymphocytic Leukemia: Insights from Lymph Nodes & Bone Marrow and Clinical Perspectives. *Collegium Antropologicum*. 2010; 34:309-13
9. Muzio M, Bertilaccio MT, Simonetti G, Frenquelli M, Caligaris-Cappio F. The role of toll-like receptors in chronic B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1573-80.
10. Ponzoni M, Doglioni C, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: the pathologist's view of lymphnode microenvironment. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 2011;28:161-6.
11. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103:4389-95.
12. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissue. IARC, Lyon, France, 2008.

Intervju s dr. Stephanie J. Lee, Fred Hutchinson Cancer Research Center, SAD

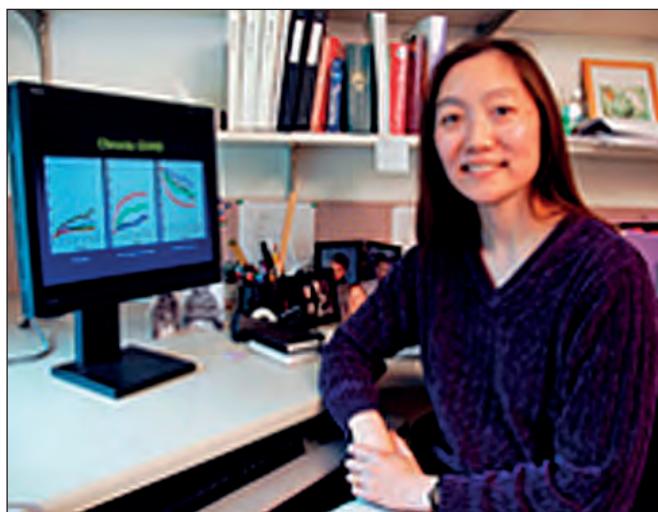
Razgovarala i pripremila:

Inga Mandac Rogulj, dr. med., Zavod za hematologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Kad je Donall E.Thomas napravio prvu transplantaciju koštane srži na svijetu 1956. godine u Fred Hutchinson Cancer Research Center u SAD-u, vjerojatno su tek rijetki entuzijasti hematološke onkologije vjerovali u dolazak prave revolucije u liječenju hematoloških bolesnika.

U Hrvatskoj je prva transplantacija koštane srži napravljena 1983. godine u KBC Zagreb, a 10 godina kasnije i u KB Merkur su se bolesnici počeli liječiti transplantacijom matičnih stanica.

S obzirom da se ove godine obilježava 30 godina alogenične transplantacije i 25 godina autologne transplantacije matičnih stanica u KBC Zagreb, te 20 godina autologne transplantacije u KB Merkur, odlučili smo se da za prvi ovogodišnji intervju Biltena Krohema odaberemo hematologinju s velikim iskustvom u transplantacijskoj hematologiji, doktoricu Stephanie J. Lee.



Slika 1. Dr. Stephanie J. Lee

Dr. Lee je profesorica onkologije i hematologije u Medicinskom centru Sveučilišta u Washingtonu i Seattle Cancer Care Alliance, SAD, s užim područjem interesa u alogeničnoj transplantaciji matičnih stanica i kroničnoj reakciji presatka protiv primatelja (GVHD). Svoja istraživanja provodi u jednom od brojnih laboratorija u Fred Hutchinson Cancer Research Center gdje su i nastali neki od najvažnijih radova iz područja alogenične transplantacije te GVHD-a. Njezin rad s brojnim suradnicima ame-

ričkog Nacionalnog instituta za zdravlje rezultirao je s nekoliko smjernica u prepoznavanju i liječenju kronične reakcije presatka protiv primatelja.

Dr. Lee, zašto ste odabrali hematologiju kao Vaše područje rada u medicini?

Razmišljala sam o različitim područjima: kardiologiji, kirurškoj onkologiji. Ali najviše me privukla hematologija, posebno transplantacija matičnih stanica zbog skupine bolesnika, velikih mogućnosti za bazična i klinička translacijska istraživanja, i mojih kolega. Svidjela mi se mogućnost da se brinem o bolesnicima kao kliničar a ujedno bavim i istraživačkim radom. Ponekad kad me frustriraju rezultati istraživanja u laboratoriju, odem na kliniku i preuzmem brigu o bolesnicima, i upravo njihove teške kliničke slike daju mi snagu za nastavak istraživanja i vrate želju da radim na unaprjeđenju liječenja.

Koje je Vaše područje interesa u hematologiji?

Hematološke maligne bolesti, alogenična transplantacija matičnih stanica i kronični GVHD.

