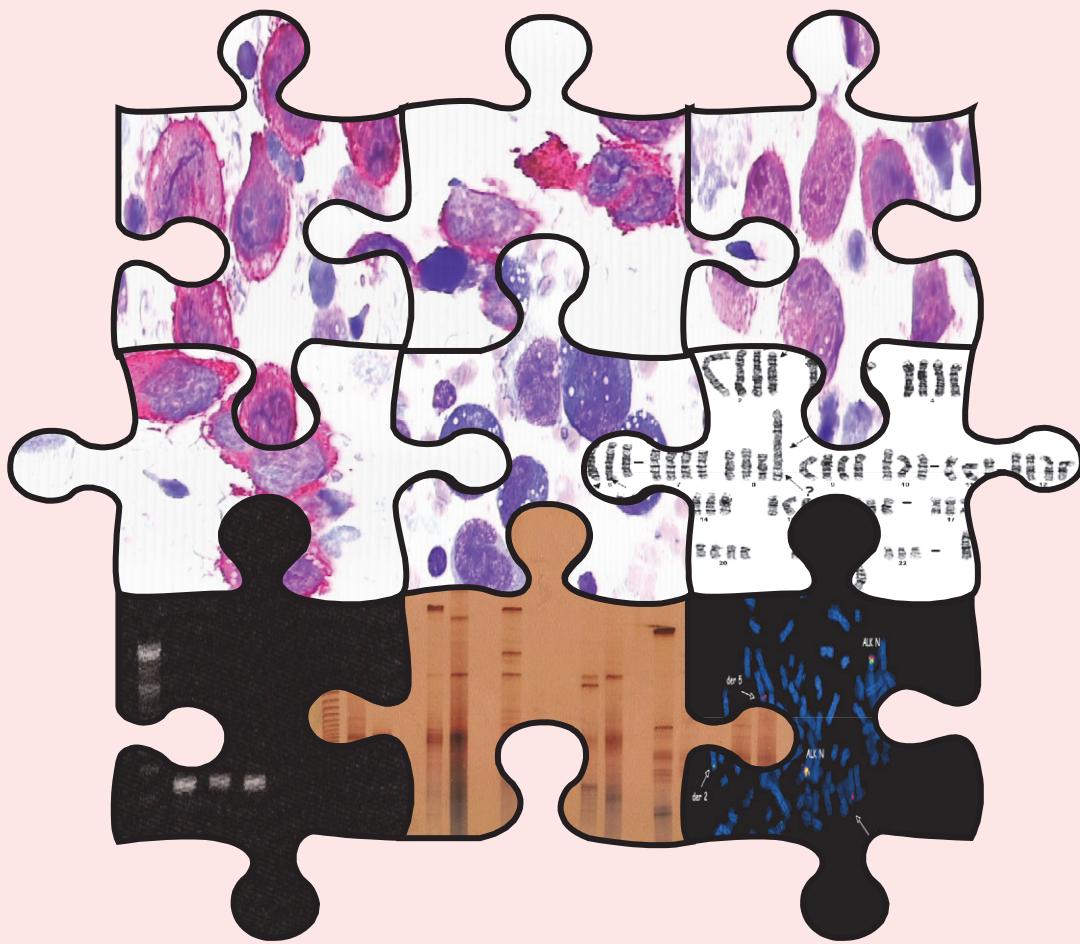


Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM



Volumen 6., Broj 1.

KroHem

Impresum

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM

Volumen 6., Broj 1., Svibanj 2014.

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

Ivana Horvat

Dražen Pulanić

Igor Aurer

Filip Jadrijević Cvrlje

Margareta Radić-Antolić

Sandra Bašić-Kinda

Gordana Jakovljević

Ivo Radman

Drago Batinić

Nives Jonjić

Jasmina Rajc

Josip Batinić

Ika Kardum-Skelin

Ljubica Rajić

Ines Bojanić

Danijela Kolenc

Sunčica Ries

Aleksandra Bonevski

Tajana Klepac Pulanić

Srđan Rogošić

Ernest Bilić

Kristina Kovač

Pavle Rončević

Ervina Bilić

Rajko Kušec

Filip Rubić

Romana Čeović

Boris Labar

Ivana Samaržija

Barbara Dreta

Ksenija Lučin

Irena Seili Bekafigo

Klara Dubravčić

Dina Ljubas

Dubrava Sertić

Dino Dujmović

Dora Markulin

Ranka Serventi-Seiwerth

Nadira Duraković

Inga Mandac Rogulj

Jasminka Sinčić Petričević

Davorka Dušek

Nikolina Matić

Jasminka Stepan

Slavko Gašparov

Marinka Mravak-Stipetić

Vedrana Škaro

Koraljka Gjadrov Kuveždić

Damir Nemet

Anita Škrtić

Branka Golubić Čepulić

Alen Ostojić

Tajana Štoos-Veić

Magdalena Grce

Steven Živko Pavletić

Čedna Tomasović-Lončarić

Njetočka Gredelj Šimec

Sanja Pečanić

Toni Valković

Lana Grković

Vlatko Pejša

Radovan Vrhovac

Zorana Grubić

Zinaida Perić

Renata Zadro

Višnja Hariš

Vlatka Periša

Viktor Zatezalo

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 naslovnicama:

ALK pozitivni anaplastični limfom velikih stanica (ALCL) iz citološkog uzorka punktata limfnog čvora (LČ). Prikaz kompletног dijagnostичког postupka citomorfoloшком, imunocitokemijskom, citogenetičkom i molekularnom analizom. Slika (puzzle) - srednji red u sredini: atipične velike neoplastične stanice u citološkim razmazima punktata limfnog LČ, May-Grünwald-Giemsa (MGG) - povećanje 1000x; gornji red lijevo: imunocitokemijski CD3 pozitivne stanice u citološkom razmazu punktata istog LČ - povećanje 1000x; gornji red u sredini: imunocitokemijski CD3 pozitivne stanice u citološkom razmazu punktata istog LČ - povećanje 1000x; gornji red desno: imunocitokemijski EMA pozitivne stanice u citološkom razmazu punktata istog LČ-povećanje 1000x; srednji red lijevo: imunocitokemijski ALK pozitivne stanice u citološkom razmazu punktata istog LČ - povećanje 1000x; srednji red desno: punktat LČ -konvencionalna citogenetika - t(2;5;6) i amplifikacija 8q24 (C-myc); donji red lijevo: punktat LČ - reverzna transkripcija-lančana reakcija polimeraze (RT-PCR): t(2;5) - prijepis NPM-ALK; donji red u sredini: punktat LČ - multipleks lančana reakcija polimeraze (Multiplex PCR) - klonalna preuredba T staničnog receptora – TCRβ; donji red desno: punktat LČ - citogenetika – FISH (fluorescent in situ hybridization) - ALK lokus prisutan unutar kompleksne t(2;5;6) - C-myc onkogen umnožen u 8 kopija.

Ustupljeno i priređeno ljubaznošću **Ike Kardum-Skelin** i **Maje Bogdanić**, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, KB Merkur, Zagreb; **Mirjane Mariane Kardum Paro**, Klinički zavod za medicinsku biokemiјu i laboratorijsku dijagnostiku, KB Merkur, Zagreb; te **Ružice Lasan Trčić**, Zavod za citogenetiku, KBC Zagreb

Sadržaj

Damir Nemet:	
Uvodnik	3
Klara Dubravčić, Drago Batinić:	
Protočna citometrija u dijagnostici multiplog mijeloma i srodnih monoklonskih gamapatijskih stanica	4
Josip Batinić, Zinaida Perić, Alen Ostojić, Damir Nemet:	
Registar oboljelih od multiplog mijeloma i bolesti plazma stanica	9
Slavko Gašparov, Jasmina Rajc, Jasminka Sinčić Petričević, Anita Škrtić:	
Zrele B stanične novotvorine s plazmablastičnom diferencijacijom	12
Alen Ostojić, Radovan Vrhovac:	
CELG-AML1 i KROHEM-AML1 opservacijska studija – preliminarni podaci	15
Koraljka Gjadrov Kuveždić, Sunčica Ries:	
Prikaz citomorfoloških dijagnoza akutnih leukemija u KBC-u Zagreb tijekom dva trogodišnja perioda	17
Dubravka Sertić, Barbara Dreta, Renata Zadro, Ranka Serventi-Seiwerth, Ivana Horvat, Margareta Radić-Antolić, Boris Labar:	
Prikaz slučaja prekida terapije inhibitorima tirozin kinaze kod pacijenata s kroničnom mijeloičnom leukemijom	20
Gorana Aralica, Čedna Tomasović-Lončarić, Nives Jonjić, Višnja Hariš, Toni Valković, Tajana Štoos-Veić, Rajko Kušec:	
Rijetki oblici sistemske mastocitoze	22
Gordana Jakovljević, Jasminka Stepan, Aleksandra Bonevski, Filip Jadrijević Cvrlje, Srđan Rogošić, Filip Rubić, Ines Bojanić, Branka Golubić Ćepulić, Drago Batinić:	
Specifičnosti autologne transplantacije krvotvornih matičnih stanica u djece	25
Vlatko Pejša:	
Autologna transplantacija u prvoj liniji liječenja agresivnih limfoma	32
Zorana Grubić:	
Praćenje kimerizma u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica	35
Lana Grković, Dražen Pulanić, Ranka Serventi-Seiwerth, Nikolina Matić, Marinka Mravak-Stipetić, Ervina Bilić, Romana Čeović, Dina Ljubas, Ljubica Rajić, Ernest Bilić, Nadira Duraković, Zinaida Perić, Tajana Klepac Pulanić, Kristina Kovač, Davorka Dušek, Ines Bojanić, Magdalena Grce, Drago Batinić, Radovan Vrhovac, Steven Živko Pavletić, Damir Nemet:	
Formiranje multidisciplinarnog tima za liječenje kronične reakcije davatelja protiv primatelja i dugotrajnih komplikacija nakon transplantacije alogeničnih krvotvornih matičnih stanica u Kliničkom bolničkom centru Zagreb	41
Damir Nemet:	
Mobilizacija i sakupljanje matičnih stanica za transplantaciju uz primjenu pleriksafora	44
Nadira Duraković:	
Postoji li način da izbjegnemo prijevremeni gubitak funkcije jajnika nakon gonadotoksične kemoterapije?	48

Ernest Bilić, Ervina Bilić: Citostaticima uzrokovana neuropatija	50
Dino Dujmović, Vedrana Škaro, Sandra Bašić-Kinda, Dora Markulin, Ivana Samaržija, Pavle Rončević, Ivo Radman, Danijela Kolenc, Klara Dubravčić, Igor Aurer: Izvanstanična cirkulirajuća DNA(cfDNA) kao prognostički biljeg u bolesnika s limfomom	56
Nives Jonjić, Sanja Pećanić, Irena Seili Bekafigo, Toni Valković: Kompozitni limfom	57
Alen Ostojić, Njetočka Gredelj Šimec, Viktor Zatezalo, Radovan Vrhovac: Fungal InfectioN Database (FIND) – invazivne aspergiloze: izvješće o upisivanju pacijenata iz hrvatskih centara	59
Inga Mandac Rogulj: Intervju s dr. Marcom Mielcarekom	61
Igor Aurer: Godišnji sastanak Europske mreže za limfome plaštenih stanica u Dubrovniku	63
Vlatka Periša: Kalendar predstojećih hematoloških skupova	64

Uvodnik

Drage kolegice i kolege, članice i članovi KROHEM-a,

pred vama je novi broj Biltena koji se rađao dugo, duže nego obično, unatoč vrlo sadržajnom i kvalitetnom jesenskom sastanku KROHEM-a s obiljem vrlo dobrih prezentacija, stavova i prijedloga. Podsjetio bih članove da prezentacije brzo izbjegle iz sjećanja slušatelja, eventualno se opća slika zadrži do kraja sastanka ali detalji izbjegle već za vrijeme svečane večere. Stoga bih podsjetio na svima dobro poznatu izreku: *The job is not finished until the paperwork is done!*

Dakle, pozivamo sve članove da nakon uspješnih prezentacija u radnim skupinama obavezno u Biltenu objave svoje rezultate, pregledi suvremenih spoznaja ili smjernice.

Registrar hematoloških bolesti nakon jednogodišnje stanke zbog promjene izvođača i preuređenja baze podataka ponovno je u funkciji. Uz registrar AML, u funkciji su i do sada dva najveća registra, malignih limfoma i multiplog mijeloma, prethodno prikupljeni podaci uspješno su transferirani u nove baze podataka. Registrar KML i MPN su također završeni i otvoreni za unošenje podataka. Na posljednjoj sjednici Upravnog odbora odlučeno je da se nastavi s izradom registara za MDS i KLL. Ovaj važan projekt ostat će uzaludan napor bez suradnje svih članova KROHEM-a, posebno mlađih, u ispunjavanju registra, odnosno sustavnom unošenju podataka o bolesnicima.

Izrađen je još jedan važan registrar – Registrar članova KROHEM-a. Broj članova KROHEM-a se povećava, naročito se povećava broj mlađih članova, hematologa internista i pedijatara, ali i suradnih laboratorijskih struka. Svrha postojanja registra članova je adekvatno praćenje članstva, bolje poznавanje i olakšavanje komunikacije među članovima, poznавanje sklonosti i uključivanje članova u rad pojedinih radnih skupina, a također i praćenje aktivnosti članova na projektima i zadacima KROHEM-a. O svemu će članovi biti podrobno obaviješteni.

Gotovo sve radne skupine vrlo su aktivne, planovit rada skupina za ovu godinu su vrlo ambiciozni. Limfomska skupina organizirala je važan međunarodni sastanak u Dubrovniku, mijelomska skupina održava tradicionalno uspješne sastanke u veljaći, zadnji u Slavonskom Brodu ove godine. Napredak se očituje u tome da mnoge skupine provode retros-

pektivne i poneke prospektivne opservacijske studije što je vrlo veliki napredak. Ima naznaka organiziranja prospektivnih, intervencijskih studija ili uključivanja u multicentrične internacionalne studije.

U tom smislu je od iznimnog značenja uključenost KROHEM-a u projekt „Clinical and biological factors determining severity and activity of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“ kojeg su voditelji prof. dr. Steven Živko Pavletić iz Nacionalnog instituta za rak u SAD-u i prof. dr. Damir Nemet. U projekt su još uključene i druge institucije kao Institut Ruđer Bošković, Stomatološki fakultet i drugi. Značenje projekta potvrđeno je i činjenicom da je za realizaciju dobivena finansijska potpora od Fonda „Jedinstvo uz pomoć znanja“ (*Unity Through Knowledge Fund*, UKF) u ukupnom iznosu od 1,800.000 kuna. U studenom prošle godine održan je i Prvi međunarodni simpozij o kroničnoj reakciji transplantata protiv primatelja i dugoročnim komplikacijama nakon transplantacije krvotvornih maticnih stanica u organizaciji Zavoda za hematologiju KBC-a Zagreb, Nacionalnog instituta za rak iz SAD i KROHEM-a.

Sve u svemu KROHEM živi punim životom, raste i razvija se, napreduje kvantitativno i kvalitativno zahvaljujući motiviranosti i entuzijazmu svih članova i voditelja skupina. Uprava KROHEM-a vrlo vrijedno obavlja sve administrativne poslove, mnoštvo ugovora, prikupljanja sredstava za rad KROHEM-a, organiziranje sastanaka dva puta godišnje, osigurava edukaciju i prisustovanje na stručnim i znanstvenim skupovima brojnim članovima. Napredak hrvatske hematologije i ujednačenost pristupa liječenja u svim regijama je evidentan i trenutno je najvidljiviji rezultat rada KROHEM-a, no još uvijek postoji prostora za veću implementaciju dogovorenih dijagnostičkih i terapijskih standarda i algoritama.

Svjestan opterećenja koje nosi svakodnevni rad s bolesnicima pozivam opet sve članove na što aktivnije sudjelovanje u radu KROHEM-a, pri čemu svatko doprinosi kolektivnom napretku, a pojedinačno može naći potvrdu svoga rada i samoga sebe.

Predsjednik KROHEM-a
Prof. dr. sc. Damir Nemet

Protočna citometrija u dijagnostici multiplog mijeloma i srodnih monoklonskih gamapatija

Klara Dubravčić i Drago Batinić

Klinička jedinica za staničnu imunodijagnostiku i postupke in vitro

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Referentni centar Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske za imunodijagnostiku imunoloških i hematoloških bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Drago Batinić, dr. med.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: drago.batinic@zg.t-com.hr

Uvod

Imunofenotipizacija je rutinska laboratorijska metoda za dijagnostiku, klasifikaciju i praćenje bolesti krvotvornog sustava, posebice neoplastičnih proliferacija (1-3), a sve veću primjenu nalazi i u dijagnostici i praćenju monoklonskih gamapatija (MG) (4-5).

MG čine širok spektar bolesti, od asimptomatske prisutnosti malobrojne monoklonske populacije plazma-stanica (PS) pa sve do potpune infiltracije koštane srži zločudnim plazma-stanicama u multiplom mijelomu (MM) i plazmocitnoj leukemiji (PCL). Zajedničko obilježje navedenim poremećajima jest prisutnost monoklonskog proteina koji može biti u obliku intaktnog imunoglobulina, imunoglobulinskih ulomaka ili slobodnih lakih lanaca imunoglobulina u serumu i/ili u urinu (4).

Za ocjenu veličine tumorske mase, odnosno broja monoklonskih plazma-stanica u biološkom materijalu rutinski se rabe morfološke i imunopatohistološke metode, prije svega citološka analiza punktata koštane srži te patohistološka i imunohistološka analiza biopsata kosti. Imunofenotipizacija koštane srži s pomoću multiparametrijske protočne citometrije (MPC) sve do nedavno bila je ograničena uglavnom na klinička istraživanja i diferencijalnu dijagnostiku neuobičajenih ili nejasnih slučajeva. Međutim, otkriće plazmocitnog biljega CD138/syndecana-1, kao i specifičnih aberantnih imunofenotipova plazma-stanica u MG-u omogućena je preciznija protočnociometrijska identifikacija i razlikovanje aberantnih (monoklonskih) od normalnih (poliklonskih) plazma-stanica, čak i u onim slučajevima kad je njihov udio u uzorku vrlo malen (5, 6).

Važnost protočne citometrije u dijagnostici i praćenju MG-a može se prema preporukama European Myeloma Network i drugih istraživača (6-8) svrstati u nekoliko kategorija (Tablica 1):

Tablica 1. Indikacije za primjenu multiparametrijske protočne citometrije u monoklonskim gamapatijama (prema ref. 6-8)

Klinička primjena	Parametri mjereni protočnom citometrijom
Diferencijalna dijagnoza: - multipli mijelom (MM) - monoklonska gamapatijska nepoznatog značaja (MGUS) - asimptomatski („tinjajući“) MM - neuobičajeni IgM+ MM - ne-Hodgkinov limfom (NHL) - reaktivna stanja	Udio plazma-stanica u odnosu na ukupan broj leukocita Imunofenotip plazma-stanica Klonalnost plazma-stanica Udio aberantnih plazma-stanica u odnosu na ukupan broj plazma-stanica
Otkrivanje prognostičkih biljega u simptomatskom mijelomu	Izražaj specifičnih antigena na aberantnim plazma-stanicama: npr. CD45/CD56/CD117/CD28
Predviđanje tijeka bolesti u bolesnika s MGNZ-om i asimptomatskim mijelomom	Udio aberantnih plazma-stanica u odnosu na ukupan broj plazma-stanica
Određivanje minimalne ostatne bolesti u bolesnika s MM-om tijekom terapije i određivanje „striktognog“ kompletognog odgovora (sCR)	Udio plazma-stanica s aberantnim imunofenotipom i citoplazmatskih κ/λ u odnosu na ukupan broj leukocita ili plazma-stanica

1. diferencijalnu dijagnostiku MM-a i drugih poremećaja plazma-stanica, uključujući ne-Hodgkinov limfom (limfoplazmocitni tip), kao i dijagnostiku neuobičajnog IgM+ oblika MM-a;
2. utvrđivanja prognostičkog značaja podskupina simptomatskog MM-a, kao i otkrivanje prognostičkih biljega povezanih s rizikom progresije bolesti u slučajevima monoklonske gamapatijske neutvrđenog značaja (MGUS, prema engl. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*) i asimptomatskog ili tzv. „tinjajućeg“ (engl. *smoldering*) mijeloma (aMM);
3. praćenje terapijskog odgovora mjeranjem udjela minimalne ostatne bolesti (MRD, prema engl. *minimal residual disease*) s ciljem određivanja imunofenotske, odnosno striktne kompletne remisije prema smjernicama *International Myeloma Working Group* (9).

I. Protočna citometrija u dijagnostici mijeloma i srodnih bolesti

Protočnociometrijska imunofenotipizacija ima jedinstvene karakteristike i prednosti u odnosu na druge dijagnostičke metode za identifikaciju i analizu plazma-stanica. Povećanjem liste klinički korisnih

i komercijalno dostupnih monoklonskih protutijela, kao i razvojem suvremenih digitalnih protočnih cito-metara opremljenih s 2-3 lasera, uz veliki broj novih kompatibilnih fluorokroma i sofisticiranih analitičkih programa omogućeno je istovremeno mjerjenje više od 6 staničnih biljega i analiza vrlo kompleksnih imuno-fenotipskih profila i do milijun stanica u kratkom vremenu (10).

Za otkrivanje i određivanje brojnosti plazma-stanica protočnom citometrijom potrebna su minimalno dva biljega (CD38 i CD138), a za otkrivanje aberant-

nih plazma-stanica, odnosno diferencijalnu dijagnostiku i određivanje MRD-a broj biljega, tj. analiziranih parametara može se povećati na 10-12 (4-7). U cilju standardizacije i validacije protočne citometrije u dijagnostici plazmocitnih neoplazmi, europski konzorcij *EuroFlow* dao je detaljne preporuke za analizu plazma-stanica. Prema tim preporukama, rabe se dva panela monoklonskih protutijela, svaki s po 8 biljega/fluorokroma, što čini sveukupno 12 različitih biljega (Tablica 2.) (10-11).

Tablica 2. EuroFlow-paneli za klasifikaciju i karakterizaciju monoklonskih gamapatija (prema ref. II)

Epruveta	Fluorokromi								
	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7	
Biljezi									
1	CD45	CD138	CD38	CD56	β2-mikro	CD19	cylgk	cylgλ	
2	CD45	CD138	CD38	CD28	CD27	CD19	CD117	CD81	

Epruveta #1 služi za otkrivanje i razlikovanje normalnih i aberantnih (klonskih) plazma-stanica, a epruveta #2 za dodatnu evaluaciju biljega s potencijalnim prognostičkim značenjem, kao i za određivanje ostatne bolesti

Navedenim panelima moguća je pouzdana i točna identifikacija i kvantifikacija plazma-stanica, razlikovanje normalnih/reaktivnih i aberantnih plazma-stanica, analiza njihovog omjera, kao i otkrivanje biljega s prognostičkim značenjem. Okosnicu (engl. *backbone*) oba panela čine biljezi CD19, CD38, CD138 i CD45 u kombinaciji s fizičkim parametrima (veličinom/FSC i zrnatošću/SSC) stanica. Izražaj biljega CD38 u kombinaciji s biljegom CD138 služi za identifikaciju i kvantifikaciju plazma-stanica čiji se fenotip dodatno analizira ostalim biljezima u panelu. Pri tome normalne plazma-stanice imaju malene vrijednosti fizičkih

parametara (veličine/FSC i zrnatosti/SSC), jak izražaj CD38 kao i CD19+CD56- fenotip. Nasuprot tome, aberantne plazma-stanice pokazuju veće vrijednosti fizičkih parametara, slabiji izražaj CD38, kao i CD19-CD56+ ili (rzede) CD19-CD56- fenotip, uz varijabilni izražaj CD45. Drugi biljezi u panelu služe za dodatnu karakterizaciju aberantnih imunofenotipova koji se najčešće očitavaju kao: 1) smanjeni izražaj CD19, CD27, CD38, CD45 i CD81; 2) prekomerni izražaj CD28 i CD56; i 3) asinkroni izražaj CD20 i CD117, kao i membranskog Ig (Tablica 3.) (5-10).

Tablica 3. Važnost dodatnih biljega plazma-stanica u dijagnostici i praćenju monoklonskih gamapatija (prema ref. 6-8,11)

Biljeg	Izražaj na normalnim plazma-stanicama	Izražaj na abnormalnim plazma-stanicama	Bolesnici s abnormalnim izražajem (%)	Važnost za dijagnostiku i praćenje
CD19	Pozitivan (>70%)	Negativan	95%	Neophodan
CD56	Negativan (<15%)	Jako pozitivan	75%	Neophodan
CD117	Negativan (0%)	Pozitivan	30%	Preporučen
CD20	Negativan (0%)	Pozitivan	30%	Preporučen
CD28	Slabo pozitivan (<15%)	Jako pozitivan	15-45%	Preporučen
CD27	Jako pozitivan (100%)	Slab/negativan	40-50%	Preporučen
CD81	Pozitivan (100%)	Slab/negativan	-	Predložen

Biljezi u 1. epruveti (CD56, β2-mikroglobulin, citoplazmatski Igk i Igλ) zajedno s okosnicom mogu se koristiti samostalno ili kao primarni (inicijalni) panel u metodi dva koraka za dokaz monoklonalnosti teme-

ljem restrikcije citoplazmatskih Igk ili Igλ, kao i analizu biljega s potencijalnim prognostičkim značenjem (β2-mikroglobulin). Biljezi u 2. epruveti (CD27, CD28, CD81 i CD117) čine tzv. sekundarni panel i predstav-

Ijaju dodatnu opciju za analizu imunofenotipskih abe-racija koje se mogu rabiti za određivanje MRD-a, odnosno za praćenje terapijskog odgovora (11).

Navedeni dijagnostički paneli mogu se koristiti i u kombinaciji s panelima za dijagnostiku i klasifi-kaciju zrelih B-limfoproliferacija. Na ovaj je način moguća dodatna analiza monoklonskih B-limfocita u limfoplazmocitnom limfomu u bolesnika s makro-globulinemijom Waldenström s infiltracijom koštane srži limfocitima, plazma-stanicama i plazmacitoidnim limfocitima (7-8,11).

2. Dijagnostički i prognostički značaj protočne citometrije u monoklonskim gamapatijama

Kvantifikacija plazma stanica

Udio plazma-stanica mјeren protočnom citometrijom pokazuje značajno niže vrijednosti u odnosu na citomorfološku analizu. Hemodilucija uzorka pri punkciji koštane srži smatra se glavnim uzrokom/razlogom ovih razlika, zbog čega bi uzimanje uzorka aspirata koštane srži za protočnositometrijsku analizu trebalo prethoditi aspiratu za citomorfološku dijagnostiku. Gubitak plazma-stanica može nastati i zbog njihove adherencije na koštane spikule za vrijeme izolacije stanica kod pripreme i obilježavanja uzorka. Na kraju, ne smije se zanemariti vijabilnost stanica u biološkom materijalu u kojem je pokazano brzo nestajanje CD138 na apoptočnim plazma-stanicama (4,6). Međutim, iako citometrija daje manji udio plazma-stanica u odnosu na citomorfologiju, pokazana je pozitivna korelacija rezultata obiju metoda. Štoviše, u nekim je studijama udio ukupnih plazma-stanica u koštanoj srži određen protočnom citometrijom predstavlja nezavisni prognostički čimbenik za sveukupno preživljjenje (5).

Razlikovanju MGUS od MM pri dijagnozi

Izražaj biljega CD19 i CD56 na plazma-stanicama u monoklonskim gamapatijama pomaže u razlikovanju normalnih od malignih plazma-stanica i pomaže u diferencijalnoj dijagnostici MGUS, MM, ekstra-medularnog plazmocitoma i plazmocitne leukemije (PCL) (5-8). Primjerice, u koštanoj srži bolesnika s MGUS-om i MM-om istovremeno se nalaze normalne i aberantne plazma-stanice, ali s različitim udjelom: >5% normalnih plazma-stanica u odnosu na sve plazma-stanice koštane srži nalazimo u >80% bolesnika s MGUS-om i <15% bolesnika sa simptomatskim MM-om. Stoga se nalaz >5% rezidualnih normalnih, poliklonskih plazma-stanica u plazmocitnom odjeljku koštane srži smatra parametrom za razlikovanje MGUS-a od MM-a pri dijagnozi.

Diferencijalna dijagnoza MM i LPL

Biljezi CD19, CD56 i CD138 su korisni u differen-cijalnoj dijagnostici MM-a i limfoplazmocitoidnog limfoma (LPL), kao i neuobičajenog (IgM+) obli-ka MM-a. Monoklonske B-stanice u LPL (obično CD19+CD20+IgM+kappa+ ili lambda+) ne izražava-ju CD138, dok istovremeno plazma-stanice pokazuju jak izražaj biljega B-stanica CD19 (7-8). IgM+ MM predstavlja prijelazni oblik između MM-a i LPL-a s najčešće opisanim fenotipom CD20-CD56-CD117- (8).

Predviđanje rizika progresije bolesti

Nalaz rezidualnih normalnih, poliklonskih PS-a može biti značajan predskazatelj tijeka bolesti, odnosno rizika progresije MGUS-a i aMM-a u simpto-matsku bolest (5,8). Općenito, nalaz >5% normalnih plazma-stanica u plazmocitnom odjeljku koštane srži povezuje s nižim rizikom za progresiju bolesti. Pri-mjerice, stopa progresije MGUS-a iznosila je 5% u bolesnika s >5% normalnih PS-a u plazmocitnom odjelj-ku koštane srži, naspram 25% u bolesnika s nalazom <5% normalnih PS-a u odnosu na ukupan broj PS-a u koštanoj srži.

Nadalje, bolesnici sa simptomatskim MM-om koji pri dijagnozi imaju >5% normalnih plazma-stanica u plazmocitnom odjeljku imaju jedinstvena klinička, biološka i citogenetska svojstva (5,8). To su prije svega manji ukupni broj plazma-stanica u koštanoj srži, više vrijednosti hemoglobina, niže vrijednosti M-komponente, manju učestalost prognostički nepovoljnih cito-genetičkih aberacija t(4;14), t(14;16) i del(17p). Navedeni bolesnici pokazuju bolji odgovor na terapiju i lijeće-nje autolognom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica kao i bolje sveukupno preživljjenje (4, 5,8).

Razina izražaja CD27 podjednaka je na normalnim plazma-stanicama i onima u MGUS-u, dok se gubitak CD27 povezuje s progresijom bolesti i obično je praćen gubitkom biljega CD19 (8).

Prognostički značaj biljega plazma-stanica

U odnosu na prognozu, pokazano je da izražaj bi-ljega CD19, CD28 i CD117 na aberantnim plazma-stanicama nosi određenu prognostičku informaciju (8). Pri tome je izražaj CD19 i CD28 povezan s kraćim trajanjem preživljjenja bez znakova progresije i uku-pnog preživljjenja u bolesnika s MM-om. Jak izražaj CD28 također se nalazi u ~60% bolesnika s medular-nim relapsom i >90% s ekstramedularnim relapsom.

Biljeg CD117 nije izražen na normalnim plazma-stanicama, ali se nalazi u ~30% bolesnika s MGUS-om i MM-om (5,7-8). Izražaj CD117 kao i β2-mikroglobulina povezan je s boljom prognozom pri čemu ekspresija β2-mikroglobulina na plazmocitnoj

membrani negativno korelira s njegovim serumskim vrijednostima, što ga čini potencijalno važnim prognostičkim biljegom (4,11). Noviji podaci govore da je gubitak CD117 praćen pojmom biljega CD200 i CD221 na malignim stanicama i progresijom bolesti što ih čini potencijalnim prognostičkim pokazateljima (8).

Mjesto i značenje drugih biljega u MM-u još uvijek nije jednoznačno određeno (7-8). To se posebice odnosi na izražaj biljega CD45 i CD56, za koje postoje proturječni podaci. Pojedina izvješća povezuju neizražaj CD45 s lošim ishodom i ukupnim preživljjenjem što se objašnjava drugim intrinzičnim čimbenicima biološkog ponašanja, uključujući ploidnost i/ili stopu proliferacije malignih stanica.

Litičke lezije kostiju i izražaj CD56/NCAM

Izražaj biljega CD56/NCAM na malignim plazmastonjacima korelira s nalazom koštanih lezija u bolesnika s MM-om, pri čemu se izražaj CD56 nalazi u gotovo 70% bolesnika s MM-om i svega 7% bolesnika s MGUS-om (8).

Detekcija cirkulirajućih plazma-stanica

Unatoč nižim vrijednostima broja plazma-stanica u odnosu na citologiju, velika osjetljivost protočne citometrije omogućuje otkrivanje vrlo malenog broja cirkulirajućih monoklonskih plazma-stanica u periferijskoj krvi koje su pokazatelj aktivnosti bolesti i važan neovisni prognostički čimbenik u bolesnika s MG-om. Ovom je metodom moguće otkriti i monoklonske plazma-stanice u produktima leukafereze iz mobilizirane periferne krvi bolesnika predviđenih za autolognu transplantaciju krvotvornih matičnih stanicama (5,8).

Dijagnostika plazmocitne leukemije

Povećani relativni ($>20\%$) i/ili absolutni broj ($>2 \times 10^9/L$) cirkulirajućih plazma-stanica služi kao dijagnostički kriterij **plazmocitne leukemije (PCL)** (5,8). Iako su kliničke značajke MM-a i PCL-a slične, te dvije bolesti predstavljaju različite entitete. Razlika postoji i u imunofenotipu malignih stanic: biljezi CD56 i CD117 su obično negativni, a izražaj CD20 češći je u PCL-u nego u MM-u (5-8). Dodatno razlikovanje primarne od sekundarne PCL-a omogućuje biljeg CD28 koji je izražen u 33% bolesnika s primarnom PCL-om i 90% bolesnika sa sekundarnom PCL-om (8).

3. Procjena odgovora na terapiju - minimalna ostatna bolest

Učinak liječenja neoplazmi krvotvornog sustava procjenjuje se na temelju kriterija za postizanje remisije bolesti pri čemu važnu ulogu ima i osjetljivost testa za mjerjenje udjela ostatnih neoplastičnih stanic, odnosno određivanja minimalne ostatne bolesti (MRD).

Određivanje MRD-a tijekom liječenja predstavlja važan prognostički faktor za tijek i ishod bolesti, a upravo su kliničke studije ALL-a u djece među prvima pokazale MRD kao važan pokazatelj ranog odgovora na liječenje i jedan od najvažnijih čimbenika rizika za relaps bolesti (13).

U monoklonskim gamapatijsama dobro je poznata činjenica da konvencionalni parametri, kao što su citologija koštane srži i serumska razina imunoglobulina nisu dovoljno osjetljivi pokazatelji odgovora na liječenje (5-8). Nasuprot tome, protočna citometrija ima razinu osjetljivosti od 10^{-4} (detekcija 1 aberantne stanice na 10.000 stanica u uzorku), a metoda PCR $<10^{-5}$ (5,8,14). Međutim, protočna citometrija se može primijeniti u znatno većem broju bolesnika (80-90%), jeftinija je i vremenski manje zahtjevna od metode PCR. U tom je smislu zanimljiv podatak da su određivanje minimalne ostatne bolesti u MM-u pojedini autori proglašili jednim od pet najvažnijih skorašnjih postignuća hematopatologije (15)!

Obje metode trenutno se rabe za otkrivanje i razlikovanje dviju rizičnih skupina bolesnika MM-a na temelju udjela aberantnih plazma-stanica u uzorku, pri čemu nalaz $<10^{-4}$ ($<0,01\%$) aberantnih plazma-stanica na ukupan broj stanic u ispitivanom uzorku koštane srži definira tzv. imunofenotipsku remisiju. Drugim tijecima, nalaz $<10^{-4}$ stanica (MRD-neg. status) predstavlja mali rizik, a nalaz $>10^{-4}$ aberantnih plazma-stanica (MRD-poz. status) veliki rizik za progresiju bolesti i kraće sveukupno preživljjenje (8,13,15). Odsutnost MRD, odnosno imunofenotipska remisija najrelevantniji je neovisni prognostički čimbenik u bolesnika liječenih visokim dozama melfalana i transplantacijom autolognih krvotvornih matičnih stanic pri čemu se stratifikacija rizika prema razini MRD-a određuje tri mjeseca nakon transplantacije (14). Rezultati nedavno objavljenih studija dodatno potvrđuju kliničko značenje protočnociometrijskog određivanja MRD-a u bolesnika s MM-om na razini 10^{-4} (16-17).

Značaj protočne citometrije u određivanju MRD-a za procjenu učinka terapije i prognozu bolesti dodatno je potvrdila *The International Myeloma Working Group* uvrstivši taj parametar kao kriterij za definiciju striktnog kompletног odgovora (sCR) (9). Pored ostalog, sCR zahtjeva odsutnost aberantnih/monoklonalnih plazma-stanica protočnociometrijskom analizom minimalno 10^6 stanic koštane srži, kao i normalan omjer slobodnih lakih lanaca u serumu (5,9).

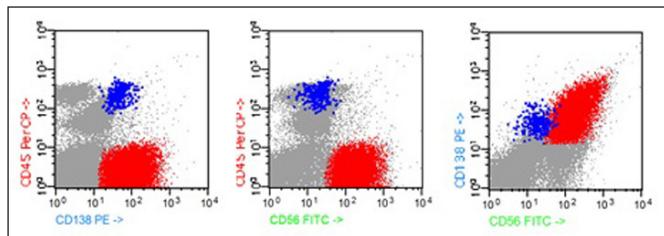
S metodološkog aspekta, pouzdana procjena minimalne ostatne bolesti zahtjeva detekciju najmanje 100 aberantnih/malignih PS-a na milijun stanic u uzorku (osjetljivost 0,01%) što je svakako otežano u „suhim“ aspiratima, kao i slučaju slabe celularnosti koštane srži (5,8,9). S primjenom osmerostrukog bojenja sta-

nica (kao npr. s panelom EuroFlow) za očekivati još veću specifičnost i osjetljivost metode, na razini $<10^5$.

Imunofenotipizacija monoklonskih gamapatijskih bolesti

Iz gore navedenog se može jasno iščitati zahtjev za standardiziranim protočnacitometrijskim pristupom u dijagnostici monoklonskih gamapatijskih bolesti. Pri tome je važno istaknuti da imunofenotipizacija primjenom ograničenog broja biljega/parametara (npr. ≤4-struktu bojanje) na obično malom broju plazma-stanica u uzorcima koštane srži *nije* u mogućnosti otkriti monoklonske plazma-stanice, niti specifično razlikovati normalne od aberantnih plazma-stanica, a pogotovo ne u cilju određivanja minimalne ostatne bolesti. Nove generacije protočnih citometara s tri lasera i mogućnošću istodobne analize najmanje 6, a optimalno 8 boja/biljega povećavaju osjetljivost i specifičnost metodologije, što protočnu citometriju stavlja u položaj nezaobilazne tehnike za rutinsku dijagnostičku obradu i praćenje bolesnika s MG-om.

Suvremenih kliničkih citometara s 8 boja u Hrvatskoj još uvijek nema, pa su mogućnosti imunofenotipske dijagnostike ograničeni i svedeni na 4-6 boja, ovisno o laboratoriju. Stoga je za točnu i pouzdanu dijagnostiku i praćenje monoklonskih gamapatijskih bolesti, osim nabave odgovarajuće opreme, reagencija i sofisticiranih računalnih programa potrebna i edukacija analitičara i kliničara o mogućnostima i dometima protočne citometrije u svakodnevnom rutinskom radu kako bi se na najbolji mogući način implementirale najnovije preporuke struke.



Slika 1. Aspirat koštane srži: aberantne (mijelomske) plazma-stanice prikazane su crvenom, rezidualne normalne plazma-stanice plavom, a sve ostale stanice hematopoeze sivom bojom. Normalne i mijelomske plazma-stanice izražavaju biljeg CD138. Za razliku od normalnih plazma-stanica, mijelomske plazma-stanice pokazuju aberacije u vidu izražaja biljega NK-stanica CD56 i neizražaja pan-leukocitnog biljega CD45. Analiza je učinjena s pomoću citometra BD FACS Calibur i programa Paint-A-Gate (BD Biosciences).

LITERATURA

- Batinić D. Imunološka fenotipizacija akutnih leukemija dječje dobi. Paediatr Croat 1997;41(Suppl 1): 189-93.
- Batinić D, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. Paediatr Croat 2006; 50(Suppl 1): 176-82.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. 4th edition WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC; 2008.
- Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. Best Pract Res Clin Haematol 2010;23(3): 433-51.
- Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. Cytometry B Clin Cytom 2010;78(4): 239-52.
- Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. Haematologica 2008;93(3): 431-8.
- Yuan CM, Stetler-Stevenson M. Role of flow cytometry of peripheral blood and bone marrow aspirates in early myeloma. Semin Hematol. 2011;48(1):32-8.
- Raja KRM, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. Brit J Haematol. 2010;149:334-51.
- Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. Blood 2011;117(18): 4691-5.
- van Dongen JJ, Orfao A. EuroFlow Consortium. EuroFlow: Resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. Leukemia 2012;26(9): 1899-907.
- van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia 2012;26(9): 1908-75.
- de Larrea CF, Kyle RA, Durie BGM, Ludwig H, Usmani S, Vesole DH, et al. Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group. Leukemia 2013;4: 780-91.
- Dubravčić K, Batinić D. Imunofenotipizacija akutnih leukemija i minimalna ostatna bolest. Paediatr Croat 2013;57 (Suppl 1): 258-62.
- Paiva B, Vidriales MB, Cerveró J, et al; GEM (Grupo Español de MM)/PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) Cooperative Study Groups. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. Blood. 2008; 112(10): 4017-23.
- Shi M, Xiao R, Woda BA, Yu H. Five important advances in hematopathology. Arch Pathol Lab Med. 2014;138(3):410-9.
- Munshi NC, Anderson KC. Minimal residual disease in multiple myeloma. J Clin Oncol. 2013;31(20):2523-6.
- Puig N, Sarasquete ME, Balanzategui A, Martínez J, Paiva B, García H, et al. Critical evaluation of ASO RQ-PSR for minimal residual disease evaluation in multiple myeloma. A comparative analysis with flow cytometry. Leukemia. 2014;28(2):391-7.

Registar oboljelih od multiplog mijeloma i bolesti plazma stanica

**Josip Batinić, Zinaida Perić, Alen Ostojić,
Damir Nemet**
**Zavod za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti
KBC Zagreb i Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet**

*Adresa autora za kontaktiranje:
Josip Batinić, dr. med.
Zavod za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti
KBC Zagreb i Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet
E-pošta: josip.batinic@gmail.com*

Registrar oboljelih od multiplog mijeloma i bolesti plazma stanica aktivan je već 5 godina, od listopada 2008. godine. U tom periodu registrar je redovito predstavljan na sastancima Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (Krohem) te radnim skupinama za multipli mijelom unutar Krohem-a, na kojima se izvještavalo o stanju u registru, raspravljalo se o nedostatcima, od kojih su neki i ispravljeni. Posljednji put o registru se raspravljalo u veljači 2013. godine na sastanku radne skupine za multipli mijelom te ponovno u svibnju 2013. na redovnom sastanku Krohem-a. Na navedenim sastancima predstavljena je statistička analiza podataka, ovog puta ne samo epidemiološki podaci već se pokušalo provesti pravu statističku analizu preživljenja tj. korelaciju pojedinih laboratorijskih parametara i preživljenja. Dobiveni su sljedeći rezultati.

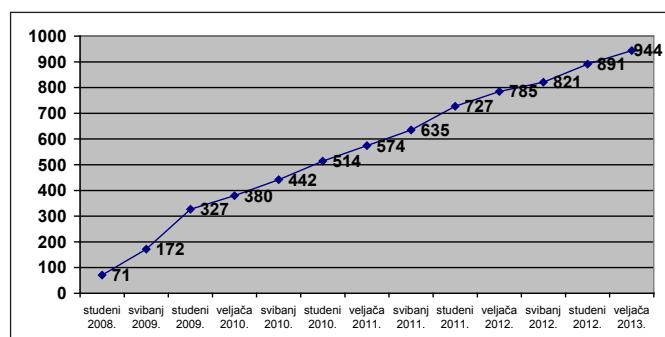
Do veljače 2013. godine u registrar je upisano ukupno 944 bolesnika, kako je prikazano u Tablici 1.

CENTAR	BROJ UPISANIH BOLESNIKA
KBC Zagreb	180
KBC Split	111
KB Merkur	91
KBC Rijeka	77
KBC Osijek	77
KBC "Sestre milosrdnice"	55
OB Koprivnica	54
OB Šibenik	49
OB Varaždin	48
KB Dubrava	46
OB Dubrovnik	32
OB Karlovac	30
OB Slavonski Brod	24
OB Pula	19
OB Sveti Duh	14

OB Sisak	13
OB Virovitica	12
OB Čakovec	7
OB Zadar	5
OB Požega	0
UKUPNO	944

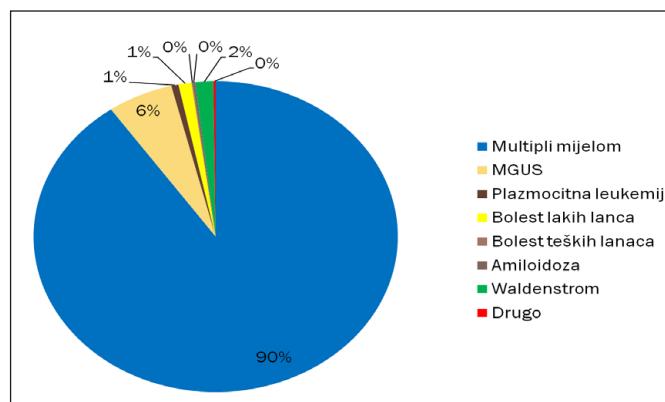
Tablica 1.: Broj upisanih bolesnika po centrima.

Upravo zahvaljujući trajnom i redovitom predstavljanju registra, motivaciji i predanosti svih uključenih, registrar bilježi stalni porast broja upisanih bolesnika i podataka, što zorno prikazuje slika (Slika 1.).



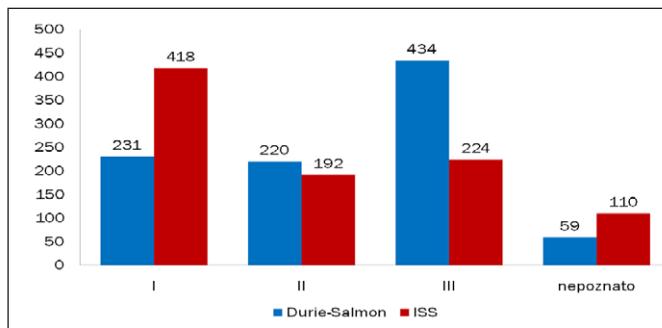
Slika 1.: Unos podataka u register.

Analizom podataka prema dobi i spolu dobiveni su sljedeći podaci: u registar je upisano 470 bolesnika i 474 bolesnice, u rasponu dobi od 29 do 89,7 godina, s očekivanim medijanom dobi od 67,28 godina. Očekivano, upisano je najviše bolesnika s multiplim mijelomom (852), slijede bolesnici s MGUS-om (55), plazmocitnom leukemijom (6), bolesti lakih lanaca (11), Waldenströmovom makroglobulinemijom (15), bolesti teških lanaca (1) i amiloidozom (2) te 2 bolesnika kod kojih pod kategorijom dijagnoza označeno "drugo" (Slika 2.).



Slika 2.: Podjela po dijagnozama.

Prema stadiju bolesti najveći broj bolesnika je bio stadija III prema Durie-Salmonovoj klasifikaciji, odnosno stadija I prema ISS klasifikaciji. U kategoriji klasifikacija je ispravljen i nedostatak, a to je da je prije, sam registar dodjeljivao stadij I ako se podatak nije promijenio kod unosa, što je vrijedilo i za sve dijagnoze. Greška je ispravljena dodavanjem kategorije 0 koja je automatski dodijeljena bez obzira na dijagnozu, a tek ako se radi o bolesniku s multiplim mijelomom, klasifikacija se promjeni u odgovarajući stadij. Međutim, ovom promjenom pojavio se novi nedostatak, a to je da sada u registru postoje bolesnici s multiplim mijelomom i klasifikacijom 0, tj. nepoznatim stadijem bolesti. Naravno, ovaj nedostatak se može lako ispraviti ažuriranjem podataka kod već unesenih bolesnika tj. točnim unosom kod unošenja podataka za novog bolesnika (Slika 3.).

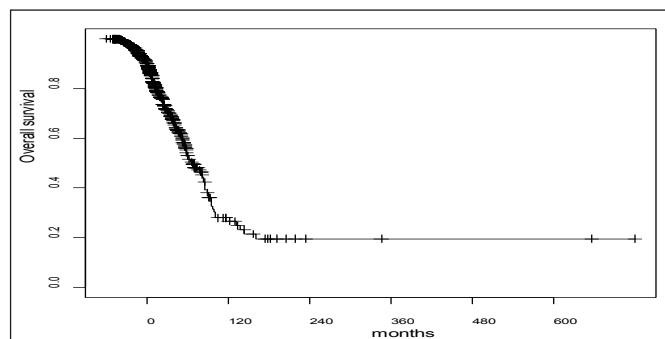


Slika 3.: Podjela bolesnika prema stadiju bolesti.

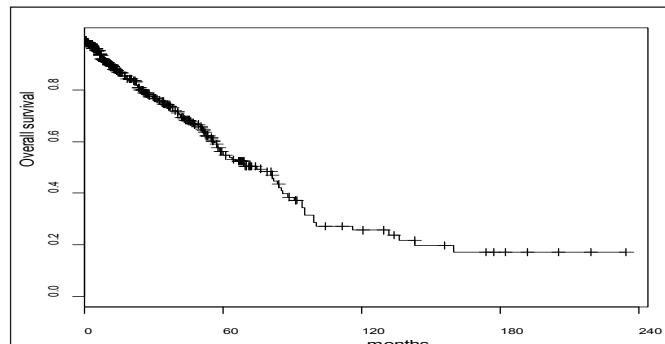
Kao što je već rečeno, učinjena je statistička analiza podataka u registru kojom se pokušalo dobiti detaljniji uvid u populaciju bolesnika s multiplim mijelomom, ali i u unesene podatke. Analiza je pokazala još neke nedostatke i greške koje je potrebno ispraviti. Na primjer, obradom podataka za vrijednost hemoglobina kod dijagnoze dobiven je medijan od 40 g/L s rasponom od 0.01 do 173 g/L. Dobivene vrijednosti očito su posljedica pogrešaka prilikom unošenja vrijednosti u registar, a pročišćavanjem podataka tj. cenzuriranjem onih podataka koji jako odstupaju od mogućih i/ili očekivanih vrijednosti dobiven je medijan za vrijednost hemoglobina od 108 g/L. Slično je i s drugim laboratorijskim podacima što je prikazano u tablici 2. Napominjemo

također da za neke bolesnike nisu unesene sve laboratorijske vrijednosti.

Učinjena je i analiza preživljaja za sve bolesnike u registru neovisno o dijagnozi i dobiven je rezultat da neki bolesnici (skoro 20%) imaju preživljenje više od 600 mjeseci (Slika 4.). Naravno, ponovno se radi o grešci prilikom unošenja podataka; najvjerojatnije je zabunom datum rođenja upisan kao datum dijagnoze i/ili su datum praćenja i datum postavljanja dijagnoze zamijenjeni. Za najveću grupu bolesnika, one s multiplim mijelomom, baza podataka je pročišćena te potom učinjena analiza preživljaja prema kojoj je medijan preživljena oko 60 mjeseci (Slika 5.), što odgovara i podacima u literaturi.



Slika 4.: Ukupno preživljenje svih bolesnika u registru.

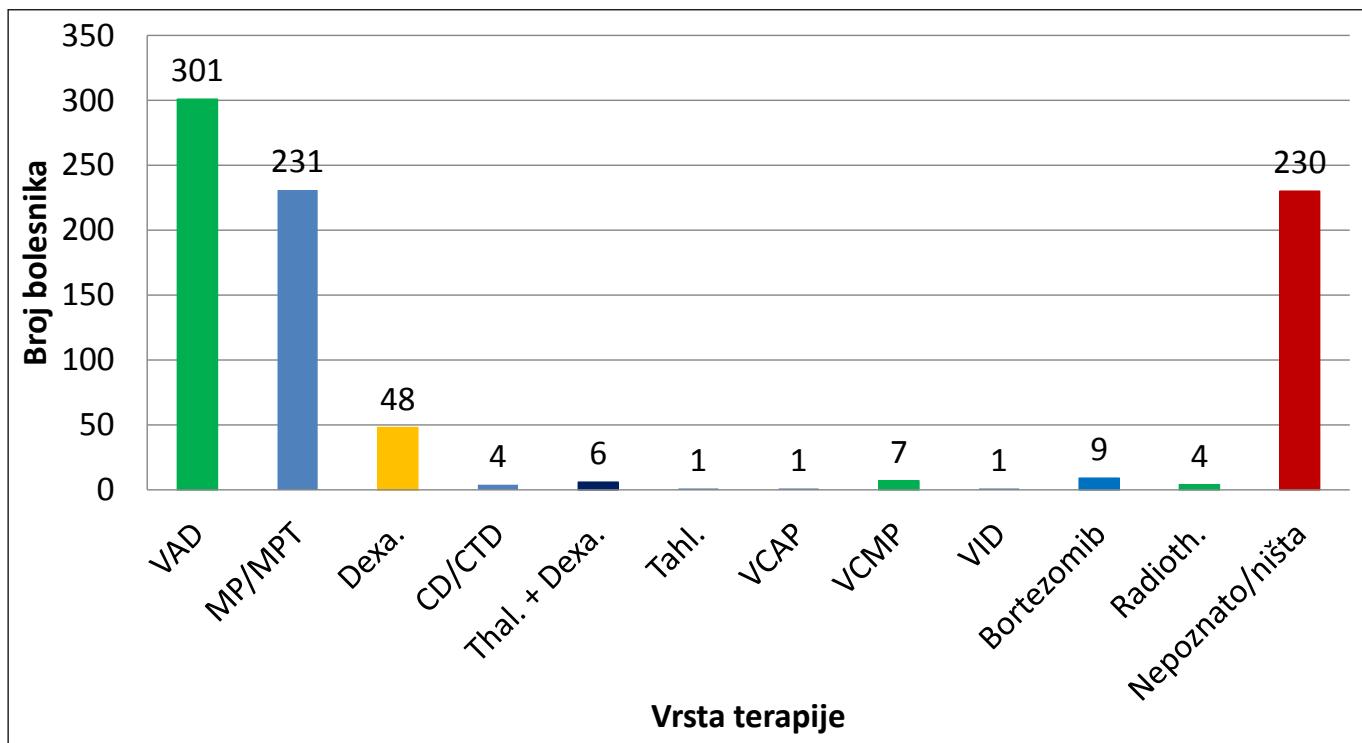


Slika 5.: Preživljenje bolesnika s multiplim mijelomom.

Od protokola u prvoj liniji terapiji, najčešće je primjenjivana polikemoterapija po VAD protokolu (301 bolesnik), potom slijedi MP/MPT protokol (231), samo deksametazon (48) te ostali protokoli u malog broja bolesnika (Slika 6.). Za velik broj bolesnika, njih 230 nije upisan podatak o prvoj liniji terapije.

POKAZATELJ	RASPON	MEDIJAN	KORIGIRANO	BROJ BOLESNIKA
Hemoglobin (g/L)	0.01-173	40	108	700
Trombociti ($\times 10^9/L$)	11-689	215	moguće točne vrijednosti	693
Kalcij (mmol/L)	1-183	4.76	2.34	665
Albumin (g/L)	2.2-158	14.4	39	647
beta-2-mikroglobulin (mg/L)	1-88	4.04	moguće točna vrijednost medijana	512

Tablica 2.: Analiza laboratorijskih vrijednosti.



Slika 6.: Prva linija terapije u bolesnika s multiplim mijelomom.

Iz svega navedenog vidljivo je da se registar bolesnika oboljelih od bolesti plazma stanica kontinuirano upotpunjavao i razvijao, ali da su i dalje potrebni ispravci i nadogradnja. Pod tim se prvenstveno misli na ažuriranje i ispravljanje unesenih podataka (klasifikacije stadija bolesti, laboratorijski podaci, datum rođenja, linija terapije), točnija formulacija pojedinih polja i kategorija tj. dodavanje novih ako je potrebno, kako bi se dobio točniji i kvalitetniji uvid u karakteristike ove populacije bolesnika. Na kraju željeli bismo zahvaliti informatičarima Robertu Kufneru i Miroslavu Dadiću na pomoći u prikupljanju podataka iz registra.

Zrele B stanične novotvorine s plazmablastičnom diferencijacijom

**Slavko Gašparov^{1,2}, Jasmina Rajc^{3,4},
Jasminka Sinčić Petričević⁵, Anita Škrtić^{1,2}**

¹ Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagreb, Zagreb

² Klinički zavod za patologiju i citologiju KB Merkur, Zagreb

³ Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu KBC Osijek

⁴ Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku

⁵ Klinika za unutarnje bolesti KBC Osijek

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Slavko Gašparov, dr. med

Zavod za patologiju MF Zagreb

Klinički zavod za patologiju i citologiju KB Merkur

e-mail: gasparovslavko@gmail.com

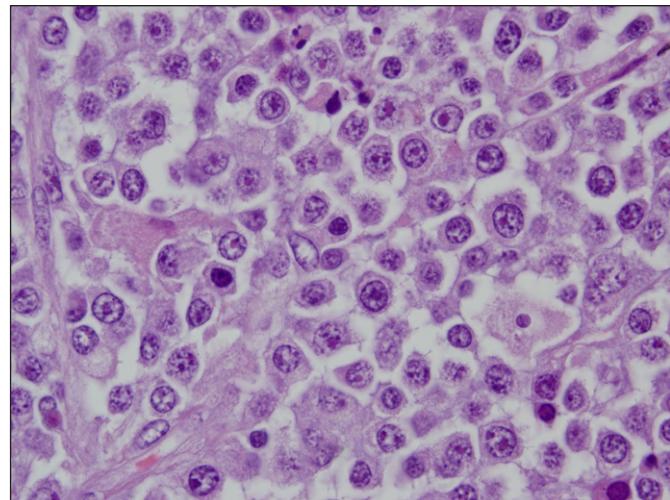
Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije hematoloških bolesti zrele B stanične novotvorine s plazmastaničnom diferencijacijom predstavljaju heterogenu skupinu tumora s obzirom na etiopatogenezu, kliničku sliku i terapijski odgovor, no s vrlo sličnim morfološkim i imunofenotipskim obilježjima (1). U ovu skupinu ubrajaju se: plazmablastični limfom (PBL), limfom marginalne zone MALT-tipa, limfoplazmacitni limfom, imunoblastična varijanta difuznog B velikostaničnog limfoma (DLBCL NOS), plazmablastična varijanta ekstramedularnog plazmocitoma (PEMP) te ekstramedularni diseminirani oblik multiplog mijeloma (EMMM) (1-5).

Između opisanih entiteta najveći izazov predstavlja razlikovanje PBL-a te PEMP-a i EMMM-a (2-5). PBL predstavlja difuznu proliferaciju velikih tumorskih stanica morfološki sličnog izgleda B imunoblastima izražavajući međutim plazmastanični imunofenotip. Za razlikovanje PBL-a i PEMP-a svakako je najvažnija ekspresija jednog od latentnih gena EBV-EBER1 metodom *in situ* hibridizacije (EBV-ISH) (2,4,5).

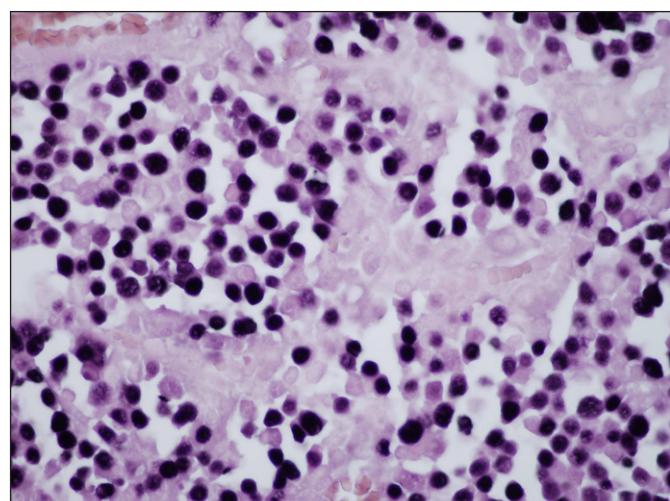
Samo na temelju morfološke slike nemoguće je razlikovati PEMP od EMMM-a te u takvim slučajevima osim kliničke prezentacije može pomoći i dodatna imunohistokemijska i citogenetička analiza. EMMM češće ima ekspresiju CD56, BCL1 i p53 u usporedbi s PEMP-om u kojem navedeni proteini nisu izraženi, i u kojeg se gotovo nikada ne nalazi translokacija t(11;14)(q13;q32). U primjerima dva-

ju bolesnika prikazujemo dijagnostičke probleme i dvojbe koje se mogu pojaviti u ovoj skupini tumora.

Slučaj 1: Muškracu u dobi od 29 godina učinjena je eksicija kože veličine 15:14:7 cm u području sakrume pod kliničkom dijagnozom pilonidalnog sinusa. Cijela debljina dermisa sve do baze resekcije prožeta je tumorskim tkivom. Tumor je građen od atipičnih velikih stanica, velikih jezgara s istaknutim nukleolima (Slika 1.). U pojedinim stanicama prisutno je i perinuklearno prosvjetljenje. Sve tumorske stanice su EBER1 pozitivne, a tek djelomično CD138 i MUM1 (Slika 2.). Svi ostali biljezi su bili negativni (CD20, CD19, CD79a, PAX5, CD38, CD30, BCL6, CD10, ALK, CD5, EMA, LCA, CD56, CD3, HHV-8). Postavljena je dijagnoza PBL.



Slika 1. Velike atipične stanice s istaknutim eozinofilnim nukleolima – plazmablasti. (H&E, 400x)



Slika 2. Intranuklearna EBER1 pozitivna reakcija. (EBV-ISH, 200x)

Laboratorijski niti klinički nije bilo obilježja multiplog mijeloma, a bolesnik nije bio imunokom-promitiran (HIV, lijekovi).

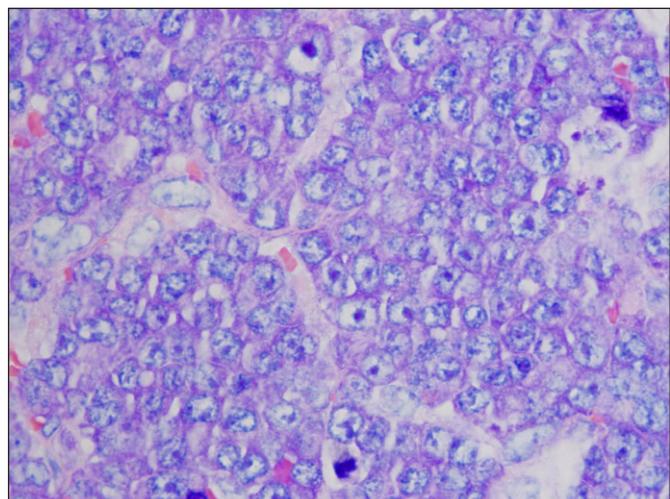
Za inicijalnu procjenu proširenosti bolesti bolesniku je prema protokolu učinjen PET-CT te je procijenjen klinički stadij IIA (6). U bolesnika je provedeno 7 ciklusa kemoterapije po shemi DA-EPOCH nakon koje je prema algoritmu procjene odgovora na terapiju postignuta parcijalna remisija (6). Učinjena je i transplantacija autolognih matičnih krvotvornih stanica, a nakon toga i radioterapija zahvaćene presakralne regije. Nakon ponovljene reevaluacije bolesnik je u kompletnoj remisiji 28 mjeseci (6).

EBER1 pozitivitet tumorskih stanica uz morfološko obilježje (perinuklearno prosvjetljenje) vrlo je važan za dijagnozu PBL-a kao i za razlikovanje PBL-a od imunoblastične varijante DLBCL NOS-a. Plazmablastični limfom je rijedak tip DLBCL-a (manje od 1% svih NHL) koji može imati identična morfološka obilježja kao i imunoblastični DLBCL NOS uz plazmastanični imunofenotip (CD20-, CD138+, CD38+). Oralni tip PBL koji zahvaća usnu šupljinu je najčešći oblik PBL-a, dok je tzv. ne-oralni tip PBL-a rijedak oblik, pojavljuje se izvan usne šupljine, može zahvatiti kožu te su bolesnici najčešće u vrijeme postavljanja dijagnoze u kliničkom stadiju IV. EBER1 je također jedini parametar za razlikovanje PBL-a prema PEMP-u. Potrebno je svakako spomenuti da su opisani i slučajevi PEMP-a koji su bili EBER1 pozitivni što još više otežava postavljanje točne dijagnoze.

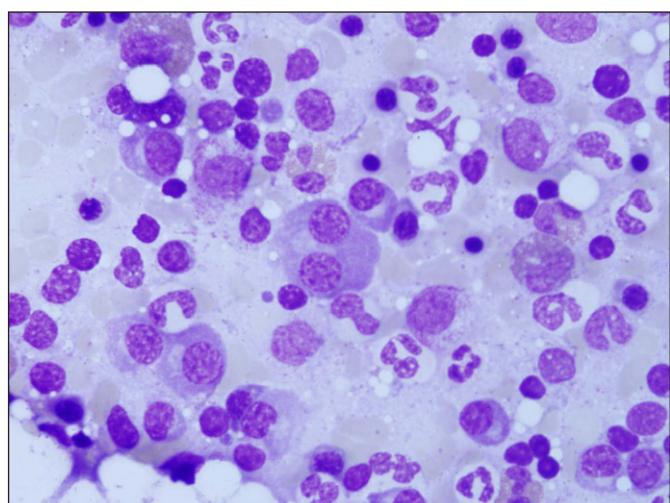
Slučaj 2: Muškarac u dobi od 70 godina je zaprimljen u bolnicu zbog bezbolne žutice. Tri godine prije učinjena mu je orhidektomija u svrhu liječenja karcinoma prostate. Kliničkim pregledom utvrđen je infiltrat glave gušterače i mezokolona. Citološkom punkcijom tankom iglom je postavljena sumnja na limfom. Učinjena je abdominalna eksploracija u svrhu koledohojejunoanastomoze i uzimanja uzorka tumora glave gušterače i mezokolona za patohistološku analizu.

U oba uzorka tumor je građen od velikih atipičnih stanica s istaknutim nukleolima unutar velikih jezgara, te oskudnih citoplazmi (Slika 3.). Imuhistokemijski tumorske stanice su CD138, CD38, EMA i MUM1 pozitivne dok su svi ostali biljezi bili negativni (CD20, LCA, PAX5, CD79a, CD19, CD30, EBER1, HHV-8, CD56, BCL1, p53). Postavljena je dijagnoza plazmablastičnog ekstramedularnog plazmacitoma. Analizom citoloških razmaza aspirata

koštane srži nađeno je 35% atipičnih, malih, dobro diferenciranih plazma stanica citološkog gradusa I, koje su se morfološki razlikovale od tumorskih stanica u gušterači i mezokolonu iako su izražavale istovjetni imunofenotip (Slika 4.).



Slika 3. Plazmablasti istaknutih nukleola. (Giemsa, 400x)



Slika 4. Dobro diferencirane plazma stanice. Aspirat koštane srži. (May Grünwald Giemsa, 600x)

Laboratorijskom obradom i kliničkim pregledom bolesnika uočena je povisena vrijednost serumskog beta₂ mikroglobulina, Bence Jones proteina u urinu (lambda tipa). Nisu nađene osteolitičke lezije kostiju.

U bolesnika je provedeno liječenje sa 6 ciklusa kemoterapije po shemi CHOP. Reevaluacijom koštane srži već nakon prva dva ciklusa nisu nađene tumorske plazma stanice. Mjesec dana nakon završetka kemoterapije tumor promjera 1 cm pojavljuje se u postoperativnom ožiljku. Citološki punktat tvorbe, koji je analiziran i protočnom citometrijom, odgovara homogenoj populaciji stanica CD38+, CD138+ s ekspresijom lakih lanaca tipa lambda. CT-om ab-

domena prikazala se povećana tumorska tvorba u području hvatišta mezeterija uz opsežan ascites. Periferni limfni čvorovi nisu bili povećani. Iznenadna smrt je nastupila unutar 24 sati od primitka u bolniču, osam mjeseci od postavljanja dijagnoze.

Istovremeno pojavljivanje plazmastaničnog tumora u koštanoj srži, gušteraci i mezokolonu, iako morfološki različitog stupnja diferenciranosti (dobre diferencirane plazma stanice vs. plazmablasti), diferencijalno dijagnostički ukazuje na otvoreno pitanje EMMM-a i PEMP-a. Dodatna imunohistokemijska (negativni p53, CD56 i BCL1) i molekularna obrada (ne nalazi se translokacija gena *BCL1* niti gena *c-MYC*) u ovom slučaju više govori u prilog ekstramedularne diseminacije multiplog mijeloma (EMMM).

Stanice EMMM-a kao posljedica direktnog širenja tumora iz osteolitičkih lezija mogu imati slabiji stupanj diferenciranosti no još uvijek pokazuju morfološka obilježja plazma stanica (3). U EMMM-u metastatskog tipa širenja plazma stanice obično imaju morfološke karakteristike plazmablasta, te ne stvaraju teške lance imunoglobulina već luče samo lake lance imunoglobulina (3). Obično takvi bolesnici pokazuju dobar odgovor na konvencionalnu kemo-terapiju u smislu redukcije tumora u koštanoj srži te smanjenju količinu M-komponente u serumu (3). Citogenetičke promjene u tumorskim plazma stanicama nisu *per se* odgovorne za ekstramedularno širenje bolesti (3). Mogućnost uvođenja terapijskih protokola za limfome u kombiniranom liječenju bolesnika s EMMM-om u smjernice liječenja multiplog mijeloma predstavlja novi izazov u pristupu bolesnika s EMMM-om (3). Prethodno razloženim pristupom tumorima s plazmablastičnom diferencijacijom može se reći da su zadovoljeni i kriteriji Coloma i suradnika za treći podtip tumora s plazmablastičnom slikom istovremenog ili uzastopnog pojavljivanja uz multipli mijelom te time još jednom potvrdili obilježja heterogenosti i sličnosti ove skupine tumora (2).