Po Vašem mišljenju, koji su najveći uspjesi transplantacije matičnih stanica?

Možemo izlječiti mnoge bolesnike koji bi inače umrli od hematoloških bolesti.

Koje su najvažnije komplikacije nakon transplantacije matičnih stanica i što se može učiniti da se njihova učestalost smanji?

Sam postupak je dosta zahtjevan i za bolesnika i zdravstvene djelatnike, i fizički i emocionalno, a odražava se i na njihove obitelji. Moramo naći način da otkrijemo ključne čimbenike u transplantacijskom postupku koji utječu na rani i kasni posttransplantacijski tijek, a sa što manje komplikacija. Potrebno je prevenirati akutni i kronični GVHD bez kompromitiranja *graft-versus-leukemia* učinka. Ciljana terapija koja bi bila specifičnija od „pan-imunosupresiva“ i lijekovi koji bi blokirali GVHD reakciju, a bez oštećenja ciljnih organa su stalni izazovi istraživača i kliničara.

Mislite li da je kronični GVHD dobro prepoznat problem među hematolozima ili je potrebna bolja edukacija kako bi se prevenirale ozbiljnije manifestacije kroničnog GVHD-a?

Mislim da bi bolesnici i liječnici trebali biti više svjesni GVHD-a. Transplantacijski centri bi trebali uključivati više bolesnika u klinička istraživanja vezana uz kronični GVHD kako bi se poboljšalo liječenje te bolesti.

Dobili ste nekoliko stipendija za svoja istraživanja od Nacionalnog instituta za zdravljje (NIH) SAD-a. Koji su najvažniji rezultati Vaših dosadašnjih istraživanja?

Napravili smo nekoliko studija vezanih uz kriterije za NIH konsenzus u liječenju GVHD-a. Neke

od preporuka, kao što je sustav procjene GVHD-a, prihvaćene su i korištene u transplantacijskim centrima diljem svijeta. Trenutno provodimo nekoliko studija vezanih uz liječenje kroničnog GVHD-a, a rezultati još nisu analizirani.

Koja je Vaša poruka hrvatskim hematolozima?

Ujedinite se kao nacionalna grupa i provodite integrirana istraživanja o transplantaciji matičnih stanica. Transplantacijska hematologija je izašla izvan institucionalnih granica pa će i rezultati biti bolje vidljivi na svjetskoj hematološkoj sceni.



Slika 2. Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, SAD.

Kalendar predstojećih hematoloških skupova

Priredila: Vlatka Periša, dr. med.

- **12th International Symposium on Myelodysplastic Syndrome**
Od 08.05. do 11.05.2013. u Njemačkoj (Berlin)
- **Technological Innovations In Laboratory Haematology 26th International Symposium 2013 (ISLH 2013)**
Od 10.05. do 12.05.2013. u Kanadi (Toronto)
- **ESH Clinical Updates in Haematology on AML and MDS 2013**
Od 31.05. do 01.06.2013. u Mađarskoj (Budimpešta)
- **2013 Stem Cells Discussion Forum: Working Towards Clinical Application**
06.06. 2013. u Engleskoj (London)
- **18th Congress of the European Hematology Association**
Od 13.06. do 16.06.2013. u Švedskoj (Stockholm)
- **Leukaemia and Lymphoma**
Od 15.06. do 17.06.2013. u Švicarskoj (Ascona)
- **International Society on Thrombosis and Haemostasis 24th Congress 2013 (ISTH 2013)**
29.06. do 04.07.2013. u Nizozemskoj (Amsterdam)
- **4th International Symposium on Critical Bleeding 2013 (ISCB 2012)**
Od 02.09 do 03.09.2013. u Danskoj (Kopenhagen)
- **ESH-ICMLF International Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology & Therapy**
Od 26.09. do 29.09.2013. u Portugalu (Estoril)
- **ESH International Conference on Multiple Myeloma**
Od 04.10. do 06.10.2013. u Irskoj (Dublin)
- **2nd International Congress on Controversies in Stem Cell Transplantation & Cellular Therapies**
Od 10.10. do 13.10. 2013. u Njemačkoj (Berlin)
- **Thalassemia International Federation World Congress (TIF2013)**
Od 20.10. do 23.10.2013. u Ujedinjenim Arapskim Emiratima (Abu Dhabi)
- **ESH International Conference on Haematological Disorders in the Elderly**
Od 06.11 do 7.11.2013. u Španjolskoj (Barcelona)

Dubravka Sertić: Fotografije s posljednjeg sastanka KROHEM-a u Biogradu u studenome 2012. godine