LITERATURA:

1. Swredlow 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. 2008 IARC, Lyon, France.
2. Colomo L, Loong F, Rives S, Pittalluga S, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Ojanguren J, Romagosa V, Jaffe ES, Campo E. Diffuse large B-cell lymphoma with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. Am J Surg Pathol. 2004; 28:736-47.
3. Blade J, de Larrea CF, Rosinol L, Cibeira MT, Jimenez R, Powles R. Soft-Tissue Plasmacytoma in Multiple Myeloma: Incidence, Mechanisms, of Extramedullary Spread and Treatment. J Clin Oncol 2011;29:3805-3812.
4. Fend F, Quintanilla-Martinez L. B-cell neoplasms with plasmacellular and plasmablastic differentiation. Pathologe, 2013;34:198-209.
5. Hsi ED, Lorsbach RB, Fend F, Dogan A. Plasmablastic lymphoma and related disorders. Am J Clin Pathol. 2012;136:183-194.
6. Aurer I, Gašparov S, Kralik M, Balenović A, Huić D, Šantek F, Duletić-Načinović A, Pejša V, Ostojić-Kolonić S, Grah JJ. Dijagnostika i liječenje limfoma- drugi hrvatski konsenzus. Lijec Vjesn. 2013;135(3-4):63-76.

CELG-AML1 i KROHEM-AML1 opservacijska studija – preliminarni podaci

Alen Ostojić¹ i Radovan Vrhovac^{1,2}

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

² Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa autora za kontaktiranje:

Alen Ostojić, dr. med.

Zavod za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti
KBC Zagreb i Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet
E-pošta: aostonic@kbc-zagreb.hr

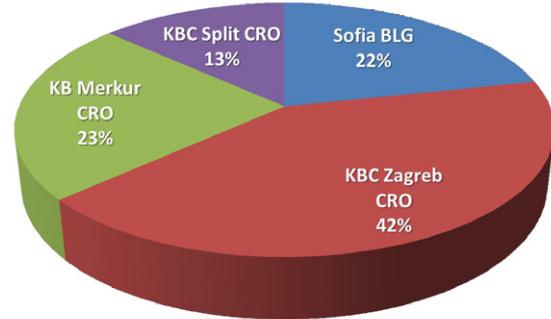
Na prethodnom jesenskom sastanku KROHEM-a u Svetom Martinu na Muri prikazani su preliminarni podaci iz registra CELG-AML1 i KROHEM-AML1 opservacijske studije s ukupno do tada uključenih 60 bolesnika oboljelih od akutne mijeloične leukemije (AML), od toga 50 iz hrvatskih, te 13 iz jednog bugarskog centra (Slika 1.). Medijan dobi bolesnika iznosio je 57 godina (raspon 20-84), bez značajne razlike prema spolu (Slika 2.), no različite dobne strukture u pojedinim centrima. Oko 50% bolesnika pri dijagnozi bilo je procijenjenog općeg stanja ECOG 1 do 2. U 46 od 60 bolesnika pri dijagnozi učinjen je klasični kariogram od kojih je 18 imalo citogenetske aberacije. U 31 bolesnika učinjen je FISH, a PCR kod njih 42.

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine, 10 bolesnika imalo je AML iz/za značajkama mijelodisplazije, 9 bolesnika AML s rekurentnim genetskim promjenama, a za 5 bolesnika nije navedena dijagnoza prema SZO (Slika 3.). Trideset i osam posto bolesnika klasificirani su kao bolesnici s nepovoljnim rizikom (Slika 4.) prethodno provođenju induksijske terapije. Klasičnu induksijsku terapiju sa standardnim dozama citarabina uz antraciklin s ili bez etopozida primilo je 65% bolesnika, 6% visoke doze citarabina, dok u 42% bolesnika terapija nije provedena (Slika 5.). Na primjenjenu induksijsku terapiju 34% i 10 % bolesnika odgovorilo je kompletom, odnosno parcijalnom remisijom, dok za 36% bolesnika odgovor u trenutku analize podataka nije bio poznat. Ponovnom procjenom rizika prije provođenja konsolidacijske kemoterapije, 5% bolesnika imalo je povoljan, 15% intermedijni, a 13% nepovoljni prognostički rizik, dok za 67% bolesnika podatak nije bio poznat (Slika 4.). Konsolidacijsku terapiju sa standardnim dozama citarabina uz antraciklin primilo je 23% bolesnika, a njih 8% visoke doze citarabina, dok za njih 50% podatak o konsolidacijskoj terapiji nije poznat.

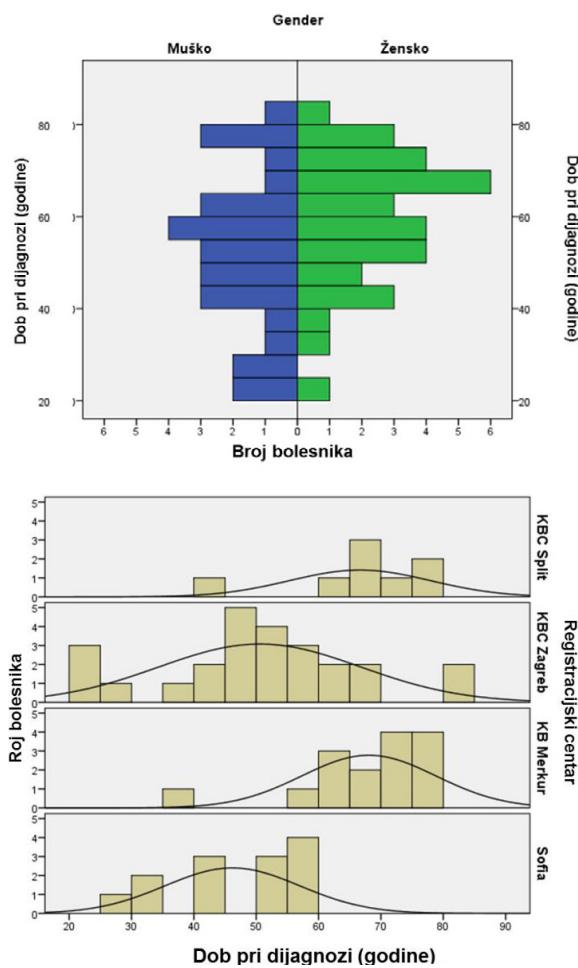
Analizom ovih preliminarnih podataka uočljive

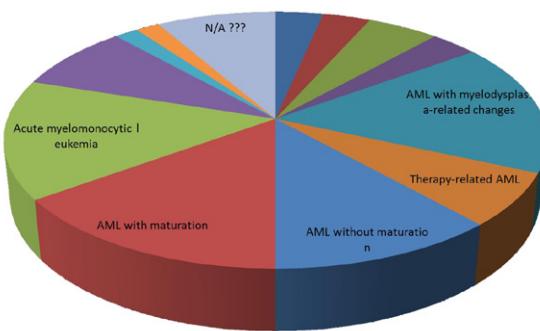
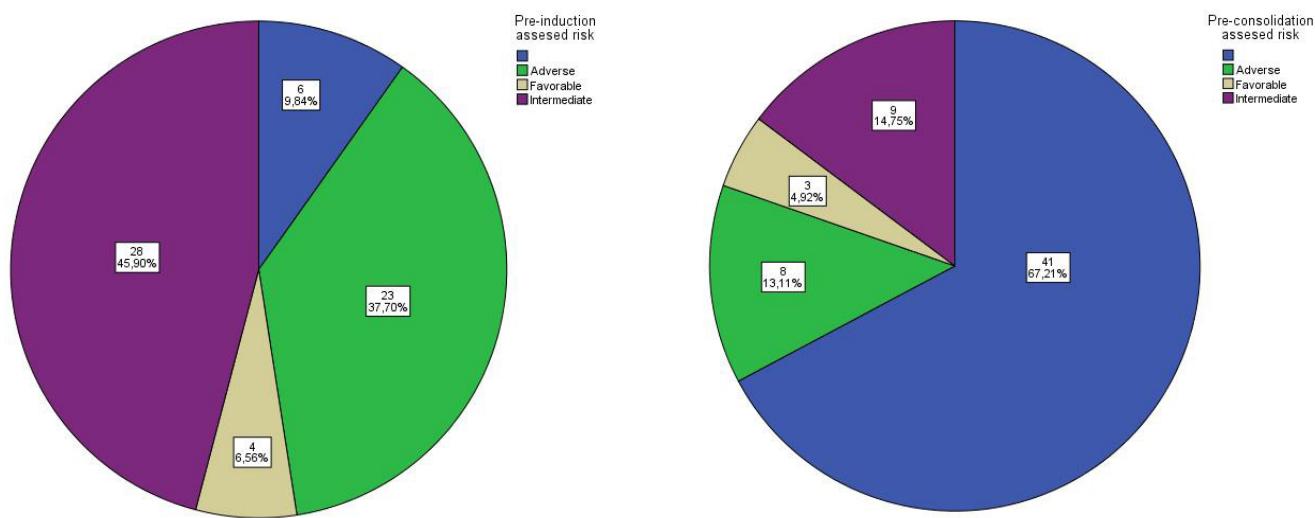
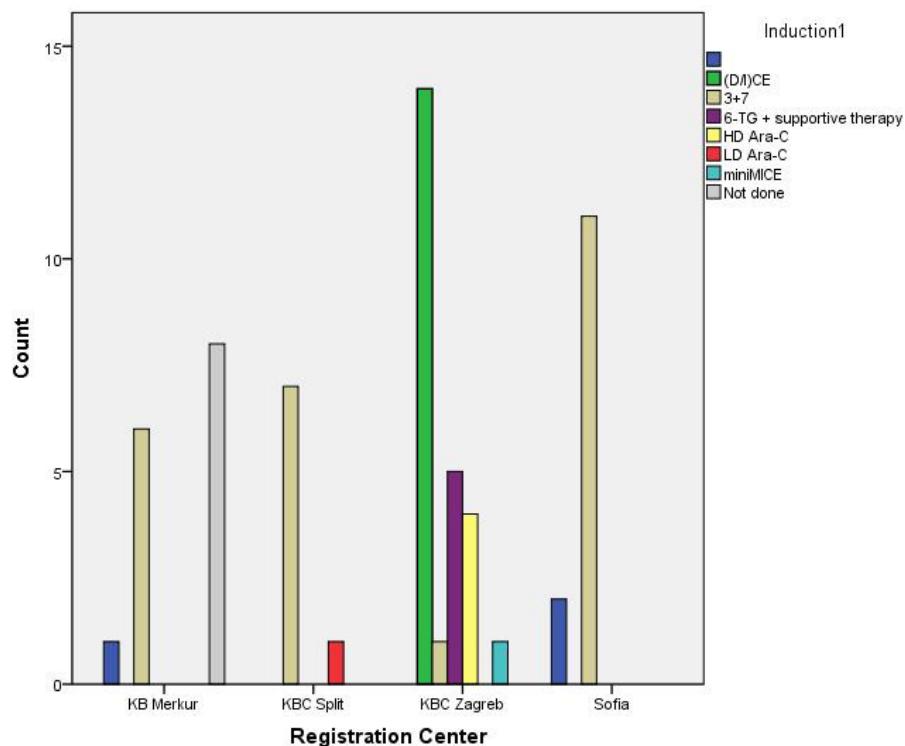
su demografske razlike među bolesnicima liječenima u pojedinim centrima kao i terapijski pristup. Ipak, radi se o evaluaciji podataka o bolesnicima kod kojih potpuni podaci o liječenju i odgovoru objektivno i nisu mogli biti dostupni budući da je u značajnog broja njih liječenje u trenutku analize još bilo u tijeku. Kvalitetniji i potpuniji podaci u будуćnosti mogu pružiti vrijedne podatke o demografskim osobitostima bolesnika, različitim terapijskim pristupima i njihovoj djelotvornosti, barem na razini Republike Hrvatske.

Slika 1. Broj bolesnika u pojedinim Centrima



Slika 2. Distribucija dobi bolesnika



Slika 3. Dijagnoza AML prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji**Slika 4. Procijenjeni rizik prije indukcije/konsolidacije****Slika 5. Indukcijska terapija**

Prikaz citomorfoloških dijagnoza akutnih leukemija u KBC-u Zagreb tijekom dva trogodišnja perioda

Koraljka Gjadrov Kuveždić i Sunčica Ries

Klinički zavod za patologiju i citologiju

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: kgjadrov@kbc-zagreb.hr

Uvod

U Kliničkoj jedinici za hematološku, urološku, citologiju dojke i ORL citologiju od 2000.-te godine citomorfološke dijagnoze hematoloških bolesti svrstavamo prema klasifikaciji mijeloičnih i limfoidnih neoplazmi Svjetske zdravstvene organizacije (SZO).

Cilj rada bio je prikazati citomorfološke dijagnoze akutnih leukemija između dva trogodišnja perioda: od 2006. do 2008. godine (prije objave 4. izdanja SZO klasifikacije) i od 2011. do 31.10. 2013. godine. Novina u posljednjem izdanju SZO klasifikacije je izdvajanje većeg broja akutnih leukemija prema citogenetičkim i molekularnim promjenama koje se u njima javljaju. Željeli smo istražiti kako se ta činjenica odražava na kretanje postavljanih citomorfoloških dijagnoza u našoj kliničkoj jedinici.

Bolesnici i metode

U istraživanje su uvršteni svi bolesnici bez obzira na dob, čiji su uzorci koštane srži analizirani u našoj kliničkoj jedinici i kojima je postavljena dijagnoza akutne leukemije. Pri punkciji korištena je igla "Perfectus" (Medax, Italija) a punkcija je rađena na području prsne kosti, prednje krste ilijačne kosti i, rijetko, stražnje krste ilijačne kosti. Uz uzorak koštane srži svim bolesnicima uzet je i uzorak periferne krvi. Uzroci naneseni na predmetna stakla standardno su bojani May-Gruenwald Giemsa bojenjem (MGG); mijelogram je određen udjelom pojedinih stanica u 500 izbrojanih stanica u uzorku, a leukogram udjelom pojedinih stanica na 200 izbrojanih stanica. Dijagnoza akutne leukemije postavljena je pronalaskom više od 20% blasta u uzorku koštane srži ili pojavom blasta u razmazu periferne krvi. Standardno je, u prvom trogodišnjem periodu, rađeno pet citokemijskih analiza: mijeloperoksida (MPO), sudan black B, periodic acid Shiff (PAS), alfa-naftil-acetat esteraza (ANAE) i inhibicija na-

trijevim fluoridom; tijekom drugog trogodišnjeg perioda uveli smo i dodatnu citokemijsku analizu: naftol-ASD-klor-acetat esterazu (CAE). U pojedinim slučajevima akutnih leukemija s nisko diferenciranim citokemijski negativnim blastima, kao i onima sa sumnjom na akutnu eritroidnu leukemiju ili akutnu megakarioblastičnu leukemiju, primijenili smo ograničeni imunocitokemijski panel: CD117, iMPO, CD3, CD19, CD68, glikoforin, glikoprotein. Citomorfološka dijagnoza podtipa akutne leukemije postavljena je, u slučaju akutnih mijeloičnih leukemija, prema AML NOS (engl. nesvrstane drugamo), s izuzetkom akutne promijelocitne leukemije i akutne leukemije povezane s mijelodisplazijom; u slučaju akutnih leukemija limfatične loze postavljane su dijagnoze akutne limfoblastične leukemije i Burkittovog limfoma/leukemije; uz pojedine podtipove AML NOS diferencijalno dijagnostički naznačeno je da se može raditi o AML-u s citogenetičkom greškom (t(8;21), t(6;9), inv16) ili molekularnom promjenom (FLT3-ITD mutacija). Rezultati su prikazani deskriptivnim statističkim metodama.

Rezultati

Tijekom prvog trogodišnjeg perioda analizirali smo 8932 uzorka koštane srži; dijagnozu akutne leukemije postavili smo u 255 bolesnika, u 226 bolesnika radilo se o *de novo* dijagnosticiranoj leukemiji (178 odraslih bolesnika i 48 pedijatrijskih bolesnika), a u 29 odraslih bolesnika postavili smo dijagnozu transformacije odnosno progresije iz ranije poznate hematološke bolesti (Tablica 1). U drugom trogodišnjem periodu (2011. do 31.10.2013.) analizirali smo 8656 uzoraka koštanih srži, a dijagnozu akutne leukemije postavili smo u 214 bolesnika, u njih 180 *de novo* (150 odraslih bolesnika i 43 pedijatrijska bolesnika), a u 33 odrasla bolesnika i jednog pedijatrijskog transformaciju odnosno progresiju iz ranije poznate hematološke bolesti (Tablica 1). Dijagnoze akutnih leukemija dijagnosticiranih u odraslih i pedijatrijskih bolesnika prema podtipovima u oba trogodišnja perioda prikazane su u Tablici 2 i 3.

Tablica 1. Prikaz de novo dijagnosticiranih akutnih leukemija i transformacija/progresija iz ranije poznatih hematoloških bolesti u dva trogodišnja perioda

	de novo (adult/ped)	transformacija/ progresija(adult/ped)
2005	80(62/18)	12
2006	77(60/17)	8
2007	69(56/13)	9
ukupno	226(178/48)	29
2011	60(42/18)	16
2012	55(43/12)	11(10/1)
2013 (do 31.10.)	65(52/13)	7
ukupno	180(150/43)	34(33/1)

adult-odrasli bolesnici, ped-pedijatrijski bolesnici

Tablica 2. Prikaz podtipova de novo akutnih leukemija dijagnosticiranih u odraslih bolesnika

	LA	AML min dif	AML bez saz	AML sa saz	APL	Ak mije mo	Ak mo bl	Ak mo cit	Ak eritr	Ak meg	AML/ MDS	Ak Ly bl	Bur kitt	uk
2005	5	3	6	18	1	1	2	4	1		8	12	1	62
2006	2	5	11	13	2	4	4	3	1		7	6	2	60
2007	2		4	13	3	8	3	5	3		4	10	1	56
uk	9	8	21	44	6	13	9	12	5		19	28	4	178
2011	5	1	3"	9*	3	7	4	2		1	3	4		42
2012	3	1	3	12**	4	5"	2	5			4	3	1	43
do 31.10. 2013.	3		4	13**	4	4		6	1		7	9	1	52
uk	11	2	10	34	11	16	6	13	1	1	14	16	2	137

*diferencijalno dijagnostički: t(8;21), inv(16)

"diferencijalno dijagnostički „cup-like“

LA-nediferencirana leukemija, AML-akutna mijeloična leukemija, min dif-minimalno diferencirana, bez saz-bez sazrijevanja, sa saz-sa sazrijevanjem, APL-akutna promijelocitna leukemija, Ak mijemo-akutna mijelo-monocitna leukemija, Ak mobil-akutna monoblastična leukemija, Ak mocić-akutna monocitna leukemija, Ak eritr-akutna eritroidna leukemija, Ak meg-akutna megakariocitna leukemija, AML/MDS-akutna leukemija sa znacima mijelodisplazije, Ak Ly bl-akutna limfoblastična leukemija, Burkitt- leukemija Burkittovog tipa, uk-ukupno

Tablica 3. Prikaz podtipova de novo akutnih leukemija dijagnosticiranih u pedijatrijskih bolesnika

	Ak Ly bl	Bur kitt	AML min dif	AML sa saz	Ak mijelo mo	Ak mo bl	Ak mo cit	Ak eritro	Ak mega	uk
2005	15		1					1	1	18
2006	13	2				1	1			17
2007	13									13
uk	41	2	1			1	1	1	1	48
2011	17	1								18
2012	11							1		12
do 31.10. 2013.	7			2*	3	1				13
uk	35	1		2	3	1	1			43

*diferencijalno dijagnostički: t(8;21)

Ak Ly bl-akutna limfoblastična leukemija, Burkitt- leukemija Burkittovog tipa, AML-akutna mijeloična leukemija, min dif-minimalno diferencirana, sa saz-sa sazrijevanjem, Ak mijemo-akutna mijelo-monocitna leukemija, Ak mobil-akutna monoblastična leukemija, Ak mocić-akutna monocitna leukemija, Ak eritr-akutna eritroidna leukemija, Ak meg-akutna megakariocitna leukemija, uk-ukupno

Rasprava

Naši rezultati u drugom trogodišnjem periodu odnosili su se na razdoblje od siječnja 2011. godine do kraja listopada 2013. godine. Uvrštenjem dodatne 353 analize koštane srži unutar posljednja dva mjeseca 2013. godine broj ukupno pregledanih uzoraka koštane srži popeo se na 9009, te možemo reći da je broj pregledanih uzoraka koštane srži ostao nepromijenjen. U dodatnom periodu od dva posljednja mjeseca 2013. dijagnosticirali smo 17 *de novo* akutnih leukemija, u 13 odraslih bolesnika i četvero djece (ukupno 82 u 2013. godini, 197 u drugom trogodišnjem periodu). U drugom trogodišnjem periodu ukupno je dijagnosticiran nešto niži broj akutnih leukemija nego u prvom trogodišnjem periodu, što se može dijelom objasniti dvama razlogima. Jedan je renoviranje Zavoda za hematologiju naše Klinike za unutarnje bolesti, kada su pojedini bolesnici usmjeravani u druge bolnice; drugi razlog čini dovršenje specijalizacije iz kliničke citologije kolega u Mostaru, čime je smanjen broj upućenih bolesnika na citomorfološku dijagnostiku iz te bolnice. Iako je ukupan broj dijagnosticiranih akutnih leukemija u drugom trogodišnjem periodu snižen, primjetili smo porast broja dijagnoza od 2011. do 2013. godine, naročito u 2013. godini (u odnosu na 2012. godinu do 31.10. dijagnosticirano je 10 akutnih leukemija više, a ako se uvrste i posljednja dva mjeseca 2013. ukupno 27 akutnih leukemija više). Odnos broja dijagnoza između pedijatrijskih i odraslih bolesnika tijekom dva trogodišnja perioda nije se odveć mijenjao.

Ukupno je dijagnosticirano više transformacija/progresija iz ranije poznatih hematoloških bolesti u drugom trogodišnjem periodu, za što nemamo adekvatno objašnjenje.

Pregledom razvrstanih podtipova akutnih leukemija uočili smo, u drugom trogodišnjem periodu, niži broj pojedinih podtipova akutnih mijeloičnih leukemija, poput akutne mijeloične leukemije bez sazrijevanja i akutne mijeloične leukemije sa sazrijevanjem. To dijelom možemo objasniti postavljanjem diferencijalnih dijagnoza akutnih mijeloičnih leukemija s citogenetičkim greškama, sukladno napucima SZO klasifikacije. Tijekom godina primjetili smo i porast broja dijagnosticiranih podtipova akutne mijelo-monocitne leukemije, akutne monocitne i akutne monoblastične leukemije, pogotovo u odnosu na akutne mijeloične leukemije s i bez sazrijevanja, tako da smo u rutinske citokemijske analize uvrstili CAE; u drugom trogodišnjem periodu imali smo i veći broj dijagnosticiranih akutnih promijelocitnih leukemija, za što također nemamo objašnjenje.

Premda postoje određene posebnosti u broju dijagnoza i podtipovima pojedinih akutnih leukemija, u prikazu rezultata naše kliničke jedinice nismo uočili značajnija odstupanja u odnosu na podatke navedene u literaturi SZO klasifikacije.

LITERATURA

1. 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.

Prikaz slučaja prekida terapije inhibitorima tirozin kinaze kod pacijenata s kroničnom mijeloičnom leukemijom

**Dubravka Sertić, Barbara Dreta, Renata Zadro,
Ranka Serventi-Seiwerth, Ivana Horvat,
Margareta Radić-Antolić, Boris Labar**

Adresa autora za kontaktiranje:

Prim. Dubravka Sertić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

E-pošta: dsertic@net.hr

Liječenje kronične mijeloične leukemije danas je temeljeno na terapiji inhibitorima tirozin kinaze (TKI) kao ciljanom molekularnom terapijom. Uvođenje terapije inhibitorima tirozin kinaze u liječenje kronične mijeloične leukemije omogućilo je dugotrajno preživljjenje bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom, uz dobru kvalitetu života. Praćenjem molekularnog odgovora kod pacijenata možemo pratiti i djelotvornost liječenja te ukoliko je potrebno promijeniti terapiju inhibitorima prve generacije u inhibitore druge generacije. Studije također pokazuju da otprilike polovica bolesnika koji dugotrajno postižu duboki molekularni odgovor mogu u slučaju prestanka terapije zadržati dobar molekularni odgovor usprkos prestanku liječenja, ali za sada se prekid terapije ne preporuča osim u okviru studije. Kod nekih bolesnika s dugotrajnim dubokim odgovorom, koji razviju teške nuspojave tijekom liječenja TKI, prekid terapije je moguća opcija. Ovdje su prikazana četiri bolesnika liječena kronične mijeloične leukemije u KBC Zagreb, Klinici za unutarnje bolesti, Zavodu za hematologiju, kod kojih je zbog razvoja nuspojava morala biti prekinuta terapija inhibitorima tirozin kinaze, te njihov daljnji tijek bolesti. Bolesnici su molekularno praćeni u prvih 6 mjeseci jednom mjesečno, drugih 6 mjeseci svakih 6 tjedana, te u drugoj godini prekida terapije svaka 2 mjeseca.

Prvi pacijent je žena, 57 godina kod koje je dijagnoza KML postavljena u dobi od 39 godina 1995. godine a prezentirala se splenomegalijom i leukocitozom. Učinjenom dijagnostičkom obradom potvrđena je dijagnoza kronične mijeloične leukemije s translokacijom 9;22 u kariogramu, a PCR metodom je dokazan b2a2 prijepis. Rizik je procijenjen prema SOKAL-u 1,09 (I), HASFORD-u (EU) 738(I) i za-

početa je terapija hidroksiurejom. Godinu dana kasnije učinjena je alogenična transplantacija koštane srži od srodnog donora. Nakon transplantacije trajno se prati minimalna rezidualna bolest PCR metodom. Nakon uvođenja metode kvantitativnog PCR nastavljeno je ovom metodom te se registrira se porast prijepisa bcr-abl do 1,12%. Stoga je u veljači 2010. započeta terapija imatinibom. U dalnjem praćenju svaka 3 mjeseca nakon 9 mjeseci bcr-abl prijepis postaje nemjerljiv tj. dolazi do kompletne molekularne remisije bolesti. Tijekom liječenja imatinibom javlja se neutropenija do gradusa III prema NCI, uz infektivne komplikacije godinu dana kasnije kada je bolesnica hospitalizirana radi pijelonefritisa. U studenom 2012. se prekida terapija imatinibom mesilatom nakon 2 godine kompletног molekularnog odgovora. U dalnjem molekularnom praćenju bolesti (16 mjeseci praćenja) bolesnica je i dalje u kompletном molekularnom odgovoru, uz oporavak krvne slike, bez znakova infekcije.

Naš drugi pacijent je žena stara 83 godine. Dijagnoza KML-a je postavljena s 74 godine, kada se bolesnica javila u hematološku ambulantu radi leukocitoze i splenomegalije. U kariogramu koštane srži metodom FISH nađeno je 57% Ph pozitivnih stanica. Inicijalni SOKAL bio je 1,5 (H), HASFORD (EU) 1644 (H). Započeta je terapija hidroksiurejom a u 3. mjesecu 2005. imatinib mesilatom. Nakon početka terapije kod bolesnice se detektira najprije kompletan molekularni odgovor, a nakon poboljšanja osjetljivosti testa trajno molekularni odgovor s mjerljivim bcr-abl prijepisom u nivou MR4,5. Radi razvoja teške simptomatske anemije u 9. mjesecu 2012. prekida se s terapijom. Pacijentica je i nakon prekida i dalje u MR4- MR4,5 subjektivno bez tegoba, uz normalizaciju krvne slike.

Treća bolesnica je žena stara 63. godine kod koje je dijagnoza kronične mijeloične leukemije postavljena 2000. g. u dobi od 49. godina. Prilikom prezentacije bila je prisutna hepatosplenomegalija s anemijom i leukocitozom. Kariogram koštane srži je pokazao pozitivnu translokaciju t(9;22), inicijalni SOKAL je bio 1,74 (H), HASFORD (EU) 1115,3 (I). Započeta je terapija interferonom te hidroksiurejom. U 7. mjesecu 2002. g. uvodi se u terapiju imatinib

mesilat. Najbolji terapijski odgovor koji je postignut uz imatinib bio je kompletan citogenetski odgovor. U 7. mjesecu 2006. dolazi do progresije bolesti, u kariogramu koštane srži vidljivo je 43% Ph pozitivnih stanica, na što je povećana doza imatinib mesilata na 600 mg/dan. U kontrolama vidljiva je dalnja progresija bolesti. Učinjeno je testiranje na mutaciju Y253H koje je bilo pozitivno, stoga je u 3. mjesecu 2007. započeta terapija dasatinibom. Bolesnica u 6. mjesecu 2007. postiže kompletan citogenetski a 3 mjeseca kasnije i kompletan molekularni odgovor. U 10. mjesecu 2012. dolazi do zaduhe i razvoja pleuralnih izljeva koji su zahtijevali evakuaciju, radi čega se prekida terapija dasatinibom. U dalnjem praćenju nakon prekida terapije dasatinibom održan je kompletan molekularni odgovor (MR5).

Kod naše četvrte bolesnice dijagnoza kronične mijeloične leukemije postavljena je s 50 godina. Na-

kon inicijalne terapije hidroksurejom i interferonom u 4. mjesecu 2002. godine započeta je terapija imatinib mesilatom. Kontrolnom obradom utvrđeno je da je bolest u kompletном molekularnom odgovoru. U 5. mjesecu 2013. na prijedlog bolesnice a u dogovoru s nadležnim hematologom prekida se terapija inhibitorom tirozin kinaze, bez poznate nuspojave na liječenje. U dalnjem molekularnom praćenju vidljiv je porast razine prijepisa bcr-abl no za sada bez gubitka MMR-a.

U zaključku, kod bolesnika s dugotrajnim dubokim molekularnim odgovom moguće je održati postignut molekularni odgovor i nakon prekida liječenja inhibitorom tirozin kinaze. Iako se prekid terapije ne preporuča izvan kliničkih studija u slučaju razvoja teških nuspojava može se uz pristanak bolesnika prekinuti liječenje TKI uz često i redovito molekularno praćenje.

Rijetki oblici sistemske mastocitoze

**Aralica Gorana^{1,2}, Tomasović-Lončarić Čedna²,
Jonjić Nives³, Hariš Višnja², Valković Toni³,
Štoos-Veić Tajana², Kušec Rajko^{1,2}**

¹ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

² Klinička bolnica Dubrava Zagreb

³ Medicinski fakultet i Klinički bolnički centar Rijeka

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

Uvod

Mastocitoze su klonalne neoplastične proliferacije mastocita. Prema važećoj Klasifikaciji tumora hematopoetskog i limfnog sustava Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine podskupina su mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN), dok su u prethodnim klasifikacijama bile posebna skupina bolesti. Najčešće su kutane mastocitoze koje se obično javljaju u dječjoj dobi. U odrasloj dobi su češće sistemske mastocitoze (SM), a među njima indolentna sistemska mastocitoza (ISM) (Tablica 1.).

MASTOCITOZE	
1. KUTANA MASTOCITOZA	
2. INDOLENTNA SISTEMSKA MASTOCITOZA (46% SM)	
3. SISTEMSKA MASTOCITOZA UDRUŽENA S DRUGOM KLONALNOM NEMASTOCITNOM BOLEŠĆU (40% SM)	
4. AGRESIVNA SISTEMSKA MASTOCITOZA (12% SM)	
5. MASTOCITNA LEUKEMIJA (1% SM)	
6. MASTOCITNI SARKOM (VRLO RIJEDAK)	
7. EKSTRAKUTANI MASTOCITOM (BENIGNI TUMOR)	

Tablica 1. Klasifikacija mastocitoza i učestalost pojedinih skupina sistemskih mastocitoza.

Za dijagnozu sistemske mastocitoze moraju biti ispunjeni glavni i jedan sporedni kriterij ili minimalno tri sporedna kriterija (Tablica 2.).

KRITERIJI ZA DIJAGNOZU SISTEMSKE MASTOCITOZE	
GLAVNI KRITERIJ	
MULTIFOKALNI, GUSTI INFILTRATI MASTOCITA (>15 STANICA) U KOŠTANOJ SRŽI I/ILI DRUGIM EKSTRAKUTANIM ORGANIMA	

SPOREDNI KRITERIJI

1. KS ILI EKSTRAKUTANI ORGAN - >25% MASTOCITA SU VRETEVASTI ILI ATIPIČNI
2. DETEKCIJA MUTACIJE NA KODONU 816 U CKITU
3. IHC - CD2 I/ILI CD25 POZITIVNI + OSTALI MARKERI ZA MASTOCITE (CD117)
4. TOTALNA SERUMSKA TRIPTAZA >20 NG/ML

Tablica 2. Kriteriji za dijagnozu sistemske mastocitoze.

Sistemska mastocitoza udružena s drugom klonalnom hematološkom nemastocitnom bolešću (SM-AHNMD)

Podvrsta sistemske mastocitoze SM-AHNMD se javlja u otprilike polovice bolesnika sa sistemskom mastocitozom. U 89% slučajeva pridružena klonalna bolest je mijeloidna neoplazma. Najčešće neoplazme su iz skupine mijelodisplastičnih sindroma/ mijeloproliferativnih neoplazmi (MDS/MPN) ili iz skupine mijeloproliferativnih neoplazmi (MPN), dok su rjeđi različiti oblici MDSa ili akutne mijeloične leukemije (AML). Rijetko je udružena neoplazma iz skupine limfoproliferacija. Profesor Horny sa suradnicima je u trogodišnjoj retrospektivnoj studiji na Institutu za patologiju Sveučilišta u Lübecku, Njemačka, analizirao 19 500 biopsija koštane srži. U ovoj velikoj seriji, SM su činile 0,3% svih biopsija (ukupno ih je bilo 64) ili 1,5% svih mijeloidnih neoplazmi. Od 64 SM, 35 je bilo indolentnih, 20 SM-AHNMD-a, 7 agresivnih SM-a te 2 mastocitne leukemije. Između 20 SM-AHNMD-a, udružena neoplazma je u 7 slučajeva bila iz skupine MDS/ MPN-a, 4 AML-a, 3 MPN-a, 2 MDSa te 2 mijeloma. U radu je naglašeno kako niti jedna od ovih biopsija nije bila poslana s kliničkom dijagnozom sistemske mastocitoze. Druga velika retrospektivna studija Lima i suradnika s Mayo klinike je u razdoblju 1976-2007. godine u biopsijama koštane srži našla 342 SM-a. Od toga je 138 bilo iz skupine SM-AHNMD, a udružena neoplazma je bila najčešće MPN ili MDS/MPN.

U nastavku prikaza, osvrnut ćemo se na naša dva slučaja sistemske mastocitoze udružene s mijeloproliferativnim neoplazmama.

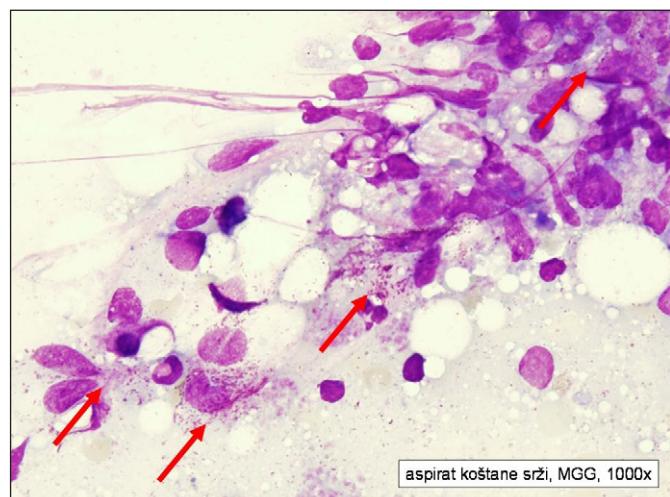
Slučaj 1.

Muškarac rođen 1966. godine.

Iz anamneze: Od 2007. godine trombocitoza ($Trc 715 \times 10^9/L$) i bolovi u prstima desnog stopala. Također, dijagnosticiran erozivni gastritis i duodenitis.

U 2. mjesecu 2012. godine, kod prijema u našu bolnicu, eritromelalgična bol u stopalu, u dobrom općem stanju, bez palpabilnih limfnih čvorova ili slezene. U laboratorijskim nalazima E $5,18 \times 10^12/L$, hemoglobin $158 g/L$, L $17,7 \times 10^6/L$, Trc $997 \times 10^9/L$. U aspiratu koštane srži nađena je normocelularna koštana srž s normoblastičnom eritropoezom i zrelo granulopoezom te brojni, veliki i hiperlobulirani megakariociti koji odgovaraju MPN/ET-u. Vretenasti mastociti prepoznati tek u ponovljenom pregledu (Slika 1.).

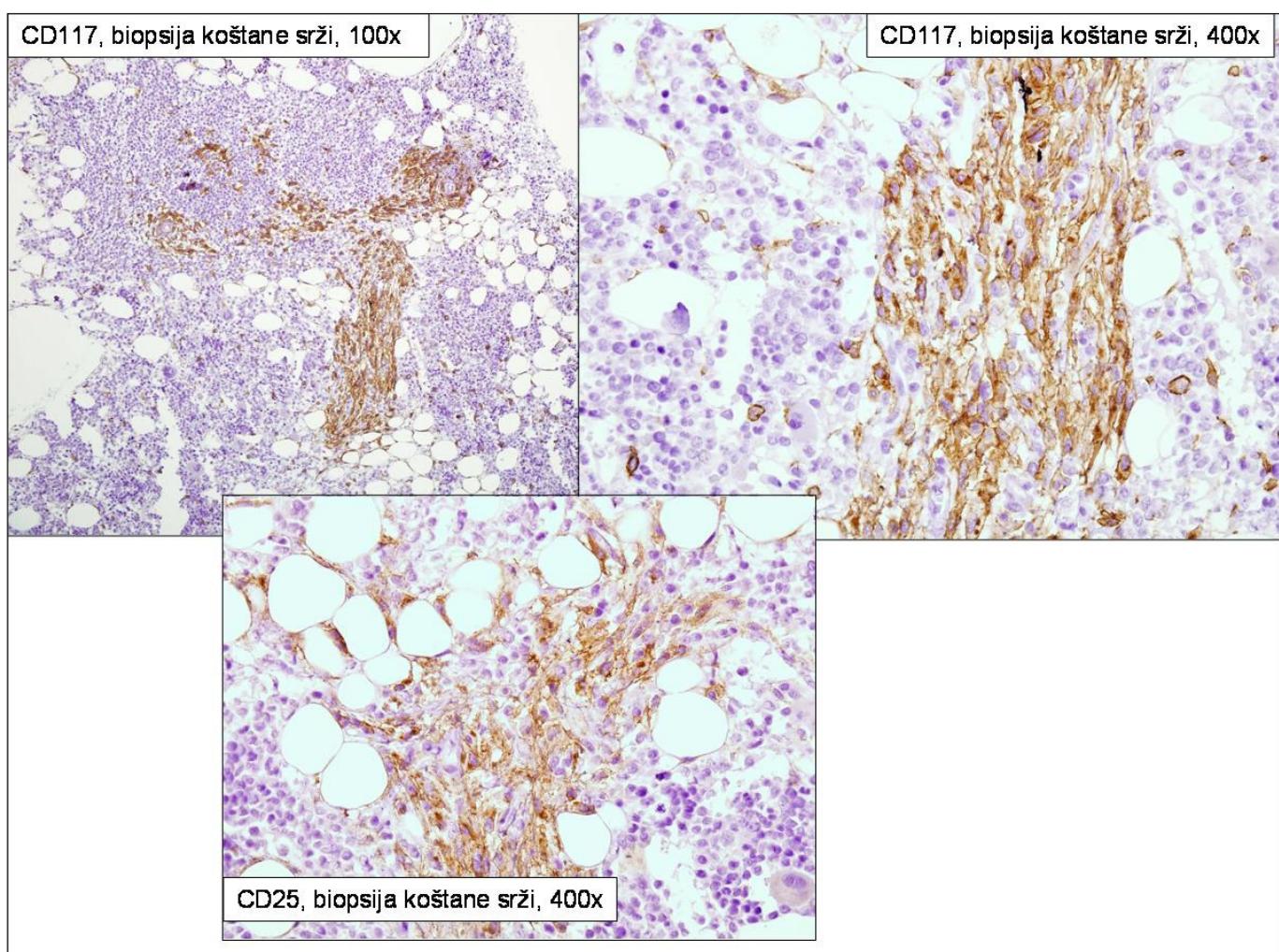
Slika 1. Vretenasti mastociti (strelice) u aspiratu koštane srži.



U biopsiji koštane srži nađena je hipercelularna koštana srž za dob (65%) s kompaktnim, pretežno peritrabekularnim infiltratima vretenastih i okruglastih mastocita (čine oko 20% celularnosti) koji su

imunohistokemijski CD117 i CD25 pozitivni (Slika 2.). Uz to, sve tri loze hematopoeze sazrijevaju, a megakariociti su umnoženi, krupni i hiperlobulirani te odgovaraju dijagnozi MPN/ET.

Slika 2. Nakupine vretenastih mastocita u biopsiji koštane srži obojenoj imunohistokemijskim metodama.



Molekularnim analizama dokazane su *KITD816V* i *JAK-2 V617F* mutacije, tako da je postavljena konačna dijagnoza sistemske mastocitoze udružena s drugom klonalnom nemastocitnom hematološkom bolešću - esencijalnom trombocitemijom (SM-MPN(ET)).

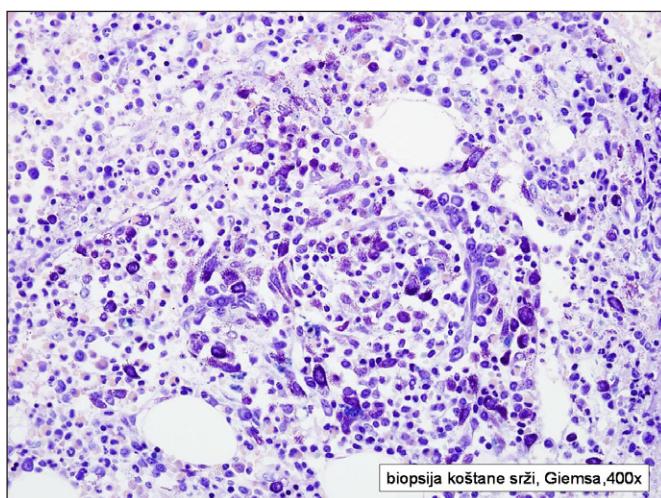
Slučaj 2.

Muškarac, rođen 1940. godine.

Iz anamneze: Liječi arterijsku hipertenziju. Prije 2 godine javio se dermatologu kada je postavljena dijagnoza kutane mastocitoze iz biopsije kože. Obiteljska anamneza: jedan brat umro od leukemije, drugi od karcinoma prostate.

Kod prijema u 01/2013. godine prisutan generalizirani makulopapulozni osip, u dobrom općem stanju, bez palpabilnih limfnih čvorova ili slezene, uz palpabilnu jetru 1 cm. U krvnoj slici E 5,38x10¹²/L, hemoglobin 158 g/L, L 10,5x10⁹/L, Trc 286x10⁹/L. Triptaza 132 ng/mL. U aspiratu koštane srži nađen obilnije celularan uzorak u kojem su prisutne sve tri loze hematopoeze koje sazrijevaju te žarišno umnoženi mastociti. U biopsiji koštane srži hipercelularna koštana srž za dob (60%) s agregatima vretenastih mastocita koji su imunohistokemijski CD117 i CD25 pozitivni (Slika 3.). Ostatak celularnosti čine sve tri loze hematopoeze koje sazrijevaju bez bitnijih morfoloških promjena.

Slika 3. Nakupine tumorskih mastocita.



Konvencionalnom citogenetikom dokazan je normalni muški kariotip (46,xy), a molekularnim testovima *KITD816V* i *JAK-2V617F* mutacije pa je postavljena konačna dijagnoza sistemske mastocitoze udružene s drugom klonalnom nemastocitnom hematološkom bolešću – mijeloproliferativnom neoplazmom (SM-MPN).

Zaključak

Sistemska mastocitoza je rijetka bolest, što je potvrđeno u retrospektivnim studijama na velikim serijama biopsija koštane srži. Unutar skupine sistemskih mastocitoza, dio čine one udružene s drugim klonalnim nemastocitnim hematološkim bolestima. U literaturi je prateća neoplazma najčešće iz skupine MDS/MPN (CMML) te iz skupine MPNa (PMF i PV). U ovom izvještaju prikazana su dva bolesnika s dijagnozama SM- MPN. U prvom slučaju klinička slika primarno je bila povezana uz sliku MPNa, dok su u drugom slučaju bili izraženi simptomi mastocitoze. Morfološki i imunohistokemijski u oba slučaja su ispunjeni kriteriji za dijagnozu sistemske mastocitoze, u prvom i za dijagnozu MPNa, a molekularnim metodama su u oba slučaja dokazane karakteristične mutacije i za sistemsku mastocitozu i za mijeloproliferativnu neoplazmu. S obzirom na broj stanovnika i broj biopsija koštane srži, treba imati na umu kako se i u svjetskim razmjerima rijetke bolesti, mogu naći i u našem materijalu.

LITERATURA

1. Chiu A, Orazi A. Sem Diag Pathol. 2012;29:19-30.
2. Dobrea C, Ciochinaru M, Gaman A, et al. Rom J Morphol Embryol 2012;53:197-202.
3. Horny HP, Sotlar K, Sperr WR, Valent P. J Clin Pathol 2004;57:604-608.
4. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, et al. Blood. 2009;113:5727-5736.
5. Pardanani A, Lim KH, Lasho TL, et al. Blood 2009;114:3769-3772.
6. Stoecker M, Wang E. Arch Pathol Lab Med 2012;136:832-838.
7. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, IARC, 2008.

Specifičnosti autologne transplantacije krvotvornih matičnih stanica u djece

Gordana Jakovljević¹, Jasmina Stepan¹,
 Aleksandra Bonevski¹, Filip Jadrijević Cvrlje¹,
 Srđan Rogošić¹, Filip Rubić¹, Ines Bojanic²,
 Branka Golubić Ćepulić², Drago Batinić³

¹ Odjel za onkologiju i hematologiju, Klinika za pedijatriju, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb

² Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i

transplantacijsku biologiju KBC Rebro, Zagreb

³ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Rebro, Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Doc.dr.sc.Gordana Jakovljević, prim.dr.med.

Odjel za onkologiju i hematologiju, Klinika za pedijatriju, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klaićeva 16, 10 000 Zagreb

E-pošta: gordanajakovljevic@yahoo.com

Uvod

Megaterapija (visoko dozna kemoterapija) s transplantacijom autolognih krvotvornih matičnih stanica (TAKMS) primjenjuje se sve više za liječenje prognostički nepovoljnih visokorizičnih solidnih tumora kod djece. Maligni tumori dječje dobi kod kojih se primjenjuje TAKMS su rijetke bolesti. Tu spadaju limfomi i solidni tumori (neuroblastom, Ewing sarkom / primitivni neuroektodermalni tumor (PNET), mekotkivni sarkomi (abdomiosarkom), nefroblastom, tumori mozga, tumori zametnih stanica) (1,2,3,4). Postoji korelacija između povećanja doze kemoterapije i pozitivnog odgovora na liječenje kod većine solidnih tumora dječje dobi. Povećanjem doze kemoterapije unutar mijeloablativnih vrijednosti prevladava se tumorska rezistencija i postiže željeno kliničko poboljšanje (1). Indikacije za TAKMS imaju bolesnici s visokorizičnim solidnim tumorima dječje dobi koji su kod postavljanja dijagnoze diseminirani, te kod kojih bi liječenje konvencionalnom terapijom dovelo do kratkog preživljivanja (očekivano dugotrajno preživljivanje <30%). Transplantacija je također indicirana u slučaju parcijalnog odgovora na uvodnu terapiju i relapsa (1,2).

Ovdje su prikazani rezultati liječenja djece sa solidnim malignim tumorima i limfomima koji su treirani visoko doznom kemoterapijom i TAKMS-om, kao i specifična pitanja i problemi s kojima se susrećemo tijekom njihovog liječenja.

Materijali i metode

Bolesnici

Analizirali smo 46 djece s visoko rizičnim solidnim tumorima i limfomima koji su liječeni visoko-doznom kemoterapijom i TAKMS-om iz periferne krvi na Odjelu za onkologiju i hematologiju Klinike za dječje bolesti Zagreb od prosinca 2005.g. do prosinca 2012.g. Pacijenti s visoko rizičnim tumorima koji su postigli kompletну ili parcijalnu remisiju bez progresivne bolesti, bili su podobni za transplantaciju. Većina transplantiranih pacijenata bolovala je od visoko rizičnog neuroblastoma (metastatska bolest, dob >1god., ili MYCN amplifikacija i bilo koja dob). Kod svih vrsta solidnih tumora radilo se o metastatskoj bolesti kod postavljanja dijagnoze ili relapsu nakon konvencionalne terapije. Bolesnici su neposredno prije transplantacije imali normalnu bubrežnu i jetrenu funkciju, ejekcijsku frakciju ljevog ventrikula >50%, a njihov Lansky status bio je >70%. Zbir demografskih i kliničkih podataka naših ispitanika prikazan je na Tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike transplantiranih bolesnika

Broj bolesnika	46
Dječaci/djevojčice	27/19
Dob medijan (godine)	5.4
Dob raspon (godine)	0.8-17.3
Tjelesna težina medijan (kg)	18
Tjelesna težina raspon (kg)	8-78
Vrijeme od dijagnoze do transplantacije (mj)	8-40
Vrijeme do "engraftmenta" medijan (dani)	11
Vrijeme do "engraftmenta" raspon (dani)	10-21
Status bolesti prije transplantacije (PR/KR)	17/29
Praćenje medijan (mjeseci)	37.5
Praćenje raspon (mjeseci)	4-96
Mrtvi/živi	11/35

PR – parcijalna remisija, KR – kompletna remisija

Prikupljanje krvotvornih matičnih stanica iz periferne krvi

Kemoterapijom inducirana mobilizacija provedena je kemoterapijskim ciklusom ili ciklofosfamidom (2 gr/m²/dan kroz 2 dana). Nakon toga slijedilo je višednevno davanje granulocitnog čimbenika stimulacije kolonija (G-CSF, 5-10 µg/kg/dan). Matične stanice iz periferne krvi su najčešće prikupljane nakon 4 kemoterapijska ciklusa postupkom leukaferese. Proces CD34+ monitoriranja i citafeze provodio se u suradnji s Kliničkim zavodom za laboratorijsku dijagnostiku KBC Rebro, Zagreb, te Kliničkim zavodom za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku

biologiju KBC Rebro, Zagreb. Cilj je bio prikupiti 5×10^6 CD34+ stanica/kg po bolesniku. Minimalni zadovoljavajući broj CD34+ stanica bio je $>2 \times 10^6$ /kg po bolesniku. Nakon što je CD34+ monitoriranjem registriran adekvatan broj matičnih stanica u perifernoj krvi, pristupilo se procesu leukaferese pomoću COBE staničnog separatora. Kod male djece (tjelesna težina ≤ 15 kg), aparat je ispunjen filtriranim i ozračenim koncentratom eritrocita. Svoj djeci učinjena je velika volumna leukaferesa. Kod male djece kao antikoagulans poslužila je kombinacija acid citrat dekstroze (ACD) i heparina, a tijekom leukaferese primali su infuziju kalcija (5,6). Tako dobiveni pripravci matičnih stanica, bez pročišćavanja od tumorskih stanica pohranjivani su u tekućem dušiku (7). Zbog loše vijabilnosti matičnih stanica jedan transplantat bio je nezadovoljavajući, a jedno prikupljanje matičnih stanica bilo je neuspješno.

Proces transplantacije

Nakon detaljne kliničko-laboratorijske obrade kojom je isključena aktivna infekcija, pristupalo se visokodoznoj kemoterapiji koja je bila definirana odgovarajućim protokolom liječenja (NB2004, EuroEwing 99, HIT 2000, NHL-BFM 2004). Svi pacijenti dobili su jednostruku visoko doznu kemoterapiju nakon koje je slijedila reinfuzija matičnih stanica. Citostatici primjenjeni u sklopu visoko dozne kemoterapije za pojedine vrste tumora prikazani su na Tablici 2. Vrijeme neutrofilnog „engraftmenta“ bilo je definirano periodom od reinfuzije matičnih stanica do porasta apsolutnog broja neutrofila $>0.5 \times 10^9/L$ kroz 2 uzastopna dana. Odgovarajuća premedikacija prije reinfuzije sastojala se od paracetamola, difenhidramina, hidrokortizona i diazepama.

Tablica 2. Citostatici korišteni u visoko doznoj terapiji ovisno o vrsti tumora.

Vrsta tumora	Visoko dozna kemoterapija
Neuroblastom	melfalan, etopozid, karboplatina
Ewing sarkom	busulfan, melfalan
Tumori mozga	tiotepa, karboplatina, etopozid
Nefroblastom	melfalan, karboplatina, etopozid
Non-Hodgkin limfom	busulfan, etopozid, ciklofosfamid
Hodgkin limfom	karmustin, etopozid, citarabin, melfalan
Rabdomiosarkom	melfalan, etopozid, karboplatina

Statistička analiza

Standardnim parametrijskim metodama opisane su demografske i kliničke karakteristike bolesnika. Sveukupno preživljavanje predstavljalo je interval između vremena transplantacije i bolesnikove smr-

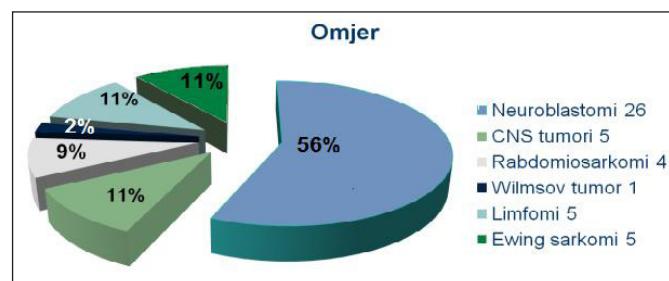
ti. Univariatna analiza sveukupnog preživljavanja prikazana je pomoću Kaplan Meierove krivulje. Usporedba krivulja učinjena je log-rank testom. Statička obrada provedena je MedCalc kompjuterskim programom.

Rezultati

Karakteristike bolesnika

Od prosinca 2005.god. do prosinca 2012.god., liječili smo 46 bolesnika visokodoznom kemoterapijom i ATKMS-om iz perifene krvi. Bilo je 19 djevojčica i 27 dječaka s medijanom životne dobi 5,4 godine (raspon 0,8-17,3 god) i medijanom tjelesne težine 18,4 kg (raspon 8-78 kg) (Tablica 1.). Najčešća indikacija bili su visoko rizični neuroblastomi. Odnos transplantiranih bolesnika ovisno o vrsti tumora prikazan je na Slici 1.

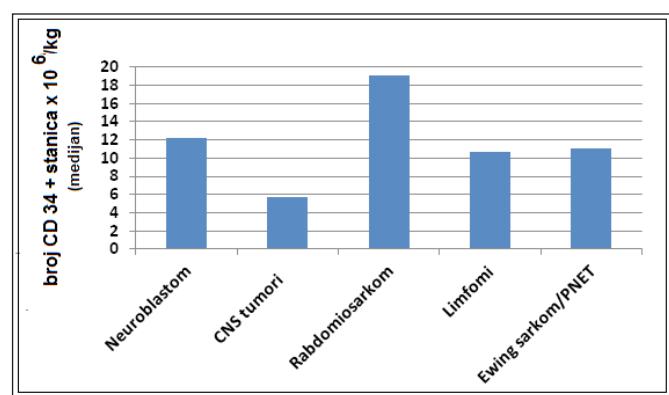
Slika 1. Omjer transplantiranih bolesnika s različitim vrstama solidnih tumora na Klinici za dječje bolesti Zagreb. Ukupno 46 bolesnika.



Proces transplantacije

Svi pripravci transplantata analizirani su s obzirom na broj CD34+ stanica. Medijan prikupljenih CD34+ stanica iznosi je $11,54 \times 10^6/kg$ po bolesniku. Medijan prikupljenih CD34+ stanica $\times 10^6/kg$ po bolesniku ovisno o vrsti tumora prikazana je na Slici 2.

Slika 2. Medijan prikupljenih CD34+ stanica $\times 10^6/kg$ po bolesniku ovisno o vrsti tumora



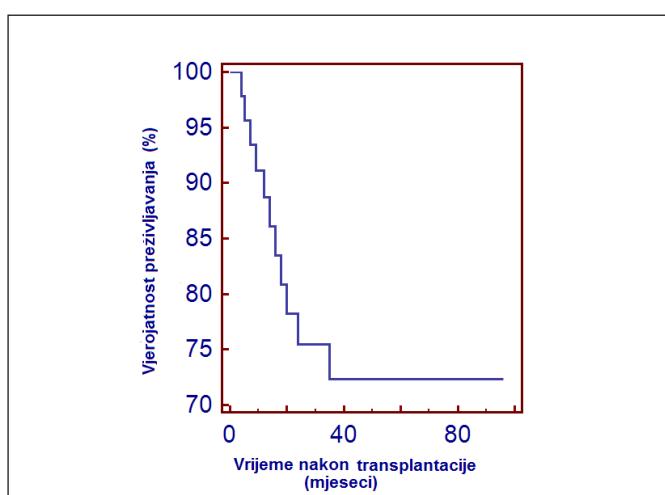
Medijan učinjenih leukaferesa po bolesniku iznosi

sio je 1 (raspon 1-4). Željena doza od 5×10^6 /kg CD34+ stanica postignuta je kod 91% bolesnika. Zahvaljujući punjenju aparata koncentratom eritrocita kod malih bolesnika i prevenciji citratom uzrokovane hipokalcemije, nije bilo ozbiljnijih komplikacija tijekom leukafereze. Ipak, kod dvoje dojenčadi došlo je do perforacije vene u području insercije femoralnog katetera, što je zahtjevalo zamjenu katetera, te transfuziju krvnih pripravaka radi zaustavljanja krvarenja. Proces reinfuzije nije bio praćen ozbilnjim komplikacijama. Najčešće komplikacije bile su mučnina i povraćanje, a tranzitorna hipertenzija i tahikardija su se znatno rjeđe javljale. Bolesnici s povišenom temperaturom za vrijeme aplazije nakon transplantacije empirijski su liječeni piperacilinom/tazobaktamom kao prvom antibiotskom linijom, a meropenemom s vankomicinom kao drugom linijom terapije. Vrlo ranim davanjem lipidnog kompleksa amfotericina B ili liposomalnog amfotericina B sprječene su teške sistemske gljivične infekcije. Zbog jake tresavice i febriliteta kao nuspajave terapije lipidnim kompleksom amfotericina B, isti smo zamjenili kod tri bolesnika kaspofunginom. Jedan bolesnik s neuroblastomom koji je imao jedan bubreg, razvio je tranzitorni porast kreatinina. Kod većine bolesnika bio je prisutan srednje težak mukozitis i proljev. Samo jedan bolesnik imao je vrlo težak hemoragijski proljev (*Clostridium difficile* negativan). Najozbiljnija komplikacija dogodila se 11. dan nakon reinfuzije kod pacijentice s neuroblastomom u dobi

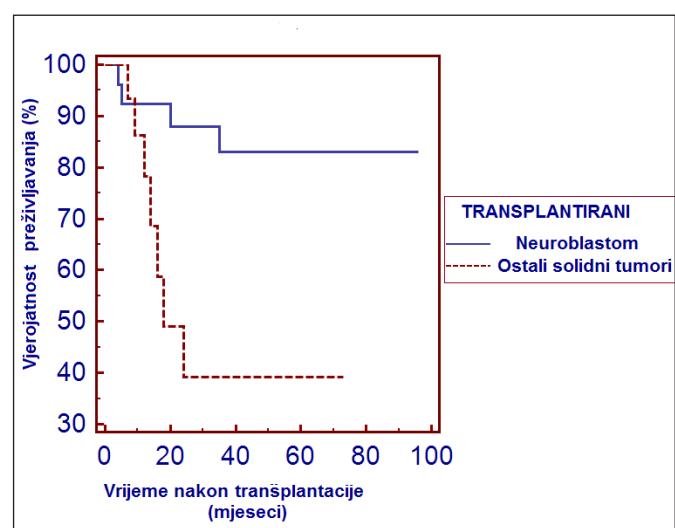
od 2 god. Radilo se o reverzibilnoj hiperamonijemiji uz kratkotrajnu komu u trajanju od oko 17 h, što je bilo praćeno naglim povećanjem jetre i tjelesne težine, bez porasta bilirubina i uz uredne jetrene enzime.

Preživljavanje

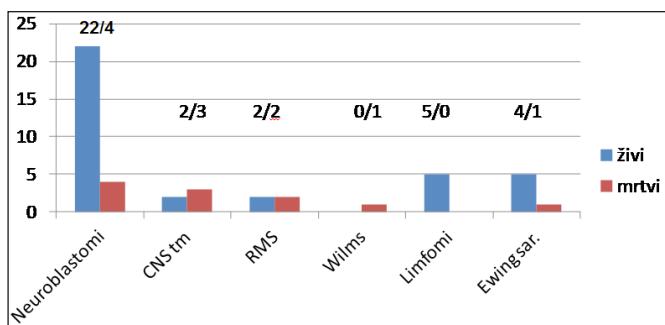
Nije bilo smrtnog ishoda radi toksičnosti visoko dozne kemoterapije i nitko nije umro zbog posljedica transplantacije. Svi bolesnici postigli su „engraftment“. Medijan praćenja bolesnika iznosio je 37,5 mj (raspon 4 mj-96 mj). Od 46 transplantiranih bolesnika 11 je mrtvih (23,9%) i 35 živih (76,1%). Vjerodost sveukupnog petogodišnjeg preživljavanja svih transplantiranih bolesnika iznosila je oko 73% (Slika 3.). Bila je značajna razlika u vjerodostu preživljavanja bolesnika s neuroblastomom u odnosu na bolesnike s ostalim solidnim tumorima (82% vs. 38%, log-rank test $X^2 = 6.86$, $P < 0.01$) (Slika 4.). Za razliku od bolesnika s limfomom i neuroblastom, najlošije su preživljivali bolesnici s tumorima mozga i rabidomiosarkomom (Slika 5. i 6.). 28 od 35 preživjelih transplantiranih bolesnika bilo je u kompletnoj remisiji do kraja praćenja, za razliku od 7 bolesnika iz te skupine koji su imali rezidualnu bolest ili doživjeli relaps (Slika 7.). Bolesnici koji su bili u kompletnoj remisiji prije transplantacije imali su bolje preživljavanje od bolesnika koji su postigli samo parcijalnu remisiju prije transplantacije (Fisherov test $P < 0.01$).



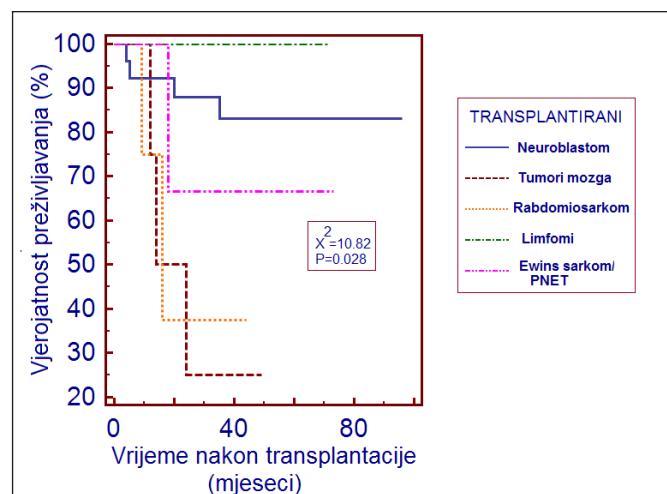
Slika 3. Vjerodost sveukupnog preživljavanja svih transplantiranih bolesnika prikazano Kaplan-Meierovom krivuljom preživljavanja. Vjerodost petogodišnjeg preživljavanja je 73%.



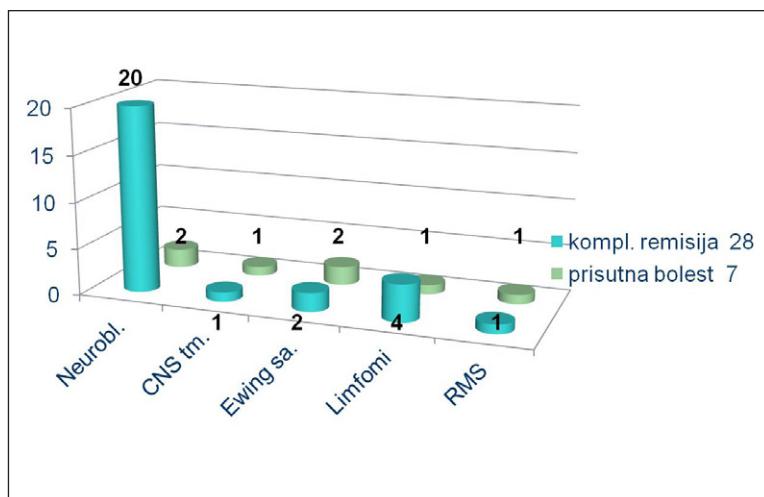
Slika 4. Kaplan-Meierove krivulje sveukupnog preživljavanja nakon transplantacije. Odnos između bolesnika s neuroblastom i ostalih bolesnika sa solidnim tumorima (isključujući limfome), (log-rank test $X^2=6.86$ $P<0.01$).



Slika 5. Preživljene transplantiranih bolesnika ovisno o vrsti tumora (medijan praćenja 37,5 mj)



Slika 6. Odnos Kaplan-Meierovih krivulja preživljjenja kod pojedinih vrsta tumora. Logrank test $X^2=10,82$ $P=0,028$



Slika 7. Broj živih transplantiranih bolesnika obzirom na prisutnost tumora (kompletan remisija / prisutna bolest) – medijan praćenja 37,5 mj

Tablica 3. Rezultati autologne transplantacije hematopoetskih matičnih stanica kod djece sa solidnim tumorima (rezultati različitih istraživača) - preživljjenje bez prisutne bolesti (DFS) i sveukupno preživljjenje (OS)

Autor	Broj bolesnika	Dijagnoza	DFS	OS
Matthay KK, 1999	379		43%	
Grupp SA, 2000	39	Neuroblastom		53%
Graham ML, 1997	23			
Dunkel IJ, 1998	49	CNS tumori	<10-50%	
Guruangan S, 1998	20			
Panosyan EH, 2011	18			69.3%
Ladenstein R, 1995	63		21%	
Fraser CJ, 2006	16	Ewing sarkom		54%
Rosenthal J, 2008	20			47%
Carli M, 1999	42	Rabdomiosarkom	29.7-40%	
Kim NK, 2012	13			41.3%
Kremens B, 2002	26	Wilms tumor	51%	

Rasprava

Kod djece sa solidnim tumorima rezultati ATKMS podjednaki su ili bolji od konvencionalnog liječenja (2). Na Tablici 3. prikazani su rezultati autologne transplantacije kod djece sa solidnim tumorima u više različitim studijama gdje možemo vidjeti veoma različite, ali u nekim skupinama bolesnika i veoma obećavajuće rezultate preživljavanja. U našem istraživanju vidljivi su zadovoljavajući rezultati preživljavanja za bolesnike s limfomom i neuroblastom, za razliku od tumora mozga i sarkoma. Naši rezultati potvrđuju da je neuroblastom najčešći solidni tumor kod kojeg se provodi autologna transplantacija. Ona je obavezni dio multimodalnog liječenja bolesnika s visoko rizičnim neuroblastom (1,2,8,9). Megaterapija se najčešće sastoji od melfalana, etopozida i karboplatine (8). Visoko rizični bolesnici (metastatska bolest i dob > 1 god, te MYCN amplifikacija i bilo koja dob) preživljavaju bez transplantacije u oko 10-15% slučajeva. S autolognom transplantacijom njihovo višegodišnje preživljene bez bolesti iznosi oko 30-50% (8,9). U našem centru Ewing sarkom / PNET bio je druga najčešća indikacija za autolognu transplantaciju. Samo konvencionalnom terapijom kod velikih tumora s metastazama u plućima postiže se 3-5 god. preživljjenje u oko 20% bolesnika, a s ranim relapsom i / ili multifokalnom koštanom bolešću preživljjenje je oko 5% (1). Autolognom transplantacijom preživljjenje je jednako ili bolje od konvencionalne terapije (3-5 god. preživljjenje bez bolesti 20-65%). Visoko dozna terapija najčešće se sastoji od melfalana i busulfana (10-15). Naši rezultati liječenja potvrđuju da autologna transplantacija kod bolesnika s visoko rizičnim Ewing sarkomom / PNET-om može povoljno utjecati na preživljjenje. Za razliku od navedenog, preživljjenje bolesnika s tumorima mozga nije se bitno produžilo nakon transplantacije. Zbog dobro poznatog problema hemato-likvorske barijere upitno je da li je i koliko je megaterapija s autolognom transplantacijom učinkovita u liječenju tumora mozga. Danas se smatra da terapijski odgovor ovisan o dozi citostatika imaju tumori neuroektodermalnog porijekla, za razliku od tumora glije kod kojih nema adekvatnog terapijskog odgovora (2). Zbog toga autolognom transplantacijom bolje rezultate postižemo kod rekurrentnih / refraktornih ili visokorizičnih meduloblastoma, primitivnih neuroektodermalnih tumora mozga, atipičnih teratoidnih / rhabdoidnih tumora mozga i germinoma mozga, za razliku od "high grade" glioma i ependimoma (2,16-18). Na žalost, o dozi ovisan pozitivan terapijski odgovor kod tumora

neuroektodermalnog porijekla koji je opisan u nekim studijama, nije bio vidljiv kod naših bolesnika s tumorima mozga (2,19-21). Također smo zapazili loš odgovor na transplantaciju kod bolesnika s rabdomiosarkomom. U radovima drugih autora koji su imali veći broj bolesnika s rabdomiosarkomom, rezultati transplantacije bili su nešto malo više obećavajući (3,22). Bolji rezultati preživljavanja nakon autologne transplantacije češće su vidljivi u slučaju kemosenzitivnih tumora i u slučaju kompletne remisije prije transplantacije (19). Naši rezultati potvrđili su učinkovitost ATKMS-a u produžetku preživljjenja bolesnika s limfomima i neuroblastomima. Za ostale tumorske bolesnike, kao i za bolesnike u parcijalnoj remisiji prije transplantacije, preživljjenje bi se moglo produžiti uvođenjem dvostrukog autologne transplantacije s posttransplantacijskom imunomodulatornom terapijom (23-27). Ipak, treba naglasiti da je naše istraživanje bilo retrospektivno i nerandomizirano, s malim brojem heterogenih bolesnika, što rezultate čini nedostatnim za donošenje pouzdanih zaključaka o učinkovitosti ATKMS-a kod djece. Ovi nedostatci s različitim karakteristikama transplantata i različitim načinima kondicioniranja limitiraju i analize većine drugih istraživača (2).

Kada se analiziraju postupci iz rutinske prakse kod ATKMS-a u djece, treba voditi računa o nekim potencijalnim problemima. Antekubitalni pristup kod male djece je nedostatan. Kod djece je najčešće neophodna primjena središnjih venskih katetera za aferezu pri čemu se pokušava aplicirati što veći lumen katetera. Broviac središnji venski kateteri se ne primjenjuju zbog mogućeg kolapsa pod negativnim tlakom. Sasvim malim bolesnicima postavljaju se femoralni kateteri. Pri tome postoji rizik od okluzije krvne žile kateterom, rizik od erozije, perforacije krvne žile i krvarenja. Kod femoralnih katetera povećan je i rizik od infekcije. Neposredno prije prikupljanja matičnih stanica kod male djece (mali cirkulirajući volumen), aparat za citaferezu zbog relativno velikog ekstrakorpuskularnog volumena nužno je ispuniti koncentratom eritrocita. Na taj način preveniraju se hemodinamske komplikacije i dilucijska anemija. Standardni ACD antikoagulans može uzrokovati simptomatsku hipokalcemiju kod djece. To se može izbjegići kombinacijom ACD-a i heparina, te davanjem infuzije kalcija tijekom afereze (6). Kao autologni transplantat uvijek koristimo krvotvorne matične stanice dobivene iz periferne krvi jer one imaju određene prednosti u odnosu na matične stanice iz koštane srži: kraće trajanje neutropenije, kraće trajanje trombocitopenije, manji rizik

od tumorske kontaminacije, te kraće trajanje hospitalizacije i manje troškove liječenja. Zbog toga su periferne hematopoetske matične stanice standardni način prikupljanja autolognog transplantata čak i za bolesnike s neuroblastomom čija je prosječna životna dob < 3 god (28). Kod donošenja odluke o nepročišćavanju transplantata matičnih stanica uzeli smo u obzir nekoliko aspekata ovog problema. Yaniv i suradnici dokazali su da CD34+ pročišćavanje možda nije tako pouzdano zbog toga što rezidualne tumorske stanice u perifernoj krvi mogu eksprimirati CD34+ antigen (29). S obzirom na studije koje su dokazale rezidualne tumorske stanice u transplantatu perifernih krvotvornih matičnih stanica, velika multicentrična randomizirana COG studija usporedila je preživljavanje transplantiranih bolesnika s neuroblastomom s pročišćavanjem i bez pročišćavanja transplantata. Rezultati govore da pročišćavanje matičnih stanica transplantata ne utječe značajno na preživljjenje što je možda posljedica nedovoljnog pročišćavanja ili prisutnih ostatnih tumorskih stanica u bolesniku. Zbog toga su periferne krvotvorne matične stanice koje se ne pročišćavaju prihvativije za suportiranje mijeloablativne terapije kod visoko rizičnih neuroblastoma (30,31). Pročišćavanje matičnih stanica značajno poskupljuje postupak prikupljanja, te se i zbog toga postavlja pitanje njegove neophodnosti. S obzirom na to da ne pročišćavamo matične stanice u transplantatu, u namjeri da postignemo zadovoljavajuće "in vivo" pročišćavanje, prije njihovog prikupljanja obavezno provodimo 4 ciklusa kemoterapije. Iz navedenih zapažanja proizlazi da ATKMS kod djece sa solidnim tumorima ima neke specifičnosti o kojima moramo voditi računa. Pri tome su iskustvo i specijalizirano znanje od bitne važnosti za postizanje dobrih rezultata.

U zaključku možemo reći da je autologna transplantacija hematopoetskih matičnih stanica osim za liječenje visoko rizičnih rekurentnih limfoma indicirana i kao konsolidacija multimodalnog liječenja bolesnika s metastatskim neuroblastomom. Ona također daje nadu za poboljšanje preživljjenja kod nekih drugih vrsta visoko rizičnih solidnih tumorova dječje dobi. I nadalje je kod većine bolesnika relaps bolesti glavni uzrok neuspješnosti transplantacije (2). Dvostruka visoko dozna kemoterapija s dvostrukom (tandem) ATKMS-om sve se više upotrebljava za liječenje djece sa solidnim tumorima. Da bi se procijenila njena uspješnost u odnosu na jednostruku, potreban je dovoljan broj prospektivnih randomiziranih istraživanja (23). Za poboljšanje preživljjenja važno je i liječenje minimalne ostatne

tumorske bolesti nakon autologne transplantacije. Dobar pristup tom problemu predstavlja primjena imunomodulatorne terapije nakon transplantacije (24-27). Bez obzira na izazove s kojima je suočena, visoko dozna kemoterapija s ATKMS-om ostaje učinkovit način liječenja, koja će s dalnjim poboljšanjima, nesumnjivo još više doprinijeti povećanju preživljjenja djece s visoko rizičnim solidnim tumorima i limfomima.

LITERATURA

- Pizzo PA, Poplack DG. Pediatric Oncology, Principles and Practice.(5thedn), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA; 2006.
- Hale GA. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for pediatric solid tumors. Expert Rev Anticancer Ther 2005;5:835-46.
- Kim NK, Kim HS, Suh CO, Kim HO, Lyu CJ. Clinical Results of High-Dose Chemotherapy Followed by Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Children with Advanced Stage Rhabdomyosarcoma. J Korean Med Sci 2012; 27:1066-1072.
- Kremens B, Gruhn B, Klingebiel T, Hasan C, Laws HJ et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue in children with nephroblastoma. Bone Marrow Transplant 2002;30:893-8.
- Takaue Y, Kawano Y, Abe T, Okamoto Y, Suzue T et al. Collection and transplantation of peripheral blood stem cells in very small children weighting 20 kg or less. Blood 1995;86:372-80.
- Veljkovic D, Vujic D, Serbic Nonkovic O, Jevtic D, Zecevic Z, Lazic E. Mobilization and Harvesting of Peripheral Blood Stem Cells in Pediatric Patients With Solid Tumors. Ther Apher Dial 2011;15:579-86.
- Raos M, Nemet D, Bojanic D, Sertić D, Batinić D et al. Collection and composition of autologous peripheral blood stem cells graft in patients with acute myeloid leukemia: influence on hematopoietic recovery and outcome. Coll Antropol 2010; 34:105-15.
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, et al. Treatment of High-risk Neuroblastoma with Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, and 13-cis-Retinoic Acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 1999;341:1165-73.
- Yalçın B, Kremer LCM, Caron HN, van Dalen EC. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma (Review). The Cochrane Library Issue 5, John Wiley & Sons, Ltd; 2010.
- Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M et al. Primary Disseminated Multifocal Ewing Sarcoma: Results of the Euro-EWING 99 Trial. J Clin Oncol 2010; 28:3284-91.
- Fraser CJ, Weigel BJ, Perentes JP, Dusenberry KE, DeFor TE et al. Autologous stem cell transplantation for high-risk Ewing's sarcoma and other pediatric solid tumors. Bone Marrow Transplant 2006;37:175-81.
- Rosenthal J, Bolotin E, Shakhnovits M, Pawlowska A, Falk P et al. High-dose therapy with hematopoietic stem cell rescue in patients with poor prognosis Ewing family tumors. Bone Marrow Transplant 2008; 42:311-318.

13. Rosenthal J, Pawlowska AB. High-dose chemotherapy and stem cell rescue for high-risk Ewing's family of tumors. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011;11:251-62.
14. Kalambakas SA, Moore TB, Feig SA. Megatherapy and stem celltransplantation for Ewing's family of tumors: A critical review of current literature. *Pediatr Transplantation* 2004; 8: 83-8.
15. Ladenstein R, Lasset C, Pinkerton R, Zucker JM, Peters C et al. Impact of megatherapy in children with high-risk Ewing's tumours in complete remission: a report from the EBMT Solid Tumour Registry. *Bone Marrow Transplant* 1995;15:697-705.
16. Graham ML, Herndon JE 2nd, Casey JR, Chaffee S, Ciocci GH et al. High-dose chemotherapy with autologous stem-cell rescue in patients with recurrent and high-risk pediatric brain tumors. *J Clin Oncol* 1997; 15:1814-23.
17. Dunkel IJ, Garvin JH Jr, Goldman S, Ettinger LJ, Kaplan AM et al. High dose chemotherapy with autologous bone marrow rescue for children with diffuse pontine brain stemtumors. Children's Cancer Group. *J Neurooncol* 1998;37:67-73.
18. Guruangan S, Dunkel IJ, Goldman S, Garvin JH, Rosenblum M et al. Myeloablative chemotherapy with autologous bone marrow rescue in young children with recurrent malignant brain tumors. *J Clin Oncol* 1998;16:2486-93.
19. Panosyan EH, Ikeda AK, Chang VY, Laks DR, Reeb CL et al. High-Dose Chemotherapy with Autologous Hematopoietic Stem-Cell Rescue for Pediatric Brain Tumor Patients: A Single Institution Experience fromUCLA. *J Transplant* 2011; 2011:740673.
20. Cheuk DK, Lee TL, Chiang ASK, Ha SY, Chang FG. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk brain tumors in children. *J Neuro Oncol* 2008; 86:337-47.
21. Park ES, Sung KW, Baek HJ, Park KD, Park HJ et al.Tandem High-Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation in Young Children with Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor of the Central Nervous System. *J Korean Med Sci* 2012;27: 135-40.
22. Carli M, Colombatti R, Oberlin O, Stevens M, Masiero L et al. High-Dose Melphalan With Autologous Stem-Cell Rescue in Metastatic Rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1999;17:2796-803.
23. Grupp SA, Stern JW, Bunin N, Nancarrow C, Ross AA et al.Tandem High-Dose Therapy in Rapid Sequence for Children With High-Risk Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2000;18:2567-75.
24. Bönig H, Laws H-J, Wundes A, Verheyen J, Hannen M et al. In vivo cytokine responses to interleukin-2 immunotherapy after autologous stem cell transplantation in children with so-lid tumors. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:91-6.
25. Porter DL, Hexner EO, Cooley S, Miller JS. Cellular Adoptive Immunotherapy After Autologous and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancer Res* 2009;144:497-537.
26. Seeger, RC. Immunology and Immunotherapy of Neuroblastoma. *Semin Cancer Biol* 2011;21:229-37.
27. Armand P, Nagler A, Weller EA, et al. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma:results of an international phase II trial. *J Clin Oncol* 2013; 31:4199-206.
28. Morris J. Neuroblastoma: Pediatric Stem Cell Transplantation. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA; 2004.
29. Yaniv I, Stein J, Luria D, Cohen IJ, Liberzon E et al. Ewing Sarcoma tumor cells express CD34: implications for autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39:589-94.
30. Moss TJ, Sanders DG, Lasky LC, Bostrom B. Contamination of peripheral blood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cells. *Blood* 1990;76:1879-83.
31. Kreissman SG, Seeger RC, Matthay KK, London WB, Sparto R et al. Purged versus non-purged peripheral blood stem-cell transplantation for high15 risk neuroblastoma (COG A3973): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:999-1008.

Autologna transplantacija u prvoj liniji liječenja agresivnih limfoma

Prof. dr. sc. Vlatko Pejša, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
Klinička bolnica Dubrava, Zagreb i
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: vpejsa@kbd.hr

Uvod

Agresivni ne-hodgkinski limfomi predstavljaju skupinu bolesti u kojima je osnovni cilj izliječiti bolesnika u 1. liniji terapije. Ovaj cilj, iako sam po sebi potpuno logičan, postaje još važniji kada se u obzir uzme podatak da samo oko 40% bolesnika s relapsnim limfomom mogu biti izlječeni (1). Unutar te skupine bolesnika posebnu pažnju treba usmjeriti na grupu mlađih bolesnika s lošom prognozom. Već duže vremena kao osnovni prognostički sustav koristi se IPI (International prognostic index) i njegove varijacije (aaIPI, R-IPI...). Iako ne predstavlja idealan prognostički sustav i dalje je dobar za svakodnevnu kliničku praksu i studije. Osim sastavnica koje čine IPI danas je već dobro znana i dokazana velika važnost tumorske biologije (porijeklo stanice, proliferacija, genska ekspresija, molekularni markeri) kao prognostičkog faktora prema kojima će se vjerojatno planirati liječenje u budućnosti. Štoviše, bolesnici s agresivnjom biologijom tumora vjerojatno i čine grupu u kojoj su relapsi znatno češći, a koju IPI nedovoljno prepoznaje.

Zlatni standard u liječenju ove grupe limfoma predstavlja i dalje CHOP+/- rituksimab (još od GELA studije LNH98-5). Iako rituksimab nesumnjivo predstavlja ogroman napredak u liječenju čijenjena je da u rezultati liječenja agresivnih B limfoma nisu zadovoljavajući dok su u grupi agresivnih T limfoma (izuzev ALK+ ALCL-a) poražavajući. Tako okvirni rezultati govore o petogodišnjem ukupnom preživljjenju kod 55% bolesnika s velikostaničnim B limfomom (2), dok, kako je već rečeno, rezultati u T-NHL-u variraju ovisno o tipu (od 70% za ALK+ ALCL do 20% kod angioimunoblastičnog limfoma) (3). U terapiji T limfoma već dugo nema adekvatnog poboljšanja u liječenju osim dodatka etopozida u bolesnika mlađih od 65 godina. S druge strane, u agresivnim B limfomama (posebice DLBCL-u) pokušane su različite terapijske kombinacije. Tako imamo velik broj tzv. „dose-densing“ i „dose-intensification“ studija čiji je krajnji učinak nezadovoljavajući. Točnije, studije koje su ispitivale skraćivanje

intervala između ciklusa terapije (14 vs. 21 dan) ne nalaze značajni benefit, a pokušajima intenzifikacije terapije (povećanjem doza ili dodavanjem novih lijekova) postignuti su bolji rezultati, ali uz značajno veću toksičnost nego s R-CHOP-om (npr. ACVBP, MegaCHOEP). U američkom nacionalnom institutu za rak još početkom 90-ih godina Wilson i suradnici razvili su DA-EPOCH kao jedna od mogućih protokola u liječenju agresivnih NHL-a. Radi se o infuzijskom protokolu sa strategijom dinamičkog prilagođavanja doza koje nadilaze neadekvatnu koncentraciju lijekova. Same doze, način primjene i prilagođavanje lijekova nije predmet ovog članka i može se naći u relevantnim publikacijama.

Autologna transplantacija u 1. liniji liječenja agresivnih limfoma

Pozicioniranje ASCT-a u 1-liniji liječenja agresivnih NHL-a nije definirano. Postoji više konfliktnih studija, tj. one koje afirmiraju (4) (5) (6) (7) i one koje ne govore u prilog transplantacije vlastitih matičnih hematopoetskih stanica u 1. liniji liječenja (8) (9) (10) (11). Meta analiza Greba i sur. za Cochrane bazu zaključuje da HDT uz ASCT ne poboljšava preživljjenje bolesnika te se smatra da joj nema mjesta u 1. liniji liječenja (8). Međutim, u publiciranim radovima (neki rađeni prije ere rituksimaba) ima sve više naznaka da postoji grupa unutar ove skupine bolesnika koja bi imala koristi od ASCT-a kao sastavnog dijela 1. linije liječenja. Tu grupu čine mlađi bolesnici s agresivnom biologijom bolesti te visokim IPI-jem (12). Tako i rezultati studije SWOG S9704 kanadsko-američke grupe pokazuju da je dvogodišnje ukupno preživljjenje 75% naprema 70% za grupe s HI-IPI te 82% prema 64% za grupu s visokim IPI-jem (13).

Zaključno, prema dosadašnjim istraživanjima općenito nema dokaza da HDT poboljšava OS ili EFS. Štoviše, u nekim radovima se prikazuju rezultati s lošijem OS-om kod onih liječenih HDT-a. Međutim, postoji naznaka (uz za sada nedovoljno dokaza) da bolesnici s lošom prognozom (visok IPI i/ili agresivnija biologija bolesti) imaju koristi od HDT-a uz ASCT kao dijela 1. linije liječenja.

Iskustva KB Dubrava

U razdoblju od svibnja 2005. do prosinca 2012. kod ukupno 20 bolesnika s agresivnim NHL-om

provedena je konsolidacija autolognom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica kao dio 1. linije liječenja. Podaci o bolesnicima i dijagnoze prikazani su u tablici 1. Prije ASCT-a 16 (80%) bolesnika bilo je u kompletnoj remisiji, 2 u parcijalnoj, a 2 su imali stabilnu bolest. Ukupno trogodišnje preživljajne bilo je 77% s medijanom praćenja od 31 mjeseca, a PFS je bio 69% na 3 godine s istim medijanom (Tablica 2). Od 20 bolesnika kod njih 14 (70%) zadnji ciklus DA-EPOCH-a uspješno je iskorišten za mobilizaciju perifernih hematopoetskih matičnih stanica. Kriteriji koji su morali biti zadovoljeni prije transplantacije su: Ki-67+>90% i/ili IPI ≥ 3 , dob <65 g. te izostanak značajnijih komorbiditeta koji bi onemogućavali oporavak ili provođenje postupka (NYHA III-IV, KZB, KOPB III-IV...).

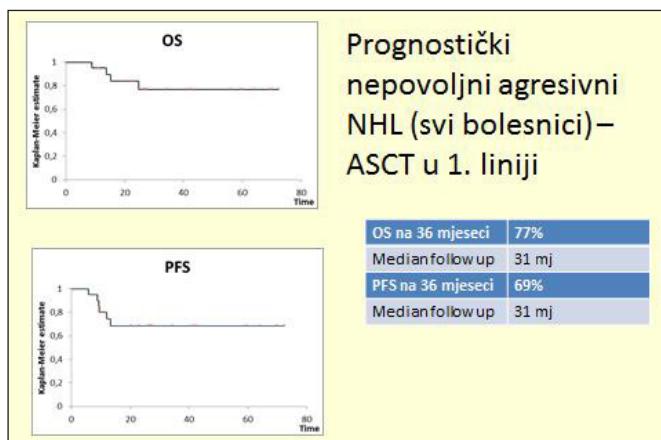
1. linija ASCT u prognostički nepovoljnih NHL u KB Dubrava

Ukupno bolesnika	20
Spol	9 M – 11 Ž
Medijan dobi	43 (21-58)
↑LDH	14 (70%)
CS III/IV	15 (75%)
IPI ≥ 2	13 (65%)

Dg	
DLBCL	10
ALCL	4 (2 ALK-)
T-NOS	2
MCL	2
BL	2

- Status bolesnika prije ASCT: 16 CR, 2 PR i 2 SD

Tablica 1. Karakteristike bolesnika i dijagnoze



Tablica 2. OS i PFS na 3 godine

Važno je naglasiti da tijekom razdoblja praćenja nisu zabilježene značajnije toksičnosti, kardiovaskularne komplikacije ili sekundarni tumori (iako je za evaluaciju incidencije sekundarnih tumora prerano).

Zaključak

CHOP+-R nije optimalna terapija za agresivne NHL, pogotovo za grupu mladih bolesnika s nepovoljnom prognozom. Dosadašnji napor da se unaprijedi terapija za ove limfome bili su ili bez uspjeha (dose densing) ili s poboljšanjem (dose intensification), ali uz znatnu toksičnost. Stav je naše kuće da je DA-EPOCH potentniji protokol od CHOP-a zbog svoje dinamike i veće doze uz usporedivu toksičnost. Sama ASCT za sada nije etablirana (mandatorna) kao dio 1. linije liječenja. Unatoč tome, postoji više naznaka da donosi terapijski benefit baš u toj grupi bolesnika, a bez znatno povećane toksičnosti. Stoga, nije bez argumenata zaključiti da je ASCT u 1. liniji terapije kao nastavak dinamičkog protokola poput DA-EPOCH-a jedna od prihvatljivih terapijskih opcija u liječenju bolesnika s lošom prognozom, no za sada bez dovoljno dokaza da bi se preporučila u smjernicama. U KB Dubrava 1. linija liječenja agresivnih NHL s lošom prognozom ili posebno agresivnom biologijom (Ki-67+>90% i/ili IPI ≥ 3) kod bolesnika < 65 godina je **EPOCH-DA +/- R + ASCT**.

LITERATURA :

1. Coiffier B. No Title. ICML - Lugano. 2008.
2. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology [Internet]. 2005 Jun 20 [cited 2013 Oct 18];23(18):4117–26. Available from: <http://jco.ascopubs.org/content/23/18/4117.long>
3. Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, Gascoyne RD, Rosen ST, Tobinai K. Peripheral T-cell lymphoma. Blood [Internet]. 2011 Jun 23 [cited 2013 Oct 18];117(25):6756–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21493798>
4. Vose JM, Zhang MJ, Rowlings PA, Lazarus HM, Bolwell BJ, Freytes CO, et al. Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology [Internet]. 2001 Jan 15 [cited 2013 Apr 27];19(2):406–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208832>
5. Glass B, Kloess M, Bentz M, Schlimok G, Berdel WE, Feller A, et al. Dose-escalated CHOP plus etoposide (MegachOEP) followed by repeated stem cell transplantation for primary treatment of aggressive high-risk non-Hodgkin lymphoma. Blood [Internet]. 2006 Apr 15 [cited 2013 Apr 27];107(8):3058–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16384932>
6. Schmitz N, Kloess M, Reiser M, Berdel WE, Metzner B, Dorken B, et al. Four versus six courses of a dose-escalated cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) regimen plus etoposide (megachOEP) and autologous stem cell transplantation: early dose intensity is crucial in

- treating younger patients with po. *Cancer* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2013 Apr 27];106(1):136–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16331635>
7. Fitoussi O, Belhadj K, Mounier N, Parrens M, Tilly H, Salles G, et al. Survival impact of rituximab combined with ACVBP and upfront consolidation autotransplantation in high-risk diffuse large B-cell lymphoma for GELA. *Haematologica* [Internet]. 2011 Aug [cited 2013 Apr 27];96(8):1136–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21577223>
8. Greb A, Bohlius J, Schiefer D, Schwarzer G, Schulz H, Engert A. *High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in the first line treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL) in adults. Cochrane database of systematic reviews (Online)* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Apr 27];(1):CD004024. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18254036>
9. Cortelazzo S, Tarella C GA. No Title. *Chemoimmunotherapy with R-CHOP or high dose sequential therapy with ASCT for high-risk DLBCL patients: results of the randomized R-HDS0305 trial by Gruppo Italiano Terapie Innovative Nei Linfomi (GITIL)*. 54th ASH Annual Meeting and Exposition; December 8–. 2012.
10. Roland V, Bodet-Milin C, Moreau A, Gastinne T, Mahé B, Dubruille V, et al. *Impact of high-dose chemotherapy followed by auto-SCT for positive interim [18F] FDG-PET diffuse large B-cell lymphoma patients. Bone marrow transplantation* [Internet]. 2011 Mar [cited 2013 Oct 19];46(3):393–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577223>
11. Strehl J, Mey U, Glasmacher A, Djulbegovic B, Mayr C, Gorschlüter M, et al. *High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as first-line therapy in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis*. *Haematologica* [Internet]. 2003 Nov [cited 2013 Apr 27];88(11):1304–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607760>
12. Karlin L, Coiffier B. *Improving survival and preventing recurrence of diffuse large B-cell lymphoma in younger patients: current strategies and future directions*. *Oncotargets and therapy* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Apr 27];6:289–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621721>
13. *Randomized phase III U.S./Canadian intergroup trial (SWOG S9704) comparing CHOP {+/-} R for eight cycles to CHOP {+/-} R for six cycles followed by autotransplant for patients with high-intermediate (H-Int) or high IPI grade diffuse aggressive non-Hodgkin* [Internet]. [cited 2013 Apr 27]. Available from: http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/29/15_suppl/8001?ijkey=c7b09e1bf0a79afe76fe4e35b473134644831001&keytype2=tf_ipsecsha

Praćenje kimerizma u programu transplantacije krvotvornih matičnih stanica

Prof. dr. sc. Zorana Grubić

Klinička jedinica za tipizaciju tkiva
Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i
transplantacijsku biologiju
KBC Zagreb, Zagreb
E-pošta: zgrubic@kbc-zagreb.hr

Pojam kimera u medicini se javlja pedesetih godina prošlog stoljeća i označava organizam u čijem tijelu postoje stanične populacije porijeklom iz genetski različitih jedinki iste ili različitih vrsta (1). Riječ je izvedenica iz grčke riječi *himera* kojom je opisano čudovište koje je imalo glavu lava, tijelo koze i rep zmije. Postoje prirodne, transfuzijske i transplantacijske kimere koje nastaju nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica (TKMS). Upravo su transplantacijske kimere i praćenje kimerizma nakon transplantacije predmet brojnih istraživanja, a sam postupak postao jedan od nezaobilaznih u praćenju ishoda TKMS-a. Postoji nekoliko oblika kimerizma, a to su: puni, miješani i podijeljeni kimerizam.

Prvi oblik kimerizma u kojem su nakon TKMS-a u bolesnika prisutne samo stanice davatelja naziva se POTPUNI KIMERIZAM (engl. *complete* ili *full chimerism*, CC tj. FC).

Ako nakon TKMS-a u tijelu bolesnika postoje i primateljeve i davateljeve stanice u bilo kakvom omjeru, riječ je o MIJEŠANOM KIMERIZMU (engl. *mixed chimerism*, MC). Miješani kimerizam dijeli se na tri podtipa koji se odnose na njegovu stabilnost, odnosno smjer promjena omjeru stanica primatelja i davatelja nakon TKMS-a. Prvi podtip je stabilni miješani kimerizam pri kojem se udjeli stanica primatelja i davatelja ne mijenjaju značajno s vremenom. Drugi podtip je padajući miješani kimerizam pri kojemu dolazi do porasta udjela stanica primatelja, te treći podtip rastući miješani kimerizam pri kojemu dolazi i do porasta udjela stanica davatelja. Ovakav način podjele uobičajen je za istraživanja primjene analize kimerizma u predviđanju ishoda TKMS-a, s posebnim naglaskom na točno određivanje vrste miješanog kimerizma. Nai-me, smatra se da je upravo grupiranje svih ispitanika s miješanim kimerizmom u jednu skupinu moglo objasniti proturječne rezultate o vrijednosti praćenja kimerizma među bolesnicima s akutnim leukemijama. Rezultati istraživanja iz 2000. godine ne govorile o povećanom riziku za ponovnu pojavu bolesti

među bolesnicima s akutnim leukemijama kod kojih je uočen miješani kimerizam u usporedbi s bolesnicima koji su pokazivali puni kimerizam vjerojatno zbog toga što nisu analizirali podtipove miješanog kimerizma (2). Ovi rezultati su u suprotnosti s većinom dosad objavljenih radova iz ovog područja (3-6). Prema novijim istraživanjima koja su jasnije odredila skupinu bolesnika s MK-om, ishod TKMS-a za bolesnike s tzv. padajućim miješanim kimerizmom značajno se ne razlikuje od onog za bolesnike s punim kimerizmom, a vjerojatnost relapsa i smrtnog ishoda značajno je viša za bolesnike s rastućim miješanim kimerizmom.

I na kraju postoji i PODIJELJENI KIMERIZAM (engl. *split chimerism*, SC) kod kojeg su u jednoj staničnoj liniji prisutne samo stanice primatelja, a u drugoj samo stanice davatelja.

Praćenjem kimerizma nakon TKMS-a dobivaju se vrlo važni podaci o uspješnosti same transplantacije s obzirom na prihvatanje/odbacivanje transplantata, učinkovitost kemoterapije i drugih postupka kao što je npr. infuzija limfocita davatelja (engl. *Donor Lymphocyte Infusion*, DLI), itd. Međutim, procjena značenja pojedinačnog nalaza kimerizma a time i izbor intervencija koje određeni nalaz kimerizma iziskuje, ovisi o tome je li transplantacija provedena u svrhu liječenja nemaligine ili maligne bolesti (7-9). Tako na primjer nalaz rastućeg miješanog kimerizma nakon TKMS-a, kod teške aplastične anemije, anemije srpastih stanica, talasemije, različitih imuodeficiencija, povezan je s pojmom odbacivanja transplantata (10-12). Ako se kod takvog bolesnika utvrdi rastući miješani kimerizam, pravdobnom intervencijom kao što je primjena DLI-a ili ukidanje imunosupresije, moguće je spasti transplantat (13). S druge strane, za TKMS-a kao metodu liječenja malignih bolesti s HSCT-om glavni je cilj postizanje punog kimerizma. Prisutnost stanica primatelja nakon TKMS-a može ukazivati ili na preživljavanje tumorskih stanica ili na preživljavanje normalnih, zdravih hematopoetskih stanica primatelja ili oboje. Iz tog razloga utvrđivanje statusa kimerizma ne može biti zamjena za analizu minimalne ostatne bolesti (engl. *Minimal Residual Disease*, MRD), već je za pravilno praćenje prihvatanja transplantata i remisije potrebna kombinacija obiju metoda (14). Povezanost miješanog kimerizma i relapsa dobro je dokumentirana jedino za bolesnike s kroničnom mijeloičnom leukemijom, ali su rezultati istraživanja ove povezanosti za akutne oblike

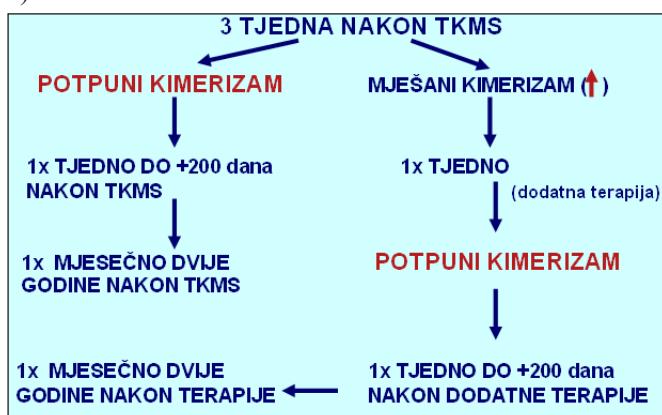
leukemije proturječni. Naime, neka su istraživanja ukazala na prediktivnu vrijednost miješanog kimerizma za pojavu relapsa, a druga nisu našla takvu povezanost (15-17). U svijetu postoje različiti protokoli za praćenje kimerizma nakon TKMS-a, to se u prvom redu odnosi na učestalost praćenja, a svima im je zajedničko da je praćenje kimerizma neophodno rutinski provoditi. Na slici 1 prikazana je shema jednog takvog protokola praćenja kimerizma nakon TKMS-a, posebno za maligne, a posebno za nemaligne bolesti (14).

Slika 1. Protokol praćenja kimerizma nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica

a) NEMALIGNE BOLESTI



b) MALIGNE BOLESTI



Praćenje kimerizma nakon TKMS-a doživjelo je veliki napredak sredinom osamdesetih godina 20. stoljeća kada je primjena lančane reakcije polimerezom (*engl Polymerase Chain Reaction, PCR*) postala metoda izbora u mnogim područjima molekulарne biologije, odnosno medicine. U ovom trenutku "zlatnim standardom" u praćenju kimerizma smatra se metoda koja analizira kratka uzastopna ponavljanja DNA, odnosno PCR-STR (*engl. Short Tandem Repeats*). U tablici 1 navedene su metode koje se koriste u praćenju kimerizma nakon TKMS-a, kao i njihovi nedostatci, prednosti, osjetljivost i informa-

tivnost. Treba spomenuti da se u nekim slučajevima mogu koristiti i geni HLA, ali u vrlo malom broju slučajeva budući da se u TKMS-u uglavnom traži davatelj potpuno podudaran za gene HLA.

Tablica 1. Metode za praćenje kimerizma nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica

METODA	OSJETLJIVOST(%)	PRIMJENJIVOST
RFLP	5 - 10	visoka
CITOGENETIKA	5	niska
KG	1 – 5	visoka
X/Y FISH	0,1 – 0,001	niska
PCR-STR	1 – 5	vrlo visoka
PCR-STR (subpopulacije)	0,1 – 0,001	vrlo visoka
PCR-SNP	0,001 – 0,0001	srednje visoka

Legenda: RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism, KG-krvne grupe; FISH-Florescent in Situ Hybridization; STR-Short Tandem Repeats; SNP-Single Nucleotide Polymorphism

Metoda PCR-STR temelji se na primjeni visoko polimorfnih mikrosatelitskih lokusa prisutnih u eukromatinskim regijama kromosoma svih eukariota osim kvasca. Mikrosateliti su sastavljeni od kratkih uzastopnih ponavljanja sljedova DNA (dužina ponavljanja je 1-6 parova baza). U humanom genomu javljaju se prosječno svakih 6kb, nalaze genskim (introni i egzoni), ali i izvengenskim regijama. Odlikuje ih visok stupanj mutacija (5×10^{-4} - 10^{-5} po mjestu po mejozi), kodominantno mendelsko nasljeđivanje. Lokusi STR variraju u dužini ponavljajućeg slijeda, broju ponavljanja, kao i složenosti ponavljajućeg uzorka (jednostavna, složena). Aleli pojedinih mikrosatelita međusobno se razlikuju po broju ponavljanja slijeda specifičnog za taj lokus. Zbog svoje vrlo visoke raznovrsnosti, lokusi STR-a su idealni genetski biljezi i vjerojatnost da će dvije osobe biti jednakе za alele nekoliko različitih mikrosatelita izuzetno mala. Stoga je moguće je razlikovati DNA koja potječe iz stanica primatelja i davatelja nakon TKMS-a, čak i kad se radi o braći. Jedini izuzetak su jednojajčani blizanci koji su identični za čitavu DNA pa tako i za mikrosatelite. Pri izboru lokusa STR-a koji će se koristiti u praćenju kimerizma treba uzeti u obzir broj poznatih alela na tom lokusu (ne manje od 5), kao i postotak heterozigotnosti koji treba biti veći od 70% (17-19).

Osim prednosti koje PCR-STR metoda pruža u poboljšanju liječenja, postoje i ograničenja, u prvom redu osjetljivost metode koja iznosi do 1% ako se ne provodi na staničnim subpopulacijama (20). Sama osjetljivost metode ovisi i o vrsti aparata koji se koristi za provođenje analize, naime aparatima novije generacije (sekvenceri koji se temelje na kapilarnoj elektroforezi) moguće je otkriti puno niže udjele alela primatelja ($\approx 1\%$). Iz tog razloga nalaz punog kimerizma treba tumačiti u okvirima metode, odnosno uzeti u obzir činjenicu kako ovim tipom analize nije moguće utvrditi prisutnost manje od 1% alela primatelja. Stoga se ovakva analiza ne može primjeniti za utvrđivanje minimalne ostatne bolesti, što bi također moglo objasniti i određene nedosljednosti u povezanosti statusa kimerizma s pojavom ponovne pojave bolesti. Naime, u istraživanjima provedenim u svijetu, ali i kod nas, ponovna pojava bolesti primjećena je i kod osoba kod kojih su uočeni samo aleli davatelja (21-23). Jedno od mogućih objašnjenja je preveliki vremenski razmak između analiza što je u skladu i s izrazito brzom dinamikom razvoja ponovne pojave bolesti kod akutnih leukemija. Međutim, drugi istraživači su opovrgnuli tu tvrdnju budući da su u svojim radovima opisali bolesnike kod kojih je ponovna pojava bolesti uočena samo dva mjeseca nakon posljednjeg nalaza punog kimerizma (24).

Uzorci, nužni za praćenje kimerizma su uzorak primatelja (najčešće krv) prije transplantacije, uzorak davatelja te uzorak (krv ili koštana srž) primatelja nakon TKMS-a. U samom postupku praćenja kimerizma nužno je otkriti lokuse STR-a informativne za pojedini par primatelj-davatelj (alele koji su prisutni kod primatelja, a nisu kod davatelja). Pri tome aleli pojedinog lokusa STR-a moraju biti jasno različiti između primatelja i davatelja tj. barem dva ponavljanja razlike (izbjegavati lokuse STR-a kod kojih se aleli međusobno razlikuju za samo jedno ponavljanje). Razlog tome je pojava, svojstvena umnažanju mikrosatelita tijekom PCR-a, a to su tzv. *stutter* signali koji su rezultat odvajanja DNA polimeraze od lanca DNA. Naime, prilikom spajanja nove molekule polimeraze koja će nastaviti produljivanje DNA može se stvoriti omča u lancu kalupa te tako, uz fragmente stvarne dužine alela koji se umnažaju, u manjoj mjeri nastaju i fragmenti koji su kraći za jedno ponavljanje osnovnog fragmenta. Takvi se ponavljajući sljedovi prilikom analize vide kao signali slabijeg intenziteta fluorescencije te, ako je alel specifičan za primatelja, samo za jedno ponavljanje kraći od alela specifičnog za davatelja, mogu dovesti do lažno pozitivnog, odnosno negativnog nalaza. Osim

toga nužno je koristiti minimalno dva informativa mikrosatelita (pojedini protokoli govore da su dovoljna dva lokusa STR, dok je u našem postupniku za praćenje kimerizma nužno analizirati minimalno tri informativna lokusa). Naime, u slučaju da se koristi samo jedan lokus STR-a može doći do lažno pozitivnog ili negativnog rezultata zbog činjenice da je stopa mutacije na lokusima s ponavljajućim sljedovima DNA viša nego za kodirajuće dijelove genoma. Najčešće su mutacije ovih lokusa adicije ili delecije jedne ponavljajuće jedinice. Stoga je, kao posljedica ove osobine mikrosatelitskih lokusa, moguće da se analizom samo jednog lokusa pogrešno odredi porijeklo stanica u uzorku ispitanika nakon TKMS-a. Također je bolje koristiti lokuse na različitim kromosomima, a ne samo na jednom. Naime, u leukemijskim su stanicama česte promjene strukture kromosoma (delecije, prerazmještaji itd.) te bi stoga pouzdavanje u rezultate analize lokusa STR-a na samo jednom kromosomu također moglo dovesti do krivih zaključaka. Lokusi STR-a, koji se koriste u našem protokolu, prikazani su u tablici 2 kao i njihove osobine, navedeni lokusi smješteni na različitim kromosomima i broj alela im varira od 7 do 23.

Tablica 2. Smještaj i osobine mikrosatelitskih lokusa za praćenje kimerizma nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica

LOKUS	KROMOSOM	BROJ POZNATIH ALELA	DULJINA ALELA (pb)
TH01	11	8	154-178
VWFA31	12	13	122-166
FES/FPS	15	10	202-238
F13A01	6	16	179-235
SE33	5	23	233-319
D1S549	1	10	157-193
D1S1656	1	13	129-168
D12S391	12	15	209-253
D18S535	18	8	130-158
D22S683	22	18	168-204

Legenda: pb - parova baza

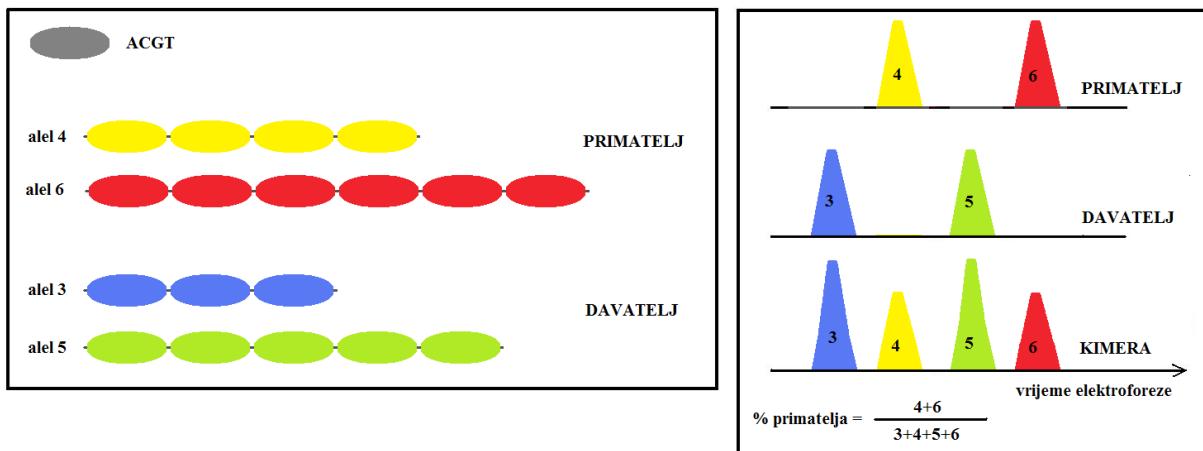
Važno je istaknuti da nisu svi lokusi STR-a dobri za praćenje kimerizma unatoč što imaju veći broj alela koji se međusobno razlikuju za 4 para baza. Stoga je prije primjene pojedinog mikrosatelita u praćenju kimerizma potrebno napraviti populacijska istraživanja i utvrditi informativnost tih lokusa tj. postotak heterozigotnosti (60-70%). Lokusi STR-a koji se koriste u našem postupniku u populacijskom istraživanju raznovrsnost tih lokusa u našoj popula-

ciji pokazali su heterozigotnost od 61,3% (FES/FPS) do 94,0% (SE33), (17, 18). Lokus FES/FPS se primjenjuje unatoč tome što mu je informativnosti bila na donoj graničnoj vrijednosti.

Jedna od prednosti metode PCR-STR je mogućnost da se intenzitet fluorescencije prikaže visinom

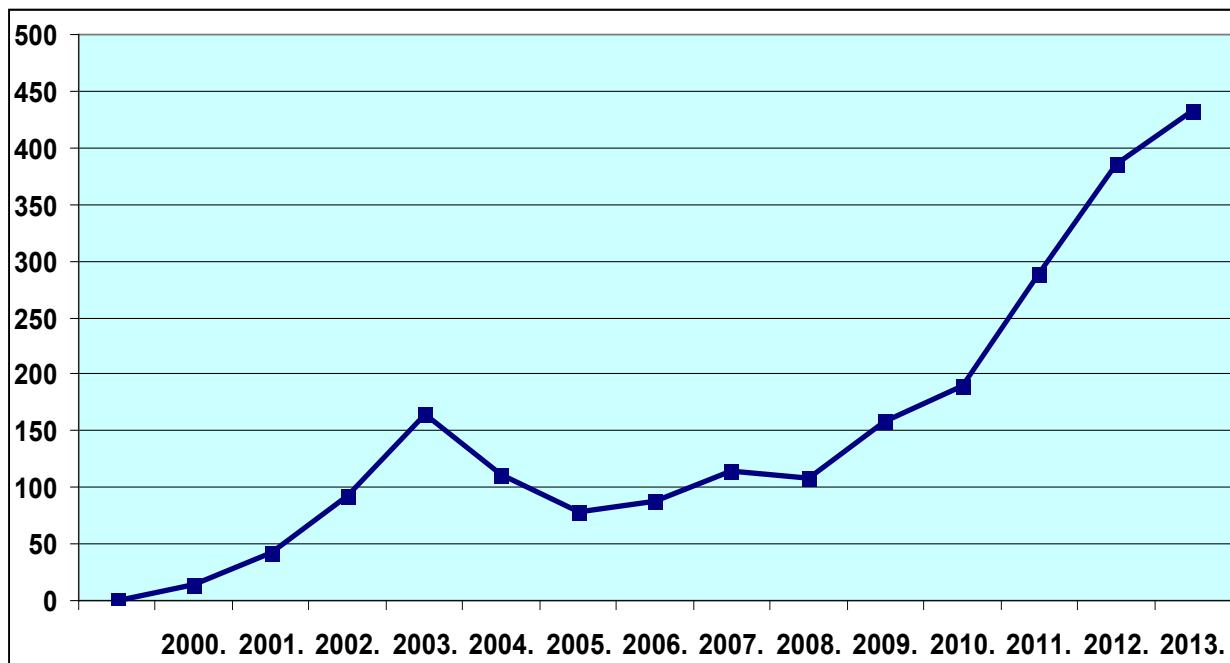
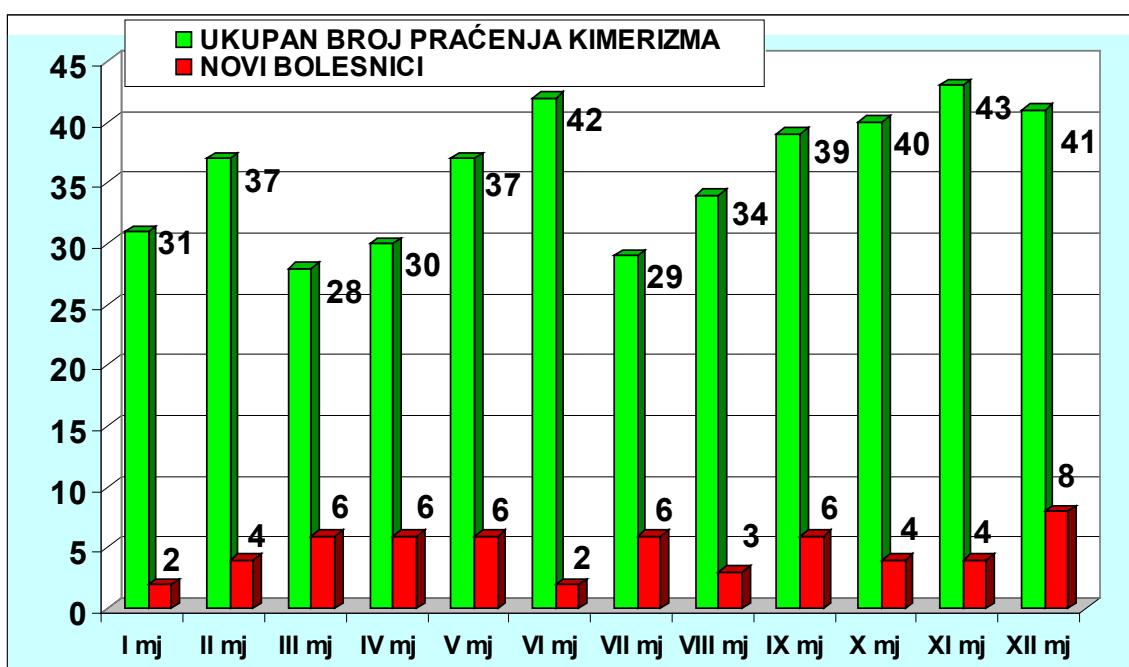
odnosno površinom, pojedinog signala koji odgovara alelu primatelja, odnosno davatelja i izražen je s brojčanom vrijednošću. Tako je iz omjera visine "pinkova" koji predstavljaju alele primatelja i davatelja za pojedini mikrosatelitski lokus moguće izračunati omjer stanica primatelja i davatelja (Slika 2.).

Slika 2. Shematski prikaz analize alela mikrosatelita u praćenju kimerizma



Praćenje kimerizma nakon TKMS-a u Zavodu za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb započeto je 2000. godine kad je bilo uključeno prvih četrnaest bolesnika. Od tada taj broj neprekidno raste i u 2013. godini ukupan broj pretraga iznosio je 445 (Slika 3.). Također je i broj bolesnika uključenih u praćenje kimerizma nakon TKMS-a s prvostrukim četrnaest narastao na 57 novo transplantiranih bolesnika u prošloj godini (Slika 4.). U proteklom razdoblju od 15 godina ukupan broj bolesnika uključenih u praćenje kimerizma iznosio je 431. Standardni protokol za pra-

ćenje kimerizma podrazumijeva da se prvi uzorak bolesnika analizira tri tjedna nakon TKMS-a, zatim svaka 2-3 tjedna tri mjeseca nakon TKMS-a, a nakon toga 6 mjeseci nakon TKMS-a i zatim jednom godišnje. Broj određivanja statusa kimerizma po bolesniku iznosio je od jedne do najviše 22 analize, a prosječan broj bio je 6,5, a sam postupak pokazao je prognostičku vrijednost jer je status kimerizma kod transplantiranih bolesnika odgovarao njihovom kliničkom stanju.

Slika 3. Ukupan broj praćenja kimerizma u razdoblju 2000.-2013.g. u KJ za tipizaciju tkiva KBC Zagreb*Slika 4. Kimerizam - broj pretraga obavljenih tijekom 2013.g. u KJ za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb*

LITERATURA:

1. Rinkevich B. Human natural chimerism: An Acquired Character or a vestige of evolution. *Human Immunology* 2001; 62: 651-657.
2. Choi SJ, Lee KH, Lee JH, Kim S, Chung HJ, Lee JS, Kim SH, Park CJ, Chi HS, Kim WK. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplantation* 2000;26:327-332.
3. Bader P, Hoelle W, Klingebiel T, Handgretinger R, Benda N, Schlegel PG, Niethammer D, Beck J. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. *Bone Marrow Transplantation* 1997;19:697-702.
4. Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A, Heiniger A. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica* 2003;88:801-810.
5. Bader P, Dückers G, Kreyenberg H, Hoelle W, Kerst G, Lang P, Greil J, Niethammer D, Beck LF, Klingebiel T. Monitoring of donor cell chimerism for the detection of relapse and early immunotherapeutic intervention in acute lymphoblastic leukemias. *Annual Hematol* 2002;81:S25-S27.
6. Miura Y, Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Kato N, Hirate D, Kaji M, Sugita J, Shigematsu A, Iwao N, Ota S, Masauzi N, Fukuhara T, Kasai M, Asaka M, Imamura M. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37(9): 837-843.
7. Formankova R, Honzatkova L, Sieglova Z et al. Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 2000;25:453-456.
8. Gorczynska E, Turkiewicz D, Toporski J et al. Prompt initiation of immunotherapy in children with an increasing number of autologous cells after allogeneic HCT can induce complete donor-type chimerism: a report of 14 children. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:211-217.
9. Lin MT, Tseng LH, Beierl K, Harada S, Hafez MJ, Eshleman JR, Gocke CD. Analysis of hematopoietic stem cell transplant engraftment: use of loss or gain of microsatellite alleles to identify residual hematopoietic malignancy. *Diagnostic Molecular Pathology* 2011;20:194-202.
10. Gomez JR, Garcia MJ, Serrano J et al. Chimerism analysis in long-term survivor patients after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Haematologica* 1997; 82:588-591.
11. Preuner S, Lion T. Post-transplant Monitoring of Chimerism by Lineage-Specific Analysis. *Methods Molecular Biology* 2014;1109:271-291.
12. Lawler M, McCann SR, Marsh JC, Ljungman P, Hows J, Vandenbergh E, O'Riordan J, Locasciulli A, Socié G, Kelly A, Schrenzenmeier H, Marin P, Tichelli A, Passweg JR, Dickenson A, Ryan J, Bacigalupo A; Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. *Br J Haematol.* 2009;144:933-945.
13. Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplantation* 2005;35:107-119.
14. Shaffer BC, Modric M, Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Steinberg SM, Liewehr DJ, Fowler DH, Gale RP, Bishop MR, Pavletic SZ. Rapid complete donor lymphoid chimerism and graft-versus-leukemia effect are important in early control of chronic lymphocytic leukemia. *Experimental Hematology* 2013;41:772-778.
15. Nikolousis E, Robinson S, Nagra S, Brookes C, Kinsella F, Tauro S, Jeffries S, Griffiths M, Mahendra P, Cook M, Panessa S, Lovell R, Kishore B, Chaganti S, Malladi R, Raghavan M, Moss P, Milligan D, Craddock C. Post-transplant T cell chimerism predicts graft versus host disease but not disease relapse in patients undergoing an alemtuzumab based reduced intensity conditioned allogeneic transplant. *Leukemia Research* 2013;37:561-565.
16. Jiang Y, Wan LP, Qin YW, Wang XR, Yan SK, Xie KC, Wang C. Chimerism status is correlated to acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *International Journal of Hematology* 2014, in press.
17. Grubic Z, Stingl K, Cecuk Jelicic E, Zunec R, Kastelan A, Serventi Seiwerth R, Bogdanic V, Labar B, Kerhin Brkljacic V. Repetitive DNA polymorphisms in following chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Clinical Transplantation* 2005;19:586-590.
18. Grubic Z, Stingl K, Cecuk-Jelicic E, Zunec R, Serventi Seiwerth R, Labar B, Rajic Lj, Brkljacic-Kerhin V. Evaluation of mixed chimerism in bone marrow transplantation program in Croatia. *Transplant Proceedings* 2005;37:1388-1391.
19. Stingl K. Uloga rezultata analize mikrosatelitskih lokusa u transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica. 2009, Doktorska disertacija, Medinski fakultet Zagreb.
20. Kristoff D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplantation* 2007;39:255-168.
21. Mattsson J, Uzunel M, Tammik L, Aschan J, Ringden O. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001;15:1976-1985.
22. Ramirez M, Diaz M, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, Vicario JL, Madero L. Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:1161-1165.
23. Bader P, Willasch A, Klingebiel T. Monitoring of post-transplant remission of childhood malignancies: is there a standard? *Bone Marrow Transplantation* 2008;42:S31-S34.
24. Rossi G, Carella AM, Minervini MM, Savino L, Fontana A, Pellegrini F, Greco MM, Merla E, Quarta G, Loseto G, Capalbo S, Palumbo G, Cascavilla N. Minimal residual disease after allogeneic stem cell transplant: a comparison among multiparametric flow cytometry, Wilms tumor 1 expression and chimerism status (Complete chimerism versus Low Level Mixed Chimerism) in acute leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2013;54:2660-2666.

Formiranje multidisciplinarnog tima za liječenje kronične reakcije davatelja protiv primatelja i dugotrajnih komplikacija nakon transplantacije alogeničnih krvotvornih matičnih stanica u Kliničkom bolničkom centru Zagreb

Lana Grković¹, Dražen Pulanić¹, Ranka Serventi-Seiwerth¹, Nikolina Matić¹, Marinka Mravak-Stipetić², Ervina Bilić³, Romana Čeović⁴, Dina Ljubas⁵, Ljubica Rajić⁶, Ernest Bilić⁶, Nadira Duraković¹, Zinaida Perić¹, Tajana Klepac Pulanić⁷, Kristina Kovač⁸, Davorka Dušek⁹, Ines Bojanic¹⁰, Magdalena Grce¹¹, Drago Batinić¹², Radovan Vrhovac¹, Steven Živko Pavletić¹³, Damir Nemet¹

¹Zavod za hematologiju KBC Zagreb, ²Zavod za oralnu patologiju, Klinika za stomatologiju, ³Klinika za neurologiju KBC Zagreb, ⁴Klinika za kožne i spolne bolesti KBC Zagreb, ⁵Zavod za gastroenterologiju KBC Zagreb, ⁶Klinika za pedijatriju, Zavod za hematologiju i onkologiju, KBC Zagreb, ⁷Dom zdravlja istok, Zagreb,

⁸Klinika za fizikalnu medicinu i rehabilitaciju KBC Zagreb, ⁹Klinika za infektiivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", ¹⁰Zavod za transfuziologiju KBC Zagreb, ¹¹Institut Ruđer Bošković, ¹²Zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb, Zagreb, ¹³Transplantation and Immunology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, SAD

Adresa autora za kontaktiranje:

Lana Grković, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

E-pošta: lana.grkovic@gmail.com

Transplantacija alogeničnih krvotvornih matičnih stanica je metoda izlječenja za mnoge bolesnike s malignim i nemalignim bolestima. Kronična reakcija davatelja protiv primatelja (eng. *Chronic graft versus host disease - cGVHD*) vodeći je uzrok smrti koji nije povezan s relapsom osnovne bolesti u preživjelih nakon transplantacije alogeničnih krvotvornih matičnih stanica (aloTKMS), ali je ujedno povezan s nižom stopom relapsa maligne bolesti (1-3).

Incidencija cGVHD se vjerojatno povećava zbog starije životne dobi transplantiranih bolesnika, sve manjeg peritransplantacijskog mortaliteta, upotrebe perifernih krvotvornih matičnih stanica i sve većeg broja transplantacija od nesrodnog darivatelja. Incidencija varira od 40-60%. Početak bolesti je varijabilan i javlja se između 3 i 24 mjeseca nakon aloTKMS (4, 5). Većina slučajeva dijagnosticira se u prvoj godini nakon transplantacije, ali 5-10% slučajeva se dijagnosticira i nakon godine dana. Bolest zahvaća brojne organe, zahtijeva multidisciplinarni pristup i prolongiranu imunosupresivnu terapiju. Važno je što ranije prepoznati simptome bolesti i postaviti dijagnozu zato što je cilj zbrinjavanja kontrola simptoma i sprječavanje ireverzibilnih ostečenja i invalidnosti. 2005. godine National Institutes of Health (NIH) konsenzus o cGVHD-u donio je nove standardne definicije za poboljšanje dijagnoze, klasifikacije i stupnjevanje težine bolesti, kao i mjerjenje odgovora na terapiju koje se koriste i implementiraju pri pregledu i evaluiranju naših bolesnika (5).

Multidisciplinarni tim čine profesionalci različitih disciplina ili specijalnosti koji rade zajedno kako bi pacijentu pružili sveobuhvatnu skrb. Kako se bolesnikovo stanje s vremenom mijenja, tako se i sastav tima također može mijenjati kao odraz promjenjivosti kliničkih i psihosocijalnih potreba bolesnika (7).

U KBC Zagreb nedavno je formiran multidisciplinarni tim (Slika 1.) za liječenje cGVHD i dugotrajnih komplikacija nakon aloTKMS u suradnji s National Cancer Institute, NIH, SAD i uz potporu Fonda „Jedinstvo uz pomoć znanja“ podržan od Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta i Svjetske banke.

**UNITY THROUGH
KNOWLEDGE FUND**



Slika 1.

Riječ je o međunarodnom projektu "Clinical and biological factors determining severity and activity of chronic Graft-versus-Host Disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation", čiji su voditelji prof. dr. sc. Živko Steven Pavletić i prof. dr. sc. Damir Nemet. U projektu uz američki National Cancer Institute, NIH, sudjeluje sedam hrvatskih ustanova: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, KROHEM, Institut "Ruđer Bošković", Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", te Dom zdravlja Zagreb - Istok.

Posljednjih godina u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu oko 60 bolesnika godišnje liječi se transplantacijom alogeničnih krvotornih matičnih stanica. U multidisciplinarnom timu za kronični GVHD bolesnike prvo pregleda hematolog: standardna anamneza i status (osnovna bolest, posttransplantacijska anamneza, lijekovi, infekcije, stupanj reintegracija u svakodnevni život, kvaliteta života), nakon čega se fokusira na podatke o prijašnjem akutnom GVHD, trenutne simptome koji upućuju na cGVHD, početak bolesti, te na pojedine organe koji su zahvaćeni s bolesti (koža, oči, usta, gastrointestinalni trakt, jetra, pluća, genitalni i muskuloskeletalni sustav). Naposljetku se ispunjavaju standardni formulari za evaluaciju cGVHD: NIH formular za kronični GVHD (Slika 2.), formular A o aktivnosti bolesti (Slika 3.).

Slika 2.

CGVHD score sheet			
	SCORE 0	SCORE 1	SCORE 2
PERFORMANCE SCORE:	<input type="checkbox"/> Asymptomatic and fully active (ECOG 0; KPS or LPS 100%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, fully ambulatory, restricted only in physically strenuous activity (ECOG 1, KPS or LPS 80-90%)	<input type="checkbox"/> Symptomatic, ambulator, capable of self-care, >50% of waking hours out of bed (ECOG 2, KPS or LPS 60-70%)
KPS ECOG LPS			<input type="checkbox"/> Symptomatic, limited self-care, >50% of waking hours in bed (ECOG 3-4, KPS or LPS <60%)
SKIN	<input type="checkbox"/> No Symptoms	<input type="checkbox"/> <18% BSA with disease signs but NO sclerotic features	<input type="checkbox"/> 19-50% BSA OR involvement with superficial sclerotic features "hidebound" (able to pinch) OR impaired mobility, ulceration or severe pruritus
Clinical features:	<input type="checkbox"/> Maculopapular rash <input type="checkbox"/> Lichen planus-like features <input type="checkbox"/> Papulopapular lesions or ichthyosis <input type="checkbox"/> Hyperpigmentation <input type="checkbox"/> Hypopigmentation <input type="checkbox"/> Keratosis pilaris <input type="checkbox"/> Erythema <input type="checkbox"/> Erythroderma <input type="checkbox"/> Poikiloderma <input type="checkbox"/> Sclerotic features <input type="checkbox"/> Pruritis <input type="checkbox"/> Hair involvement <input type="checkbox"/> Nail involvement % BSA involved <input type="checkbox"/>		
MOUTH	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms with disease signs but not limiting oral intake significantly	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms with disease signs with partial limitation of oral intake
EYES	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild dry eye symptoms not affecting ADL (requiring eyedrops ≤ 3 x per day) OR asymptomatic signs of keratoconjunctivitis sicca	<input type="checkbox"/> Moderate dry eye symptoms partially affecting ADL (requiring drops > 3 x per day or punctal plugs), WITHOUT vision impairment
Mean tear test (mm):	<input type="checkbox"/> >10 <input type="checkbox"/> 6-10 <input type="checkbox"/> ≤5 <input type="checkbox"/> Not done		<input type="checkbox"/> Severe dry eye symptoms significantly affecting ADL (special eyewear to relieve pain) OR unable to work because of ocular symptoms OR loss of vision caused by keratoconjunctivitis sicca

GI TRACT	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Symptoms such as dysphagia, anorexia, nausea, vomiting, abdominal pain or diarrhea without significant weight loss (<5%)	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with mild to moderate weight loss (5-15%)	<input type="checkbox"/> Symptoms associated with significant weight loss >15%, requires nutritional supplement for most calorie needs OR esophageal dilation
LIVER	<input type="checkbox"/> Normal LFT	<input type="checkbox"/> Elevated Bilirubin, AP*, AST or ALT <2 x ULN	<input type="checkbox"/> Bilirubin >3 mg/dl or Bilirubin, enzymes 2-5 x ULN	<input type="checkbox"/> Bilirubin or enzymes > 5 x ULN
LUNGS*	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild symptoms (shortness of breath after climbing one flight of steps)	<input type="checkbox"/> Moderate symptoms (shortness of breath after walking on flat ground)	<input type="checkbox"/> Severe symptoms (shortness of breath at rest; requiring O ₂)
FEV1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> FEV1 > 80% OR LFS=2	<input type="checkbox"/> FEV1 60-79% OR LFS 3-5	<input type="checkbox"/> FEV1 40-59% OR LFS 6-9
DLCO				<input type="checkbox"/> FEV1 ≤30% OR LFS 10-12
JOINTS AND FASCIA	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Mild tightness of arms or legs, normal or mild decreased range of motion (ROM) AND not affecting ADL	<input type="checkbox"/> Tightness of arms or legs OR joint contractures, erythema due to fasciitis, moderate decrease ROM AND mild to moderate limitation of ADL	<input type="checkbox"/> Contractures WITH significant decrease of ROM AND significant limitation of ADL (unable to tie shoes, button shirts, dress self etc.)
GENITAL TRACT	<input type="checkbox"/> No symptoms	<input type="checkbox"/> Symptomatic with mild signs on exam AND no effect on coitus and minimal discomfort with gynecologic exam	<input type="checkbox"/> Symptomatic with moderate signs on exam AND with mild dyspareunia or discomfort with gynecologic exam	<input type="checkbox"/> Symptomatic WITH advanced signs (stricture, labial agglutination or severe ulceration) AND severe pain with coitus or inability to insert vaginal speculum

* AP may be elevated in growing children, and not reflective of liver dysfunction

Other indicators, clinical manifestations or complications related to cGVHD (check all that apply and assign a score to its severity (0-3) based on its functional impact (none = 0,mild = 1, moderate = 2, severe = 3))

Esophageal stricture or web _____ Pericardial Effusion _____ Pleural Effusion(s) _____
 Ascites (serositis) _____ Nephrotic syndrome _____ Peripheral Neuropathy _____
 Myasthenia Gravis _____ Cardiomyopathy _____ Eosinophilia > 500/ μ l _____
 Polymyositis _____ Cardiac conduction defects _____ Coronary artery involvement _____
 Platelets <100,000/ μ l _____ Progressive onset _____
 OTHERS: _____

Slika 3.

Current Patient Weight:	Today's Date:	MRN/Name:																																																																																																																																																																																																
CHRONIC GVHD ACTIVITY ASSESSMENT - CLINICIAN																																																																																																																																																																																																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Component</td> <td style="width: 40%;">Findings</td> <td style="width: 50%;">Scoring (see skin score worksheet)</td> </tr> <tr> <td>Skin</td> <td>• Erythema/mustard rash of any sort</td> <td>% BSA (max 100%)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>• Movable scarring</td> <td>% BSA (max 100%)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>• Non-movable scarring (fixed/bound down/pinchable) or subcutaneous sclerotic/fibrosis</td> <td>% BSA (max 100%)</td> </tr> <tr> <td>Ulcer(s): select the largest ulcerative lesion, and measure its largest dimension in cm and mark location of ulcer</td> <td></td> <td>Location: _____ Largest dimension: _____ cm</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Eyes</td> <td style="width: 40%;">Right Eye: mm of wetting</td> <td style="width: 50%;">Left Eye: mm of wetting</td> </tr> <tr> <td>Bilateral Schirmer's Tear Test (without anaesthesia) in persons 9 years or older</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Mouth</td> <td style="width: 40%;">Mucosal change</td> <td style="width: 50%;">No evidence of cGVHD</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Mild</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Moderate</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Severe</td> </tr> <tr> <td>Erythema</td> <td>None</td> <td>Mid erythema or moderate erythema ($<25\%$)</td> <td>Moderate (25-50%) or Severe erythema ($>50\%$)</td> <td>Severe erythema ($>25\%$)</td> </tr> <tr> <td>Lichenoid</td> <td>None</td> <td>Hyperkeratotic changes ($<25\%$)</td> <td>Hyperkeratotic changes (25-50%)</td> <td>Hyperkeratotic changes ($>50\%$)</td> </tr> <tr> <td>Ulcers</td> <td>None</td> <td>None</td> <td>Ulcers involving (20%)</td> <td>Severe ulcerations ($>20\%$)</td> </tr> <tr> <td>Mucocles*</td> <td>None</td> <td>1-5 mucocles</td> <td>6-10 scattered mucocles</td> <td>Over 10 mucocles</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right;">Mucocles scored for lower labial and soft palate only</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right;">Total score for all mucosal changes</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Blood Counts</td> <td style="width: 40%;">Plated Count</td> <td style="width: 40%;">KUL</td> <td style="width: 20%;">ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>KUL</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td>Liver Function Tests</td> <td>Total serum bilirubin mg/dl</td> <td>ULN</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ALT</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ULN</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Alkaline Phosphatase</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ULN</td> <td>UL</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Upper GI</td> <td colspan="4">1= no symptoms 2= mild, occasional symptoms, with little reduction in oral intake during the past week 3= moderate symptoms, with some reduction in oral intake, but able to prevent or correct symptoms with diet or fluids 4= severe or persistent symptoms throughout the day, with marked reduction in oral intake, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Esophageal</td> <td colspan="4">1= no esophageal symptoms 2= intermittent dysphagia orodynophagia with solid food or pills, but not for liquids or soft foods, during the past week 3= intermittent dysphagia orodynophagia for almost all oral intake, or almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Lower GI</td> <td colspan="4">1= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 2= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 3= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Lungs</td> <td colspan="4">1= no symptoms 2= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 3= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 4= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Health Care Provider Global Rating:</td> <td style="width: 90%;">Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5= moderate to severe 6= severe 7= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Most severe cGVHD symptoms Possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Over the past month would you say that this patient's cGVHD is</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>% Predicted</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Functional Performance (in persons 4-10 years old)</td> <td style="width: 40%;">Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes</td> <td style="width: 40%;">Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi</td> <td style="width: 20%;">Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>○ Physical Therapy Report Attached</td> </tr> <tr> <td>Score</td> <td>Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)</td> <td></td> <td>Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>1= able, normal</td> <td></td> <td>1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>2= minor restriction in physical activities</td> <td></td> <td>Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>3= able, but more easily</td> <td></td> <td>Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>4= both greater restriction of and less time spent in play/activity</td> <td></td> <td>Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities</td> <td></td> <td>Requires considerable assistance and frequent medical care</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities</td> <td></td> <td>Desires hospitalization, but can care for self</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>7= Mostly in bed, participates in quiet activities</td> <td></td> <td>Desires special care and assistance</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>8= In bed; needs assistance even for quiet play</td> <td></td> <td>Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>9= Needs assistance to get out of bed</td> <td></td> <td>Needs constant assistance, active supportive measures necessary</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10= Unconscious</td> <td></td> <td>Dead</td> </tr> </table> </td> </tr> </table></td></tr></table>			Component	Findings	Scoring (see skin score worksheet)	Skin	• Erythema/mustard rash of any sort	% BSA (max 100%)		• Movable scarring	% BSA (max 100%)		• Non-movable scarring (fixed/bound down/pinchable) or subcutaneous sclerotic/fibrosis	% BSA (max 100%)	Ulcer(s): select the largest ulcerative lesion, and measure its largest dimension in cm and mark location of ulcer		Location: _____ Largest dimension: _____ cm	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Eyes</td> <td style="width: 40%;">Right Eye: mm of wetting</td> <td style="width: 50%;">Left Eye: mm of wetting</td> </tr> <tr> <td>Bilateral Schirmer's Tear Test (without anaesthesia) in persons 9 years or older</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			Eyes	Right Eye: mm of wetting	Left Eye: mm of wetting	Bilateral Schirmer's Tear Test (without anaesthesia) in persons 9 years or older			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Mouth</td> <td style="width: 40%;">Mucosal change</td> <td style="width: 50%;">No evidence of cGVHD</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Mild</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Moderate</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Severe</td> </tr> <tr> <td>Erythema</td> <td>None</td> <td>Mid erythema or moderate erythema ($<25\%$)</td> <td>Moderate (25-50%) or Severe erythema ($>50\%$)</td> <td>Severe erythema ($>25\%$)</td> </tr> <tr> <td>Lichenoid</td> <td>None</td> <td>Hyperkeratotic changes ($<25\%$)</td> <td>Hyperkeratotic changes (25-50%)</td> <td>Hyperkeratotic changes ($>50\%$)</td> </tr> <tr> <td>Ulcers</td> <td>None</td> <td>None</td> <td>Ulcers involving (20%)</td> <td>Severe ulcerations ($>20\%$)</td> </tr> <tr> <td>Mucocles*</td> <td>None</td> <td>1-5 mucocles</td> <td>6-10 scattered mucocles</td> <td>Over 10 mucocles</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right;">Mucocles scored for lower labial and soft palate only</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right;">Total score for all mucosal changes</td> </tr> </table>			Mouth	Mucosal change	No evidence of cGVHD			Mild			Moderate			Severe	Erythema	None	Mid erythema or moderate erythema ($<25\%$)	Moderate (25-50%) or Severe erythema ($>50\%$)	Severe erythema ($>25\%$)	Lichenoid	None	Hyperkeratotic changes ($<25\%$)	Hyperkeratotic changes (25-50%)	Hyperkeratotic changes ($>50\%$)	Ulcers	None	None	Ulcers involving (20%)	Severe ulcerations ($>20\%$)	Mucocles*	None	1-5 mucocles	6-10 scattered mucocles	Over 10 mucocles	Mucocles scored for lower labial and soft palate only			Total score for all mucosal changes			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Blood Counts</td> <td style="width: 40%;">Plated Count</td> <td style="width: 40%;">KUL</td> <td style="width: 20%;">ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>KUL</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td>Liver Function Tests</td> <td>Total serum bilirubin mg/dl</td> <td>ULN</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ALT</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ULN</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Alkaline Phosphatase</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ULN</td> <td>UL</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Upper GI</td> <td colspan="4">1= no symptoms 2= mild, occasional symptoms, with little reduction in oral intake during the past week 3= moderate symptoms, with some reduction in oral intake, but able to prevent or correct symptoms with diet or fluids 4= severe or persistent symptoms throughout the day, with marked reduction in oral intake, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Esophageal</td> <td colspan="4">1= no esophageal symptoms 2= intermittent dysphagia orodynophagia with solid food or pills, but not for liquids or soft foods, during the past week 3= intermittent dysphagia orodynophagia for almost all oral intake, or almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Lower GI</td> <td colspan="4">1= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 2= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 3= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Lungs</td> <td colspan="4">1= no symptoms 2= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 3= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 4= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Health Care Provider Global Rating:</td> <td style="width: 90%;">Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5= moderate to severe 6= severe 7= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Most severe cGVHD symptoms Possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Over the past month would you say that this patient's cGVHD is</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>% Predicted</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Functional Performance (in persons 4-10 years old)</td> <td style="width: 40%;">Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes</td> <td style="width: 40%;">Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi</td> <td style="width: 20%;">Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>○ Physical Therapy Report Attached</td> </tr> <tr> <td>Score</td> <td>Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)</td> <td></td> <td>Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>1= able, normal</td> <td></td> <td>1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>2= minor restriction in physical activities</td> <td></td> <td>Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>3= able, but more easily</td> <td></td> <td>Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>4= both greater restriction of and less time spent in play/activity</td> <td></td> <td>Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities</td> <td></td> <td>Requires considerable assistance and frequent medical care</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities</td> <td></td> <td>Desires hospitalization, but can care for self</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>7= Mostly in bed, participates in quiet activities</td> <td></td> <td>Desires special care and assistance</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>8= In bed; needs assistance even for quiet play</td> <td></td> <td>Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>9= Needs assistance to get out of bed</td> <td></td> <td>Needs constant assistance, active supportive measures necessary</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10= Unconscious</td> <td></td> <td>Dead</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>			Blood Counts	Plated Count	KUL	ULN			KUL	ULN	Liver Function Tests	Total serum bilirubin mg/dl	ULN	ULN			ALT	ULN			ULN	ULN			Alkaline Phosphatase	ULN			ULN	UL	Gastrointestinal-Upper GI	1= no symptoms 2= mild, occasional symptoms, with little reduction in oral intake during the past week 3= moderate symptoms, with some reduction in oral intake, but able to prevent or correct symptoms with diet or fluids 4= severe or persistent symptoms throughout the day, with marked reduction in oral intake, on almost every day of the past week				Gastrointestinal-Esophageal	1= no esophageal symptoms 2= intermittent dysphagia orodynophagia with solid food or pills, but not for liquids or soft foods, during the past week 3= intermittent dysphagia orodynophagia for almost all oral intake, or almost every day of the past week				Gastrointestinal-Lower GI	1= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 2= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 3= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week				Lungs	1= no symptoms 2= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 3= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 4= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Health Care Provider Global Rating:</td> <td style="width: 90%;">Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5= moderate to severe 6= severe 7= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Most severe cGVHD symptoms Possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Over the past month would you say that this patient's cGVHD is</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>% Predicted</td> </tr> </table>				Health Care Provider Global Rating:	Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?		1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe		5= moderate to severe 6= severe 7= very severe		8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible		Most severe cGVHD symptoms Possible		Over the past month would you say that this patient's cGVHD is		1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe		% Predicted	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Functional Performance (in persons 4-10 years old)</td> <td style="width: 40%;">Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes</td> <td style="width: 40%;">Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi</td> <td style="width: 20%;">Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>○ Physical Therapy Report Attached</td> </tr> <tr> <td>Score</td> <td>Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)</td> <td></td> <td>Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>1= able, normal</td> <td></td> <td>1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>2= minor restriction in physical activities</td> <td></td> <td>Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>3= able, but more easily</td> <td></td> <td>Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>4= both greater restriction of and less time spent in play/activity</td> <td></td> <td>Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities</td> <td></td> <td>Requires considerable assistance and frequent medical care</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities</td> <td></td> <td>Desires hospitalization, but can care for self</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>7= Mostly in bed, participates in quiet activities</td> <td></td> <td>Desires special care and assistance</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>8= In bed; needs assistance even for quiet play</td> <td></td> <td>Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>9= Needs assistance to get out of bed</td> <td></td> <td>Needs constant assistance, active supportive measures necessary</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10= Unconscious</td> <td></td> <td>Dead</td> </tr> </table>				Functional Performance (in persons 4-10 years old)	Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes	Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi	Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support				○ Physical Therapy Report Attached	Score	Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)		Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)	100	1= able, normal		1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease	90	2= minor restriction in physical activities		Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease	80	3= able, but more easily		Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work	70	4= both greater restriction of and less time spent in play/activity		Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs	60	5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities		Requires considerable assistance and frequent medical care	50	6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities		Desires hospitalization, but can care for self	40	7= Mostly in bed, participates in quiet activities		Desires special care and assistance	30	8= In bed; needs assistance even for quiet play		Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent	20	9= Needs assistance to get out of bed		Needs constant assistance, active supportive measures necessary	10	10= Unconscious		Dead
Component	Findings	Scoring (see skin score worksheet)																																																																																																																																																																																																
Skin	• Erythema/mustard rash of any sort	% BSA (max 100%)																																																																																																																																																																																																
	• Movable scarring	% BSA (max 100%)																																																																																																																																																																																																
	• Non-movable scarring (fixed/bound down/pinchable) or subcutaneous sclerotic/fibrosis	% BSA (max 100%)																																																																																																																																																																																																
Ulcer(s): select the largest ulcerative lesion, and measure its largest dimension in cm and mark location of ulcer		Location: _____ Largest dimension: _____ cm																																																																																																																																																																																																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Eyes</td> <td style="width: 40%;">Right Eye: mm of wetting</td> <td style="width: 50%;">Left Eye: mm of wetting</td> </tr> <tr> <td>Bilateral Schirmer's Tear Test (without anaesthesia) in persons 9 years or older</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			Eyes	Right Eye: mm of wetting	Left Eye: mm of wetting	Bilateral Schirmer's Tear Test (without anaesthesia) in persons 9 years or older																																																																																																																																																																																												
Eyes	Right Eye: mm of wetting	Left Eye: mm of wetting																																																																																																																																																																																																
Bilateral Schirmer's Tear Test (without anaesthesia) in persons 9 years or older																																																																																																																																																																																																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Mouth</td> <td style="width: 40%;">Mucosal change</td> <td style="width: 50%;">No evidence of cGVHD</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Mild</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Moderate</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Severe</td> </tr> <tr> <td>Erythema</td> <td>None</td> <td>Mid erythema or moderate erythema ($<25\%$)</td> <td>Moderate (25-50%) or Severe erythema ($>50\%$)</td> <td>Severe erythema ($>25\%$)</td> </tr> <tr> <td>Lichenoid</td> <td>None</td> <td>Hyperkeratotic changes ($<25\%$)</td> <td>Hyperkeratotic changes (25-50%)</td> <td>Hyperkeratotic changes ($>50\%$)</td> </tr> <tr> <td>Ulcers</td> <td>None</td> <td>None</td> <td>Ulcers involving (20%)</td> <td>Severe ulcerations ($>20\%$)</td> </tr> <tr> <td>Mucocles*</td> <td>None</td> <td>1-5 mucocles</td> <td>6-10 scattered mucocles</td> <td>Over 10 mucocles</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right;">Mucocles scored for lower labial and soft palate only</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right;">Total score for all mucosal changes</td> </tr> </table>			Mouth	Mucosal change	No evidence of cGVHD			Mild			Moderate			Severe	Erythema	None	Mid erythema or moderate erythema ($<25\%$)	Moderate (25-50%) or Severe erythema ($>50\%$)	Severe erythema ($>25\%$)	Lichenoid	None	Hyperkeratotic changes ($<25\%$)	Hyperkeratotic changes (25-50%)	Hyperkeratotic changes ($>50\%$)	Ulcers	None	None	Ulcers involving (20%)	Severe ulcerations ($>20\%$)	Mucocles*	None	1-5 mucocles	6-10 scattered mucocles	Over 10 mucocles	Mucocles scored for lower labial and soft palate only			Total score for all mucosal changes																																																																																																																																																												
Mouth	Mucosal change	No evidence of cGVHD																																																																																																																																																																																																
		Mild																																																																																																																																																																																																
		Moderate																																																																																																																																																																																																
		Severe																																																																																																																																																																																																
Erythema	None	Mid erythema or moderate erythema ($<25\%$)	Moderate (25-50%) or Severe erythema ($>50\%$)	Severe erythema ($>25\%$)																																																																																																																																																																																														
Lichenoid	None	Hyperkeratotic changes ($<25\%$)	Hyperkeratotic changes (25-50%)	Hyperkeratotic changes ($>50\%$)																																																																																																																																																																																														
Ulcers	None	None	Ulcers involving (20%)	Severe ulcerations ($>20\%$)																																																																																																																																																																																														
Mucocles*	None	1-5 mucocles	6-10 scattered mucocles	Over 10 mucocles																																																																																																																																																																																														
Mucocles scored for lower labial and soft palate only																																																																																																																																																																																																		
Total score for all mucosal changes																																																																																																																																																																																																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Blood Counts</td> <td style="width: 40%;">Plated Count</td> <td style="width: 40%;">KUL</td> <td style="width: 20%;">ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>KUL</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td>Liver Function Tests</td> <td>Total serum bilirubin mg/dl</td> <td>ULN</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ALT</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ULN</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Alkaline Phosphatase</td> <td>ULN</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>ULN</td> <td>UL</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Upper GI</td> <td colspan="4">1= no symptoms 2= mild, occasional symptoms, with little reduction in oral intake during the past week 3= moderate symptoms, with some reduction in oral intake, but able to prevent or correct symptoms with diet or fluids 4= severe or persistent symptoms throughout the day, with marked reduction in oral intake, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Esophageal</td> <td colspan="4">1= no esophageal symptoms 2= intermittent dysphagia orodynophagia with solid food or pills, but not for liquids or soft foods, during the past week 3= intermittent dysphagia orodynophagia for almost all oral intake, or almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Gastrointestinal-Lower GI</td> <td colspan="4">1= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 2= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 3= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td>Lungs</td> <td colspan="4">1= no symptoms 2= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 3= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 4= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week</td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Health Care Provider Global Rating:</td> <td style="width: 90%;">Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5= moderate to severe 6= severe 7= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Most severe cGVHD symptoms Possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Over the past month would you say that this patient's cGVHD is</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>% Predicted</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td colspan="4"> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Functional Performance (in persons 4-10 years old)</td> <td style="width: 40%;">Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes</td> <td style="width: 40%;">Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi</td> <td style="width: 20%;">Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>○ Physical Therapy Report Attached</td> </tr> <tr> <td>Score</td> <td>Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)</td> <td></td> <td>Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>1= able, normal</td> <td></td> <td>1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>2= minor restriction in physical activities</td> <td></td> <td>Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>3= able, but more easily</td> <td></td> <td>Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>4= both greater restriction of and less time spent in play/activity</td> <td></td> <td>Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities</td> <td></td> <td>Requires considerable assistance and frequent medical care</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities</td> <td></td> <td>Desires hospitalization, but can care for self</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>7= Mostly in bed, participates in quiet activities</td> <td></td> <td>Desires special care and assistance</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>8= In bed; needs assistance even for quiet play</td> <td></td> <td>Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>9= Needs assistance to get out of bed</td> <td></td> <td>Needs constant assistance, active supportive measures necessary</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10= Unconscious</td> <td></td> <td>Dead</td> </tr> </table> </td> </tr> </table>			Blood Counts	Plated Count	KUL	ULN			KUL	ULN	Liver Function Tests	Total serum bilirubin mg/dl	ULN	ULN			ALT	ULN			ULN	ULN			Alkaline Phosphatase	ULN			ULN	UL	Gastrointestinal-Upper GI	1= no symptoms 2= mild, occasional symptoms, with little reduction in oral intake during the past week 3= moderate symptoms, with some reduction in oral intake, but able to prevent or correct symptoms with diet or fluids 4= severe or persistent symptoms throughout the day, with marked reduction in oral intake, on almost every day of the past week				Gastrointestinal-Esophageal	1= no esophageal symptoms 2= intermittent dysphagia orodynophagia with solid food or pills, but not for liquids or soft foods, during the past week 3= intermittent dysphagia orodynophagia for almost all oral intake, or almost every day of the past week				Gastrointestinal-Lower GI	1= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 2= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 3= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week				Lungs	1= no symptoms 2= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 3= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 4= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Health Care Provider Global Rating:</td> <td style="width: 90%;">Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5= moderate to severe 6= severe 7= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Most severe cGVHD symptoms Possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Over the past month would you say that this patient's cGVHD is</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>% Predicted</td> </tr> </table>				Health Care Provider Global Rating:	Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?		1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe		5= moderate to severe 6= severe 7= very severe		8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible		Most severe cGVHD symptoms Possible		Over the past month would you say that this patient's cGVHD is		1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe		% Predicted	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Functional Performance (in persons 4-10 years old)</td> <td style="width: 40%;">Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes</td> <td style="width: 40%;">Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi</td> <td style="width: 20%;">Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>○ Physical Therapy Report Attached</td> </tr> <tr> <td>Score</td> <td>Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)</td> <td></td> <td>Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>1= able, normal</td> <td></td> <td>1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>2= minor restriction in physical activities</td> <td></td> <td>Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>3= able, but more easily</td> <td></td> <td>Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>4= both greater restriction of and less time spent in play/activity</td> <td></td> <td>Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities</td> <td></td> <td>Requires considerable assistance and frequent medical care</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities</td> <td></td> <td>Desires hospitalization, but can care for self</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>7= Mostly in bed, participates in quiet activities</td> <td></td> <td>Desires special care and assistance</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>8= In bed; needs assistance even for quiet play</td> <td></td> <td>Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>9= Needs assistance to get out of bed</td> <td></td> <td>Needs constant assistance, active supportive measures necessary</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10= Unconscious</td> <td></td> <td>Dead</td> </tr> </table>				Functional Performance (in persons 4-10 years old)	Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes	Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi	Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support				○ Physical Therapy Report Attached	Score	Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)		Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)	100	1= able, normal		1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease	90	2= minor restriction in physical activities		Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease	80	3= able, but more easily		Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work	70	4= both greater restriction of and less time spent in play/activity		Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs	60	5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities		Requires considerable assistance and frequent medical care	50	6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities		Desires hospitalization, but can care for self	40	7= Mostly in bed, participates in quiet activities		Desires special care and assistance	30	8= In bed; needs assistance even for quiet play		Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent	20	9= Needs assistance to get out of bed		Needs constant assistance, active supportive measures necessary	10	10= Unconscious		Dead																																																																				
Blood Counts	Plated Count	KUL	ULN																																																																																																																																																																																															
		KUL	ULN																																																																																																																																																																																															
Liver Function Tests	Total serum bilirubin mg/dl	ULN	ULN																																																																																																																																																																																															
		ALT	ULN																																																																																																																																																																																															
		ULN	ULN																																																																																																																																																																																															
		Alkaline Phosphatase	ULN																																																																																																																																																																																															
		ULN	UL																																																																																																																																																																																															
Gastrointestinal-Upper GI	1= no symptoms 2= mild, occasional symptoms, with little reduction in oral intake during the past week 3= moderate symptoms, with some reduction in oral intake, but able to prevent or correct symptoms with diet or fluids 4= severe or persistent symptoms throughout the day, with marked reduction in oral intake, on almost every day of the past week																																																																																																																																																																																																	
Gastrointestinal-Esophageal	1= no esophageal symptoms 2= intermittent dysphagia orodynophagia with solid food or pills, but not for liquids or soft foods, during the past week 3= intermittent dysphagia orodynophagia for almost all oral intake, or almost every day of the past week																																																																																																																																																																																																	
Gastrointestinal-Lower GI	1= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 2= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 3= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week																																																																																																																																																																																																	
Lungs	1= no symptoms 2= occasional loose or liquid stools on some days during the past week 3= intermediate loose or liquid stools throughout the day, on almost every day of the past week, without requiring intervention to prevent or correct volume depletion 4= diarrhoea throughout the day, on almost every day of the past week																																																																																																																																																																																																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Health Care Provider Global Rating:</td> <td style="width: 90%;">Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5= moderate to severe 6= severe 7= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Most severe cGVHD symptoms Possible</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Over the past month would you say that this patient's cGVHD is</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>% Predicted</td> </tr> </table>				Health Care Provider Global Rating:	Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?		1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe		5= moderate to severe 6= severe 7= very severe		8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible		Most severe cGVHD symptoms Possible		Over the past month would you say that this patient's cGVHD is		1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe		% Predicted																																																																																																																																																																															
Health Care Provider Global Rating:	Where would you rate the severity of this patient's chronic GVHD symptoms that are not at severe and is the most severe cGVHD symptom not at all severe?																																																																																																																																																																																																	
	1= not severe 2= mild 3= moderate 4= severe																																																																																																																																																																																																	
	5= moderate to severe 6= severe 7= very severe																																																																																																																																																																																																	
	8= very severe 9= extremely severe 10= worst possible																																																																																																																																																																																																	
	Most severe cGVHD symptoms Possible																																																																																																																																																																																																	
	Over the past month would you say that this patient's cGVHD is																																																																																																																																																																																																	
	1= not at all severe 2= mild 3= moderate 4= severe 5= very severe																																																																																																																																																																																																	
	% Predicted																																																																																																																																																																																																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">Functional Performance (in persons 4-10 years old)</td> <td style="width: 40%;">Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes</td> <td style="width: 40%;">Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi</td> <td style="width: 20%;">Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td>○ Physical Therapy Report Attached</td> </tr> <tr> <td>Score</td> <td>Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)</td> <td></td> <td>Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>1= able, normal</td> <td></td> <td>1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>90</td> <td>2= minor restriction in physical activities</td> <td></td> <td>Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease</td> </tr> <tr> <td>80</td> <td>3= able, but more easily</td> <td></td> <td>Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work</td> </tr> <tr> <td>70</td> <td>4= both greater restriction of and less time spent in play/activity</td> <td></td> <td>Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities</td> <td></td> <td>Requires considerable assistance and frequent medical care</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities</td> <td></td> <td>Desires hospitalization, but can care for self</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>7= Mostly in bed, participates in quiet activities</td> <td></td> <td>Desires special care and assistance</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>8= In bed; needs assistance even for quiet play</td> <td></td> <td>Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>9= Needs assistance to get out of bed</td> <td></td> <td>Needs constant assistance, active supportive measures necessary</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>10= Unconscious</td> <td></td> <td>Dead</td> </tr> </table>				Functional Performance (in persons 4-10 years old)	Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes	Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi	Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support				○ Physical Therapy Report Attached	Score	Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)		Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)	100	1= able, normal		1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease	90	2= minor restriction in physical activities		Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease	80	3= able, but more easily		Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work	70	4= both greater restriction of and less time spent in play/activity		Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs	60	5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities		Requires considerable assistance and frequent medical care	50	6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities		Desires hospitalization, but can care for self	40	7= Mostly in bed, participates in quiet activities		Desires special care and assistance	30	8= In bed; needs assistance even for quiet play		Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent	20	9= Needs assistance to get out of bed		Needs constant assistance, active supportive measures necessary	10	10= Unconscious		Dead																																																																																																																																											
Functional Performance (in persons 4-10 years old)	Total Distance Walked in 2 Minutes: Number of laps ($< 50\text{ feet}$) + final partial lap feet = walk in 2 minutes	Grip Strength (Dominant Hand): Trial #1 Trial #2 Trial #3 Psi Psi Psi	Range of Motion: 1= not performed 2= with assistance 3= with help 4= with support 5= with assistance 6= with support 7= with assistance 8= with support 9= with assistance 10= with support																																																																																																																																																																																															
			○ Physical Therapy Report Attached																																																																																																																																																																																															
Score	Lansky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4-10 years old)		Karnofsky Performance Status Scale Definitions (circle from 0-100) (persons 4 years or older)																																																																																																																																																																																															
100	1= able, normal		1= able to carry on normal activity, minor signs or symptoms of disease																																																																																																																																																																																															
90	2= minor restriction in physical activities		Normal activity with effort, some signs or symptoms of disease																																																																																																																																																																																															
80	3= able, but more easily		Causes for mild, unable to carry on normal activity or to do active work																																																																																																																																																																																															
70	4= both greater restriction of and less time spent in play/activity		Requires occasional assistance but is able to care for most personal needs																																																																																																																																																																																															
60	5= Up and about, but more active play; keeps busy with quiet activities		Requires considerable assistance and frequent medical care																																																																																																																																																																																															
50	6= Gets dressed but less around much of the day, no active play but able to participate in all quiet play and activities		Desires hospitalization, but can care for self																																																																																																																																																																																															
40	7= Mostly in bed, participates in quiet activities		Desires special care and assistance																																																																																																																																																																																															
30	8= In bed; needs assistance even for quiet play		Generally disabled; hospital admissions are indicated although death not imminent																																																																																																																																																																																															
20	9= Needs assistance to get out of bed		Needs constant assistance, active supportive measures necessary																																																																																																																																																																																															
10	10= Unconscious		Dead																																																																																																																																																																																															

Nakon pregleda pacijent se upućuje medicinskoj sestri koja organizira i koordinira laboratorijsku obradu (hematološke, biokemijske, endokrinološke, koagulacijske, mikrobiološke analize), radiološku obradu, te spirometriju. Zatim se pacijenti upućuju na subspecijalističke preglede. Svakog bolesnika ili bolesnicu temeljito evaluira dermatolog, stomatolog,

oftalmolog, neurolog, fizijatar, nutricionist, ginekolog (ženske bolesnice), a ovisno o kliničkoj indikaciji i endokrinolog, pulmolog, infektolog, gastroenterolog. Svaki subspecijalist ispunjava određene formulare vezane uz evaluaciju pojedinog organa. Ukoliko je potrebno uzimaju se brisevi i biopsije zahvaćenog organa. Nadalje bolesnik ispunjava upitnike o kvaliteti života (SF 36, EORTC QLQ-C30, Lee skala) i formular B o simptomima i aktivnosti bolesti (Slika 4.).

Slika 4.

Today's Date: _____		MR#/Name: _____																				
CHRONIC GVHD ACTIVITY ASSESSMENT-PATIENT SELF REPORT																						
Symptoms		Not Present										As Bad As You Can Imagine										
Please rate how severe the following symptoms have been in the last seven days. Where 0 is not at all severe and 10 is symptom has not been present) to 10 (the symptom was as bad as you can imagine it could be) for each item.		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
Your skin itching at its WORST?		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>										
Your mouth dryness at its WORST?		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>										
Your mouth pain at its WORST?		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>										
Your mouth sensitivity at its WORST?		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>										
Eyes		What is your main complaint with regard to your eyes?																				
		Please rate how severe is this eye symptom, between 0 (not at all severe) and 10 (most severe):										0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vulvovaginal Symptom (females only)		Do you have any burning, pain or discomfort in the area of your vagina, vulva or labia? OR Do you have any discomfort or pain with sexual intercourse?										<input type="radio"/>	Yes	<input type="radio"/>	No	<input type="radio"/>	Not applicable					
Patient Global Ratings:																						
1. Overall, do you think that your chronic graft versus host disease is mild, moderate or severe?																						
1=mild	2=moderate	3=severe																				
2. Please circle the number indicating how severe your chronic graft versus host disease symptoms are, where 0 is cGvHD symptoms that are not at all severe and 10 is the most severe chronic GvHD symptoms possible.																						
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Most severe cGvHD symptoms Possible											
cGvHD symptoms not at all severe																						
3. Compared to a month ago, overall would you say that your cGvHD symptoms are:																						
+3=Very much better	+2=Moderately better	+1=Slightly better																				
-0>About the same	-1=A little worse	-2=Moderately worse	-3=Very much worse																			
Attach copies of:																						
Adults (persons 18 years or older):																						
-Lee cGvHD Symptom Scale																						
-Human Activity Profile																						
-SF36																						
-FACT-BMT																						
Children/Adolescents (persons 17 years or younger):																						
-Lee cGvHD Symptom Scale (persons 8-12 years old may complete with help of the health care professional)																						
-ASK-p38 Activities Scale for Kids																						
-VARNI-General and Disease Specific Inventory																						

Multidisciplinarni tim se sastaje jednom svaka dva tjedna, kada se svaki bolesnik detaljno prezentira i raspravi iz aspekta pojedinog subspecijalista, odredi težina bolesti temeljem NIH skale i ostalih mjerena, te se donose odluka o dalnjem liječenju (lokalno, sustavno, rehabilitacija, mijenjanje terapije, smanjenje ili pojačanje postojeće imunosprezervativne terapije.). Koristeći detaljni multidisciplinarni pristup cGVHD-u do sada je sustavno analizirano 27 bolesnika s cGVHD-om. 4 bolesnika nisu imala dijagnostičke kriterije za postavljanje dijagnoze. Najčešće zahvaćeni organi bili su koža, zglobovi/fascija, oči i pluća, a većina bolesnika imala je težak oblik bolesti (NIH skor 3).

U zaključku, multidisciplinarni tim za cGVHD KBC Zagreb osigurava standariziran i detaljni pristup bolesnicima s cGVHD-om. Ovakav pristup omogućuje znatan napredak u liječenju ove populacije bolesnika nakon aloTKMS i unaprjeđenje njihove kvalitete života.

Također, u svrhu unaprijeđenja skrbi za ovu populaciju bolesnika, 15. studenog 2013. godine održan je simpozij o kroničnoj reakciji transplantata protiv primatelja i kasnim komplikacijama nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica u Preporodnoj dvorani palače Narodnog doma u Zagrebu u organizaciji Zavoda za hematologiju KBC-a Zagreb, Nacionalnog instituta za rak iz Sjedinjenih Američkih Država i Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM. Predavači su bili ugledni stručnjaci iz Europske grupe za transplantaciju krvi i koštane srži (EBMT), Njemačko-austrijsko-švicarskog konzorcija za cGVHD i Nacionalnog instituta za rak iz SAD-a te članovi multidisciplinarnog tima hrvatskih stručnjaka.

Symposium Program

Symposium Program

- 09.00 - 09.45 Opening of the Symposium
09.45 - 10.10 Darija Nemet: Thirty years of stem cell transplantation program at the University Hospital Center Zagreb: the need for more care for survivors
10.10 - 10.40 Steven Z. Pavletic: Chronic GVHD project – collaboration of the National Cancer Institute USA and Division of Hematology Hospital Center Zagreb, Croatia

10.40 - 11.00 Coffee break.

Part I: Chronic GVHD: Scope of the problem

Chairs: Steven Z. Pavletic, Damir Nemet

- 11.00 - 11.25 Rafael Duarte-Palomino (Barcelona): Chronic GvHD in Europe and EBMT projects
 11.25 - 11.50 Hildegard Greinix (Vienna): Diagnosis, histopathology and staging of chronic GvHD
 11.50 - 12.15 Daniel Wolff (Regensburg): German-Austrian Swiss Consortium, first and second line therapy
 12.15 - 12.40 Barbara Koenig (Vienna): Pediatric aspects of chronic GvHD and chronic GvHD prevention
 12.40 - 13.05 Grzegorz Basow (Warszawa): Ancillary and supportive multidisciplinary care and standards for long term follow-up
 13.05 - 13.30 Steven Z. Pavlicek (Bethesda): Evaluation of therapeutic response in clinical trials of new therapies for chronic GvHD

13.30 - 14.30 Lunch

Part II: Chronic GvHD: Multidisciplinary consultative clinic and research program at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

University Hospital Center Zagreb

- Chair:* Hildegarde Greinix, Radovan Vrhovac

14.30 - 14.45 Radovan Vrhovac: Allogeneic stem cell transplant program at the University Hospital Center Zagreb
14.45 - 15.00 Ranka Serten Seiwert: Coping with chronic GvHD: current status of care for long term survivors
15.00 - 15.15 Ljubica Rajić: Late effects following allogeneic SCT in children
15.15 - 15.30 Lana Grković: Optimization of chronic GvHD program and clinical activity of the multidisciplinary team
15.30 - 15.45 Dragoljub Matić: The role of the nurse in the multidisciplinary care of patients with cGvHD
16.00 - 16.15 Radovan Češek: Chronic GvHD of the skin
16.15 - 16.30 Magdalena Marjan-Stipetić: Chronic GvHD of the oral cavity
16.30 - 16.45 Davorka Dušek: Evaluation and management of infectious complications in cGvHD

16.30 - 16.50 Coffee break

16.50 - 17.05 Tatjana Klepac Pulančić: Gynecological problems in chronic GvHD
17.05 - 17.20 Eryna Brinza: Neurological complications and pain in chronic GvHD
17.20 - 17.35 Drago Batić: Immunological disturbances in chronic GvHD
17.35 - 17.50 Dražen Pulančić: Hemostasis and inflammation in chronic GvHD
17.50 - 18.05 Irena Bojanjić: Extracorporeal photopheresis in the treatment of chronic GvHD
18.05 - 18.20 Dina Ljubas / Željko Krznarić: Nutrition problems and support of patients with chronic GvHD
18.20 - 18.35 Zinajda Perić: Quality of life in patients with chronic GvHD
18.35 - 19.00 Concluding remarks and discussion

20.30 - 23.30 Dinner for all participants

LITERATURA:

1. Martin PJ, Counts GW, Jr., Appelbaum FR, et al. Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2010;28:1011-1016.
 2. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002;100:406-414.
 3. Lee SJ, Vogelsang G, Flowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:215-233.
 4. Martin PJ. Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach. *Keio J Med* 2008;57:177-183.
 5. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-956.
 6. Martin PJ, Storer BE, Carpenter PA, et al. Comparison of short-term response and long-term outcomes after initial systemic treatment of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:124-132.
 7. Mitchell, G.K., Tieman, J.J. & Shelby-James, T.M. (2008). Multidisciplinary care planning and teamwork in primary care. *MJA*, 188(8), p.S63.

Mobilizacija i sakupljanje matičnih stanica za transplantaciju uz primjenu pleriksafora

Prof. dr. sc. Damir Nemet, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti,
Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: dnemet@mef.hr

Uvod

Transplantacija autolognih matičnih krvotvornih stanica (ATMS) nakon primjene visokodozne kemoterapije standardan je pristup liječenju ne-Hodgkinovih limfoma (NHL), Hodgkinove bolesti (HB) i multiplog mijeloma (MM) (1-7).

Glavni izvor matičnih stanica za autotransplantaciju je periferna krv nakon postupka mobilizacije matičnih stanica iz koštane srži. Uspjeh liječenja transplantacijom ovisi o mogućnosti sakupljanja dovoljnog broja matičnih stanica iz periferne krvi koje će osigurati brz i pouzdan hematološki oporavak. Standardan pristup mobilizaciji matičnih stanica u perifernu krv je primjena granulocitnog činitelja rasta (G-CSF) samog ili u kombinaciji s kemoterapijom (8,9). U oko 10-30% bolesnika nije moguće sakupiti niti minimalan broj matičnih stanica, koji iznosi $\geq 2 \times 10^6$ CD34+ stanica/kg t.t. bolesnika (10-16).

Bolesnici u kojih se ne sakupi dovoljno matičnih stanica za transplantaciju ne mogu se liječiti potencijalno kurativnom metodom liječenja ili je kod njih potrebno jednom ili više puta ponoviti postupak mobilizacije matičnih stanica što utječe na kvalitetu života bolesnika, izlaže ih dodatnom riziku liječenja, a značajno povećava troškove liječenja.(17).

Pleriksafor (AMD3100, Mozobil®) je prvi od nove klase malih molekula koja reverzibilno inhibira vezanje čimbenika 1α porijeklom iz stanica strome (eng. chemokine stromal cell-derived faktor-1α, SDF-1α) za njegov receptor CXCR4 (CXCR4) te time slabi vezu matičnih stanica sa stromom i potiče njihovo otpuštanje u cirkulaciju (18,19). Pleriksafor je stoga indiciran u kombinaciji s G-CSF-om za poticanje mobilizacije matičnih stanica u perifernu krv kod bolesnika s limfomima i MM koji slabo mobiliziraju matične stanice standardnim postupkom. Preporučena doza pleriksafora je 0,24 mg/kg t.t. dnevno. Lijek se primjenjuje s.c., 6–11 sati prije početka afereze, a nakon što je tijekom 4 dana primijenjen G-CSF 10 µg/kg dnevno.

Pleriksafor primijenjen sam ili u kombinaciji s G-CSF u ispitivanjima faze I i II signifikantno povećava broj matičnih CD34+ stanica u perifernoj krvi i mogućnost sakupljanja tih stanica za transplantaciju (20,21). U fazama II i III kliničkih ispitivanja kod bolesnika s NHL i MM pleriksafor je bio dobro podnošljiv i značajno je povećao mogućnost sakupljanja adekvatnog broja matičnih stanica ($\geq 5 \times 10^6$ CD34+ stanica/kg) za transplantaciju s manjim brojem postupaka afereze (21,22,23). U fazama III ispitivanja kombinacijom pleriksafora i G-CSF-a vjerovatnost da će se sakupiti dovoljan broj matičnih stanica je 2-3 puta veća nego samo s G-CSF-om. Pleriksafor omogućava da veći broj bolesnika bude liječen transplantacijom. Kod bolesnika s NHL 90% bolesnika liječenih pleriksaforom nastavlja liječenje transplantacijom u usporedbi s 55% onih koji su primali samo G-CSF. Kod bolesnika s MM 95,9% liječenih pleriksaforom nastavlja liječenje transplantacijom u usporedbi s 88,3% onih koji su primali samo G-CSF. Transplantacija stanica mobiliziranih pleriksaforom rezultira brzom i trajnom rekonstitucijom hematopoetskog sustava. Pleriksafor se općenito dobro podnosi, nije bilo značajne razlike u nuspojavama u grupi liječenoj pleriksaforom+G-CSF-om u odnosu na skupinu liječenu placebo+G-CSF-om (22,23).

U Hrvatskoj se godišnje u oko 140 bolesnika s limfomima i MM-om planira liječenje ATMS i povrgavaju se postupku mobilizacije matičnih stanica standardnim postupkom, kombinacijom kemoterapije i G-CSF-a (filgrastim). Procjenjuje se da oko 19 bolesnika (14%) neće adekvatno mobilizirati matične stanice i ovi bolesnici su kandidati za primjenu pleriksafora.

Primjena pleriksafora (Mozobil®) u bolesnika u kojih se nakon primjene standardnog postupka mobilizacije ne postigne adekvatan porast matičnih CD34+ stanica u perifernoj krvi omogućava primjenu terapijske metode kojom se mogu izlijеčiti, a izbjegavaju se nepovoljni učinci i povećani troškovi ponovljenog standardnog postupka koji je ionako u većine bolesnika neuspješan.

Pristup kojim se pleriksafor primjenjuje samo u slučaju očitog neuspjeha standardnog postupka mobilizacije, kao spašavajući (eng. „salvage“) lijek stoga je medicinski i ekonomski prihvatljiv.

Sažetak znanstvenih dokaza koji dokazuju prednosti primjene pleriksafora u bolesnika koji slabo mobiliziraju krvotvorne matične stanice

Postojeći postupak mobilizacije matičnih stanica u perifernu krv uključuje primjenu G-CSF-a samog ili u kombinaciji s kemoterapijom.

Prednosti primjene pleriksafora u odnosu na postojeći postupak dokazane su u više istraživanja faze II (21), ispitivanju njegove djelotvornosti u bolesnika koji ne mobiliziraju uz standardni postupak (eng. „compassionate use“) (25) te u dva randomizirana, dvostruko slijepa, placebom kontrolirana klinička istraživanja faze III (22,23).

U tim istraživanjima je utvrđeno:

- Pleriksafor povećava mobilizaciju matičnih CD34+ stanica
 - u fazama III ispitivanja kombinacijom pleriksafora i G-CSF-a vjerojatnost da će se sakupiti dovoljan broj matičnih stanica je 2-3 puta veća nego s G-CSF-om+ placebo
 - ciljni broj matičnih stanica dostiže se s manjim brojem postupaka afereze kombinacijom pleriksafora i G-CSF
 - kod bolesnika s NHL 59,3% bolesnika u pleriksafor+G-CSF skupini doseglo je ciljnu količinu od $\geq 5 \times 10^6$ CD34+ stanica s manje od 4 afereze u usporedbi sa samo 19,6% bolesnika u placebo+G-CSF skupini (22)
 - kod bolesnika s MM 71,6% bolesnika u pleriksafor+G-CSF skupini doseglo je ciljnu količinu od $\geq 6 \times 10^6$ CD34+ stanica s manje od 2 afereze u usporedbi sa samo 34,4% bolesnika u placebo+G-CSF skupini (23)
- Primjena pleriksafora omogućava predvidivost vremena i količine sakupljanja matičnih stanica
 - primjena pleriksafora+G-CSF-a povećava broj cirkulirajućih matičnih stanica za otprilike 5 puta u protokolom predviđenom vremenu
- Primjena pleriksafora smanjuje broj potrebnih postupaka afereze
 - u bolesnika s MM koji su primali placebo+G-CSF bilo je potrebno 4 dana (4 postupka afereze) za prikupljanje ciljnog croja od $\geq 6 \times 10^6$ CD34+ stanica, dok je u pleriksafor+G-CSF skupini za to trebao 1 dan (1 afereza)
 - u bolesnika s NHL koji su primali placebo+G-CSF manje od 50% bolesnika doseglo je ciljni broj od $\geq 5 \times 10^6$ CD34+ stanica u 4 dana, dok je u pleriksafor+G-CSF skupini ovaj ciljni broj stanica sakupljen za medijan od 3 dana.
- Pleriksafor omogućava da veći broj bolesnika

sakupi dovoljan broj matičnih stanica i bude liječen transplantacijom u usporedbi s G-CSF-om

- 90% bolesnika s NHL liječenih pleriksaforom nastavlja liječenje transplantacijom u usporedbi s 55% onih koji su primali samo G-CSF
- 95,9% bolesnika s MM liječenih pleriksaforom nastavlja liječenje transplantacijom u usporedbi s 88,3% onih koji su primali samo G-CSF

- Transplantacija stanica mobiliziranih pleriksaforom rezultira brzom i trajnom rekonstitucijom hematopoetskog sustava
 - medijan vremena do oporavka broja neutrofila jednak je nakon mobilizacije pleriksaforom kao i nakon mobilizacije samim G-CSF-om (10 dana u bolesnika s NHL i 11 dana u bolesnika s MM)
 - medijan vremena do oporavka broja trombocita jednak je nakon mobilizacije pleriksaforom kao i nakon mobilizacije samim G-CSF-om (20 dana u bolesnika s NHL i 18 dana u bolesnika s MM)
- Pleriksafor se općenito dobro podnosi
 - nije bilo značajne razlike u nuspojavama u grupi liječenoj pleriksaforom+G-CSF-om u odnosu na skupinu liječenu placebo+G-CSF-om
 - najčešće nuspojave bile su: gastrointestinalni poremećaji kao mučnina i proljev, eritem na mjestu injekcije, omaglica, nesanica, glavobolja, bolovi u mišićima i kostima.

Terapijske preporuke za mobilizaciju i sakupljanje matičnih stanica za transplantaciju i primjenu pleriksafora

Međunarodna radna skupina za mijelom (International myeloma working group, IMWG) objavila je stavove i smjernice o sakupljanju matičnih stanica za autotransplantaciju te ulozi i primjeni pleriksafora (9). Radna skupina navodi:

Pleriksafor u kombinaciji s G-CSF-om povećava mobilizaciju CD34+ stanica te je djelotvoran u mobilizaciji i sakupljanju adekvatnog broja matičnih stanica u bolesnika u kojih tradicionalne metode mobilizacije nisu uspjele. Pleriksafor smanjuje broj postupaka afereze potrebnih da se prikupi ciljna doza CD34+ matičnih stanica. Primjena pleriksafora kao agensa za mobilizaciju matičnih stanica je sigurna i predvidiva. Potrebna su daljnja istraživanja koja trebaju uključiti i farmakoekonomiku te smanjenje korištenja resursa primjenom pleriksafora.

Prednosti pleriksafora koje su navedene u preporukama IMWG prikazane su u Tablici 1.(9)

Tablica 1. Potencijalne prednosti pleriksafora (9).

Povećava predvidivost sakupljanja matičnih stanica
<ul style="list-style-type: none"> Dodatak pleriksafora povećava broj cirkulirajućih matičnih CD34+ stanica u perifernoj krvi za 4,8 puta (medijan) te time omogućava bolesnicima i liječnicima da preciznije predvide i planiraju postupak afereze U bolesnika s multiplim mijelomom koji primaju pleriksafor prikupi se tri puta više stanica prvog dana sakupljanja nego samim G-CSF-om (medijan 6,86 milijuna stanica versus 2,29 milijuna)
Smanjuje troškove transplantacije
<ul style="list-style-type: none"> Upotreba manje resursa, prvenstveno manje postupaka afereze U studiji faze III u bolesnika koji su primali pleriksafor trebalo je 3 dana manje (medijan) nego pri primjeni samog G-CSF-a da se sakupi ≥ 6 milijuna matičnih CD34+ stanica
Omogućava prikupljanje više stanica
<ul style="list-style-type: none"> Mogućnost šire primjene visokodozne terapije i transplantacije autolognih matičnih stanica kao spašavajuće terapije za bolesnike koji nisu izliječeni konvencionalnom kemo/radioterapijom Mogućnost liječenja transplantacijom autolognih matičnih stanica i bolesnika koji ne mobiliziraju matične stanice samo primjenom G-CSF-a zbog prethodnog ekstenzivnog liječenje kamoterapijom i zračenjem Mogućnost sakupljanja stanica i u bolesnika koji su prethodno liječeni visokodoznom terapijom Mogućnost liječenja višestrukog, opetovanom transplantacijom autolognih matičnih stanica Mogućnost poboljšanja rezultata i ishoda liječenja transplantacijom primjenom megadoza matičnih CD34+ stanica (tj. >10 milijuna CD34+ stanica/kg)

Pleriksafor je odobren u SAD-u od prosinca 2008. u kombinaciji s G-CSF-om za mobilizaciju matičnih stanica u perifernu krv u bolesnika s NHL-om i MM-om. U Europi je pleriksafor odobren od kovoza 2009. za mobilizaciju matičnih stanica u bolesnika s limfomima i MM u kojih se nije uspjelo konvencionalnim načinom mobilizacije sakupiti dovoljan broj matičnih stanica za transplantaciju.

Preporuke za mobilizaciju matičnih stanica primjenom pleriksafora

Preporuke se temelje na dosadašnjim saznanjima iz kliničkih istraživanja faze I, II i III te na temelju ograničenih vlastitih iskustava iz tzv. samosne primjene pleriksafora.

Indikacija: Pleriksafor je indiciran za mobilizaciju matičnih stanica u bolesnika s limfomima i MM u kojih se nije uspjelo konvencionalnim načinom mobilizacije sakupiti dovoljan broj matičnih stanica za transplantaciju.

Protokol primjene:

Primjenu pleriksafora treba propisati za odobrenu indikaciju specijalist internist hematolog iz odje-

la za transplantaciju matičnih krvotvornih stanica. Liječenje pleriksaforom mora započeti te nadgledati liječnik s iskustvom u području hematologije i/ili onkologije. Postupci mobilizacije i afereze moraju se provoditi u suradnji s hematološko-onkološkim centrom s odgovarajućim iskustvom u tom području, i u kojem je moguće provesti primjereno praćenje broja krvotvornih matičnih stanica.

- Mobilizacija matičnih stanica pleriksaforom može se provesti na dva načina:
 - kao neposredna („spašavajuća“) primjena u prvom pokušaju mobilizacije nakon što je iz količine matičnih stanica u perifernoj krvi vidljivo da mobilizacija standardnim postupkom neće uspjeti tj. da je broj CD34+ stanica manji od $10/\mu\text{l}$ unatoč adekvatnom porastu broja leukocita
 - kao odgođena ponovna mobilizacija (re-mobilizacija) što podrazumjeva ponovljeni postupak nakon određenog vremena proteklog od prve mobilizacije (npr. četiri tjedna) s ponovnom primjenom G-CSF, sada u kombinaciji s pleriksaforom

Doziranje i način primjene (24)

Doziranje. Preporučena doza pleriksafora je $0,24 \text{ mg/kg t.t. dnevno}$. Lijek se primjenjuje s.c. 6–11 sati prije početka afereze, a nakon što je tijekom 4 dana primijenjen G-CSF $10 \mu\text{g/kg dnevno}$. Bez obzira na potrebu povećanja doze s porastom tjelesne težine, ukupna doza pleriksafora ne bi smjela prelaziti 40 mg dnevno .

Posebne skupine. *Bolesnici s oštećenjem bubreža.* Bolesnicima čiji je klirens kreatinina $20 – 50 \text{ ml/min}$ potrebno je smanjiti dozu pleriksafora za jednu trećinu, na $0,16 \text{ mg/kg dnevno}$. Ne postoji dovoljno podataka za preporuke doziranja kod bolesnika s klirensom kreatinina $< 20 \text{ ml/min}$, niti za doziranje kod bolesnika na dijalizi. Ukupna doza pleriksafora ne bi smjela biti veća od 27 mg dnevno ako je klirens kreatinina niži do 50 ml/min . Iskustvo primjene kod *pedijatrijskih bolesnika* je ograničeno. U *starijih bolesnika (stariji od 65 godina)* s normalnom bubrežnom funkcijom nije potrebna prilagodba doze.

Hrvatske preporuke preferiraju postupak neposredne primjene pleriksafora u prvom pokušaju mobilizacije nakon što je iz količine matičnih stanica u perifernoj krvi vidljivo da mobilizacija standardnim postupkom nije uspjela tj. da je broj CD34+ stanica manji od $10/\mu\text{l}$ unatoč adekvatnom porastu broja leukocita. Razlog je praktički jednaka uspešnost

sakupljanja i značajno manji trošak postupka zbog manje primjene G-CSF-a i vjerojatnog manjeg broja procedura afereze te izbjegavanja ponavljanja postupka tj. ponovne hospitalizacije, rizika povezanih s postupkom mobilizacije i drugo.

LITERATURA

1. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A i sur. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995;333:1540-1545.
2. Shipp MA, Abeloff MD, Antman KH i sur. International Consensus Conference on high-dose therapy with hematopoietic stem-cell transplantation in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: Report of the jury. *J Clin Oncol* 1999;17:423-429.
3. Shmiltz N, Pfistner B, Sextro M i sur. Aggressive conventional therapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: A randomised trial. *Lancet* 2002;359:2065-2071.
4. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K i sur. EBMT activity survey and changes in disease indication over the past 15 years. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:1069-1085.
5. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM i sur. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 1996;335:91-97.
6. Child JA, Morgan GJ, Davies FE i sur. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:1875-1883.
7. Fermand J-P, Katsahian S, Divine M i sur. High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55-65 years: long term results of randomized controlled trial from the Group Myelome-Autogreffe. *J Clin Oncol* 2005;23:9927-9933.
8. Bensinger W, DiPersio JF, McCarty JM. Improving stem cell mobilization strategies: future directions. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:181-195.
9. Giralt S, Stadtmauer EA, Harousseau JL i sur. on behalf of the IMWG. International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD3100). *Leukemia* 2009; :1-9.
10. Gordan LN, Sugrue MW, Lynch JW i sur. Poor mobilization of peripheral blood stem cells is a risk factor for worse outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2003;44:815-820.
11. Olivieri A, Brunori M, Capelli D i sur. Salvage therapy with an outpatient DHAP schedule followed by PBSC transplantation in 79 lymphoma patients: An intention to mobilize and transplant analysis. *Eur J Haematol* 2004;72:10-17.
12. Kuittinen T, Nousiainen T, Halonen P i sur. Prediction of mobilization failure in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:907-912.
13. Akhtar S, Weshi AE, Rahal M i sur. Factor affecting autologous peripheral blood stem cell collection in patients with relapsed and refractory diffuse large cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma: A single institution result in 168 patients. *Leuk Lymphoma* 2008;49:769-778.
14. Demirer T, Buckner C, Goolley T i sur. Factor influencing collection of peripheral blood stem cells in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:937-941.
15. Desikan KR, Barlogie B, Jagannath S i sur. Comparable engraftment kinetics following peripheral blood stem-cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor with or without cyclophosphamide in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 1998;16:1547-1553.
16. Perea G, Sureda A, Martino R i sur. Predictive factors for successful mobilization of peripheral blood CD34+ cells in multiple myeloma. *Ann Hematol* 2001;80:592-597.
17. Boeve S, Struneck J, Creech S, Stiff PJ. Analysis of remobilization success in patients undergoing autologous stem cell transplants who fail an initial mobilization: risk factors, cytokine use and cost. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:997-1003.
18. Broxmeyer HE, Orchell CM, Clapp DW i sur. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med* 2005;201:1307-1318.
19. Rosenkilde MM, Gerlach LO, Hatse S i sur. Molecular mechanism of action of monocyclam versus bicyclam non-peptide antagonists in the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem* 2007;282:27354-27365.
20. Liles WC, Rodger E, Brpxmeyer HE i sur. Augmented mobilization and collection of CD34+hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR\$ antagonist. *Transfusion* 2005;45:295-300.
21. Flomenberg N, Devine SM, DiPersio JF i sur. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 2005;106:1867-1874.
22. DiPersio JF, Micaleff IN, Stiff PJ i sur. Phase III prospective, randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:4767-4773.
23. DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A i sur. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood* 2009;113:5720-5726.
24. Sažetak opisa svojstava lijeka Mozobil otopina za injekciju 20 mg/ml. Agencija za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske
25. Calandra G, McCarty J, McGuirk J i sur. AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34+ cells from non-Hodgkin's lymphoma Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: Compassionate use dana. *Bone Marrow Transplant* 2008;41:331-338.
26. Pusic I, Jiang SY, Landua S i sur. Impact of mobilization and remobilization strategies on achieving sufficient stem cell yields for autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:1045-1056.
27. Glaspy JA. Economic considerations in the use of peripheral blood progenitor cells to support high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(Suppl 2):S21-7.
28. Stiff PJ. Management strategies for the hard-to-mobilize patient. *Bone Marrow Transplant* 1999;23 (Suppl 2):S29-33.
29. Kalaycio Rybicki L, Pohlman B i sur. Risk factors before autologous stem-cell transplantation for lymphoma predict for secondary myelodysplasia and acute myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 2006;24:3604-3610.

Postoji li način da izbjegnemo prijevremeni gubitak funkcije jajnika nakon gonadotoksične kemoterapije?

Dr. sc. Nadira Duraković, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: nadira.durakovic@gmail.com

U posljednjih 20-tak godina došlo je do značajnog poboljšanja uspješnosti liječenja malignih bolesti, osobito u liječenju hematoloških malignih bolesti. Posebno su dojmljivi uspjesi u liječenju Hodgkinove bolesti te nekih oblika non-Hodgkinovog limfoma (1-3). Rezultat poboljšanog preživljjenja je i povećanje broja osoba koje su uspješno završile liječenje, no koje se nažalost bore s kroničnim posljedicama tog liječenja. Osim poznatih poteškoća s kardiovaskularnom i plućnom toksičnošću te povećanim rizikom od razvoja druge maligne bolesti, gubitak reproduktivne funkcije značajan je čimbenik u smanjenju kvalitete života preživjelih pacijenata. Također je i toksičnost o kojoj se, nažalost, najmanje razmišlja.

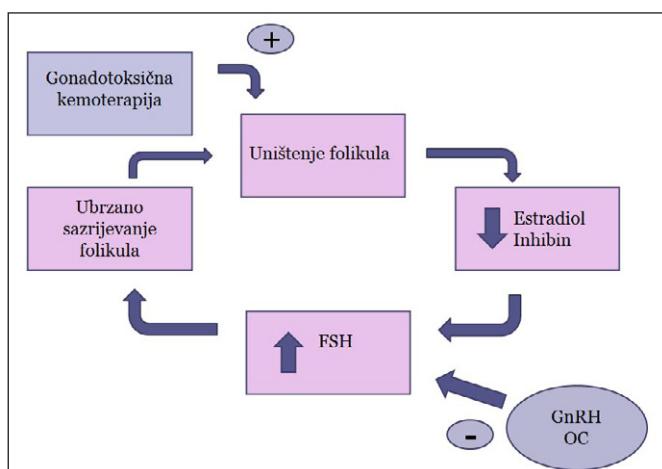
Znamo da je toksični učinak kemoterapije najjači na stanice koje se brzo dijele, uključivo hematopoetske stanice. No germinativne stanice jajnika su osobito osjetljive, a kako su nesposobne za regeneraciju nakon ozljede, liječenje kemoterapijom često uzrokuje trajno oštećenje jajnih stanica odnosno smanjenje sposobnosti reprodukcije. Dvije trećine odraslih žena koje primaju kemoterapiju će razviti preuranjeni gubitak funkcije jajnika (4). U liječenju hematoloških malignih bolesti često se koriste kemoterapeutici koji su osobito toksični za gonade, kao što su ciklofosfamid i busulfan, a većina bolesnika prima i kombinaciju lijekova, što dodatno doprinosi oštećenju gonada. Smatra se da je toksičnost liječenja malignih bolesti donekle reverzibilna osim u slučajevima kada se koristi zračenje gameta odnosno visoke doze kemoterapeutika, uključivo i transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica (mijeloablativnim kondicioniranjem). Navedeno dovodi do gubitka cikličke funkcije jajnika (izostanak menstrualnog ciklusa) odnosno prijevremenog gubitka funkcije jajnika (prijevremena menopauza).

Kako bismo procijenili veličinu problema u našoj populaciji bolesnika analizirali smo podatke o bolesnicama liječenima od limfoma (točnije non-Hodgkinovog limfoma i Hodgkinove bolesti) tijekom 2011. godine u Zavodu za hematologiju KBC

Zagreb. Tijekom navedene godine u Zavodu je u ukupno 88 žena dijagnosticiran non-Hodgkinov limfom odnosno Hodgkinova bolest. Medijan dobi bio je 57 godina (raspon 20 - 94). Dvadeset i četiri žene su navele da su prije terapije imale redoviti menstrualni ciklus. Nakon završene terapije 6 žena (25%) nije povratilo spontane menstrualne cikluse, dok za podatke o preuranjenom gubitku funkcije jajnika praćenje nije bilo dovoljno dugačko.

Pitanje je što možemo učiniti da svojim bolesnicima osiguramo bolje šanse za očuvanje fertiliteta nakon dovršenog liječenja maligne bolesti? U muških bolesnika je to relativno jednostavno: moguće je pohraniti spermu. No očuvanje fertilne funkcije žena je u stvari još uvijek na neki način izazov. Dostupne su publikacije koje govore o sakupljanju i fertilizaciji oocita prije kemoterapije, odnosno krioprezervaciji embrija u onih bolesnica koje imaju partnera i u stabilnoj su vezi. Također je moguće krioprezervirati jajne stanice, pa čak i tkivo jajnika. No iako izvedive, i prema literaturi čini se učinkovite, te su metode skupe, odgađaju terapiju kroz tjedne do mjeseca, te nisu dostupne svim centrima, odnosno moguće su samo u centrima koji imaju aktivan program in vitro fertilizacije. Mogući odgovor na pitanje kako prezervirati fertilnu funkciju bolesnica je upotreba agonista gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH). Do sada objavljene publikacije govore u prilog povoljnog učinka primjene GnRH u očuvanju funkcije jajnika bolesnica koje su liječene kemoterapijom. Rezultat meta analize objavljene 2011. godine jest da je omjer vjerojatnosti da neće imati prijevremeni gubitak funkcije jajnika 3,46 u korist bolesnica koje su primale GnRH (5). Iako postoji dosta pokazatelja o uspješnosti ovog vida terapije u bolesnica koje se liječe od limfoma, te solidnih tumora nehematološkog porijekla, dugo se smatralo da njena vrijednost kod transplantacije nije naročita. Recentno objavljena studija pokazala je povoljan učinak i nakon transplantacije: u ukupno promatranoj populaciji povratak cikličke funkcije jajnika nastupio je u 38.3% bolesnica koje su primale GnRH, te u 11.1% onih koje nisu primale tu terapiju. Razlika je bila još izraženija kada su se promatrале samo osobe transplantirane radi limfoma, u njih je povratak cikličke funkcije jajnika nastupio je u 66.7% bolesnica koje su primale GnRH, te u 18.2% onih koje nisu, dok je razlika bila manje izražena u oboljelih od leukemije (10% vs. 8.3%) (6). Način na

koji GnRH djeluju je ukratko: poznato je da kemoterapeutici djeluju toksično na folikule u razvoju i dovode do njihovog uništenja. Time se smanjuje razina estradiola i inhibina te se kao rezultat podiže razina FSH, što dovodi do povećane mobilizacije folikula, njihovog ubrzanog sazrijevanja, a nastavkom liječenja uništava se još više folikula, odnosno dolazi do začimanja svojevrsnog *circulus viciosus*. Trajnom primjenom agonista GnRH tijekom liječenja kemoterapijom onemogućava se porast razine FSH, onemogućava se sazrijevanje folikula te se postiže svojevrsni hormonalni milieu koji odgovara onom u pretpubertetsko doba. Po prestanku liječenja prestaje se s primjenom agonista GnRH, osovina se ponovno uspostavlja te dolazi do povratka cikličke funkcije jajnika (Slika 1.).



U Republici Hrvatskoj su dostupna najmanje tri agonista GnRH: Zoladex (gosrelin) 3.6 mg implant, Decapeptyl CR (triptorelin) 3.75 mg te Lupron depo (leuprorelin) 3.6 mg. Svi su cijenom izjednačeni, najviše 800 do 900 kn po aplikaciji. Njihova upotreba je ovdje izvan indikacije, što predstavlja svojevrstan etički problem. Činjenica je da se zbog malog tržišta proizvođači gotovo sigurno neće upustiti u provedbu kliničkih studija potrebnih za dobivanje indikacije, a dodatni argument za korištenje lijeka u ovu svrhu je svakako da postoje jasni dokazi o očuvanju fertiliteta u oboljelih od limfoma, čime se njihova upotreba i kod liječenja drugih malignih hematoloških bolesti može opravdati. Nije zanemariva niti činjenica da indikacija nije na listi HZZO-a, te se postavlja pitanje troška ovakvog dodatnog liječenja. Za sada u našem centru bolesnica same plaćaju lijek ako žele da se ovakva dodatna terapija provodi. Za primjenu tijekom prve linije liječenja većine limfoma potrebno je 5 do 6 injekcija, dakle okvirno 5400 kn za primjenu ovog lijeka tijekom cijele

prve linije liječenja. Za usporedbu, većina bolesnica koje primaju intenzivnu terapiju primaju pegilirani filgrastim nakon svakog ciklusa, cijena kojeg je 7200 kn po aplikaciji, dakle 57600 kn tijekom prve linije liječenja.

Jasnih preporuka za primjenu ove terapije nema, no svakako je to nešto s čime svaki hematolog danas treba biti upoznat, i smatramo treba upoznati svoje bolesnice. U našem se Zavodu planira provesti prospективno istraživanje koje će ispitati vrijednost agonista GnRH u limfoma ali i u leukemija, s posebnim osvrtom na njihovu vrijednost u transplantaciji, te korelirati rezultate s dobi i hormonskim statusom. Nadamo se započeti istraživanje tijekom 2014. te pozivamo zainteresirane centre da se javi autoru članka.

LITERATURA:

1. Myers CE, Chabner BA, De Vita VT, Gralnick HR. Bone marrow involvement in Hodgkin's disease: pathology and response to MOPP chemotherapy. *Blood*. 1974 Aug;44(2):197-204
2. Borchmann P, Haverkamp H, Diehl V, Cerny T et al. Eight cycles of escalated-dose BEACOPP compared with four cycles of escalated-dose BEACOPP followed by four cycles of baseline-dose BEACOPP with or without radiotherapy in patients with advanced-stage hodgkin's lymphoma: final analysis of the HD12 trial of the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 10;29(32):4234-42
3. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 1;23(22):5027-33
4. Kreuser ED, Hetzel WD, Billia DO, Thiel E. Gonadal toxicity following cancer therapy in adults: significance, diagnosis, prevention and treatment. *Cancer Treat Rev*. 1990 Sep;17(2-3):169-75
5. Bedaiwy MA, Abou-Setta AM, Desai N, Hurd W et al. Gonadotropin-releasing hormone analog cotreatment for preservation of ovarian function during gonadotoxic chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):906-14
6. Blumenfeld Z, Patel B, Leiba R, Zuckerman T. Gonadotropin-releasing hormone agonist may minimize premature ovarian failure in young women undergoing autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1266-70

Citostaticima uzrokovana neuropatija

Ernest Bilić¹ i Ervina Bilić²

¹ Klinika za pedijatriju Medicinskog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb.

² Klinika za neurologiju Medicinskog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb.

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Ernest Bilić, Klinika za pedijatriju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC
Zagreb. E-pošta: ernest.bilic@zg.t-com.hr

Produljenjem ljudskog vijeka i povećanjem udjela starije populacije, raste i broj oboljelih od malignih bolesti. Napretkom medicine veliki dio malignih bolesti se uspijeva izlječiti ili barem postati kronična bolest. Pronalaskom novih lijekova ili novih tehnika liječenja poput transplantacije tkiva i organa, uspješnost liječenja se povećava. Povećanjem broja lijekova, povećava se i broj nuspojava tih lijekova, pa se nakon liječenja bolesnik ponekad još godinama ili doživotno dodatno kontrolira i liječi zbog nuspojava liječenja.

Periferni živac je snop aksona, citoplazmatskih izdanaka, različitih živčanih stanica čija tijela mogu biti smještena u kralježničnoj moždini, u dorzalnim paravertebralnim ganglijima i mogu biti različito mijelinizirani. Te stanice, ponekad s aksonom i dulje od metra, s nama žive cijeli naš život, i razdoblje prije rođenja, i samim tim ponekad „pamte“ različita toksična oštećenja koja su najčešće reverzibilna. Na koji način može biti oštećen periferni živac? Toksična oštećenja skoro u pravilu primarno oštećuju akson živčanog vlakna, njegovo tijelo, pri čemu mehanizam samog oštećenja može biti vrlo raznolik, od poremećaja sinteze neuralnih faktora rasta, poremećaja oksidacijskih „čistača“ te velike dugoživuće stanice, poremećaja strukture i obnavljanja zahtjevnog cito-skeleta, različitih metaboličkih poremećaja gomilanjem produkata koji se otežano razgrađuju ili kompromitacijom vrlo zahtjevnih energetskih potreba te velike stanice. Kada razmislimo koliko je velika i kako dugo živi stanica perifernog živčanog sustava – pravo je čudo što toksičnih neuropatija nema više.

Mehanizmi djelovanja citostatika su različiti i cilj im je na neki način otežati umnožavanje, obnovu i preživljivanje maligne stanice. Nerijetko pri tome stradaju stanice perifernog živčanog sustava no ta oštećenja ne moraju nužno dovesti do prepoznatljivog neurološkog deficit-a. Citostaticima uzrokovana neuropatija je značajno češća nego što smo toga svjesni, može biti vrlo blaga i nerijetko prolazi

sama nakon nekog vremena. Izuzetno je zanimljiva činjenica da iste doze istih citostatika u različitim bolesnika izazivaju neuropatiju različitog oblika ili stupnja. Ponekad, rijetko, upravo davanje citostatika može razotkriti od ranije prisutnu, blagu kongenitalnu, nasljednu polineuropatiju. Vjerovatno je jedan od razloga za individualno različit obrazac toksične neuropatije konstitucijska različitost i različito ranje, kumulativno, oštećenje perifernog živca.

Citostaticima uzrokovana neuropatija (CUN, engl. *chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN)*), česta je nuspojava prilikom davanja citostatske terapije. CUN značajno smanjuje kvalitetu života oboljelih. CUN se očituje kao motorički, senzorički i autonomni poremećaj. Točna učestalost CUN-a je nepoznata, ali se pretpostavlja da oko 3-7% oboljelih od malignih bolesti koji se liječe samo jednim citostatikom, te 38% onih koji se liječe s dva ili više citostatika imaju taj poremećaj. Citostatici koji se najčešće spominju kao mogući uzroci CUN-a su derivati platine (platimit, karboplatin, oksaliplatin), taksani (paklitaksel, docetaksel), vinka alkaloidi (vinkristin, vinorelbin, vinblastin), talidomid i bortezomib. Zbog težine kliničke slike neuropatije liječnici su često primorani smanjivati doze citostatika, kasniti s njihovim davanjem ili u najtežim slučajevima CUN-a čak prekinuti započeto citostatsko liječenje. Još uvijek ne postoji standar-diziran način prevencije CUN-a zbog nepostojanja konsenzusa različitih struka (onkolozi, hematolozi, neurolozi, fizijatri, pedijatri) u svezi s navedenim problemom. Jedan od razloga za to je i činjenica da bi upravo davanje nekih lijekova, npr. koenzima metilacije, moglo smanjiti učestalost CUN-a ali i djelovanje same citostatske terapije. Ne treba zaboraviti da je CUN upravo posljedica djelotvornosti citostatske terapije koja je sustavna i ne zaobilazi periferni živac. Navedeno dodatno otežava liječenje ovih bolesnika. Kako ne postoje jasni kriteriji za postavljanje dijagnoze i stupnja CUN-a. Stupanj CUN-a se može odrediti sukladno različitim prihvaćenim ocjenskim ljestvicama za neuropatiju (Neuropathy Impairment Score i drugi) koji uključuju klinički nalaz i elektromiogeneurografsку analizu. Od iznimne je vrijednosti pratiti bolesnika tijekom CUN-a pri čemu je od većeg kliničkog značaja ponekad progresija i dinamika neurološkog deficit-a a ne sam inicijalni stupanj.

Kako citostatici mogu oštetiiti motorna, osjetna i autonomna vlakna tako i CUN može za kliničku

sliku imati najrazličitije neurološke simptome koji svojim očitovanjem i dinamikom mogu oponašati različite bolesti perifernog živčanog sustava. U nalazu kliničke elektromioneurografije (EMNG) CUN registriramo najčešće kao aksonalnu neuropatiju odnosno smanjenje ili odsustvo akcijskih potencijala motornih i/ili senzornih vlakana. U slučaju da CUN zahvaća samo ili pretežito tanka, slaba ili nemijelinizirana, osjetna vlakana, u kliničkoj slici možemo naći samo simptome u okviru sindroma periferne neuropatske boli a EMNG nalaz može biti uredan. Zbog toga je od iznimne važnosti bolesnicima sa sumnjom na CUN učiniti, ako je to moguće, kvantitativno senzorno testiranje i valjan neurološki pregled sa značajnim osvrtom na ispitivanje različitih modaliteta osjeta koji nam pružaju uvid u funkcijiranje različitih vrsta vlakana perifernih živaca. Najjednostavnije je, a ne iziskuje puno vremena, redovito kontrolirati osjet toplog (C vlakna perifernih živaca), osjet hladnog (A delta vlakna perifernih živaca) i vibracije (A beta vlakna perifernih živaca). CUN ponekad može dovesti i do vrlo jake boli zbog koje se mora prekinuti započeto liječenje. U slučaju da temeljem vođenog dnevnika boli, intenzitetom i karakterom boli postavimo sumnju na značajnu neuropatsku komponentu bolnog sindroma, bol se lijeći sukladno smjernicama EFNS-a (Europske federacije neuroloških društava).

Paklitakselom uzrokovana neuropatija se očituje kao senzorna neuropatija sa simptomima gubitka osjeta vibracije, dodira, utrnućenja, parestezijama i osjećajem paleće boli. Docetaksel je lijek iz iste skupine, i rjeđe od paklitaksela izaziva CUN. Simptomi se najčešće pojavljuju simetrično zahvaćajući područja šaka i stopala. Obično nakon nekoliko mjeseci poslije prestanka uzimanja lijeka većina simptoma isčezava, ali kod nekih bolesnika ostaju trajne posljedice CUN-a. Motorički simptomi su rjeđe izraženi, uglavnom u obliku slabosti muskulature. Može se javiti i poremećaj propriocepcije i prolazni gubitak tetivnih refleksa. Pojavnost i intenzitet simptoma ovise o pojedinačnoj dozi, duljini davanja lijeka, kumulativnoj dozi, podatku o terapiji cisplatinom prije ili istodobno s paklitakselom, te komorbiditetu poput dijabetesa ili alkoholizma.

Cisplatin je citostatik koje se upotrebljava u liječenju solidnih tumora već skoro polovicu stoljeća. Ovaj lijek izaziva CUN u obliku pretežito senzorne polineuropatije koja počinje sa simptomima boli i parestezija u nogama. Ovi simptomi mogu nastupiti i tjednima nakon davanja lijeka. Ponekad simptomi progrediraju do stadija vrlo jake boli i senzorne

ataksije. Svi derivati platine se nakupljaju u području dorzalnih ganglija i ometaju normalnu funkciju ionskih kanala (uglavnom Na). CUN uzrokovana cisplatinom je uglavnom reverzibilna.

Oksaliplatin, je treća generacija lijekova na bazi platine i koristi se u liječenju karcinoma debelog crijeva. Ovaj lijek nema poput cisplatina jak mijelosupresivni, niti nefrotoksični učinak, ali za razliku od ostalih lijekova iz ove skupine ubrzo nakon davanja dovodi do akutne bolne neuropatije. Bolesnici se najčešće žale na parestezije u udovima i oko usta, a osobito je izražena hiperestezija na hladno. U oko 90% bolesnika nakon izlaganja hladnoći dolazi do akutnih i prolaznih simptoma u vidu grčeva, parestezija i dizestezija. Nakon višekratnog primanja oksaliplatina bolesnici razvijaju kronični oblik CUN-a, karakteriziran senzornom aksonalnom degeneracijom, motorički simptomi se javljaju pretežno u akutnoj fazi, dok kasnije nestaju.

Vinkristinom uzrokovana neuropatija se očituje simptomima utrnutosti ekstremiteta te osjećaja bocanja i žarenja u području šaka i/ili stopala. I ostali vinka alkaloidi, poput vinblastina i vinorelbina izazivaju CUN, ali znatno rjeđe od vinkristina, koji se i puno više koristi u onkologiji. Ponekad se bolesnici žale na osjećaj umrtvljenosti oko usta i gubitak kinestezije. U najtežim slučajevima dolazi do simptoma mlohave kljenuti svih ekstremiteta. Uglavnom su promjene reverzibilne i nakon 3-6 mjeseci nastupa poboljšanje. Svega oko 3% oboljelih, a to su genetski predisponirani imaju trajne posljedice.

Bortezomib je lijek koji blokira različite signalne puteve u stanici dovodeći do zaustavljanja staničnog ciklusa, apoptoze i zaustavljanja angiogeneze. Bortezomib se daje se oboljelima od multiplog mijeloma. Nuspojava lijeka je periferna neuropatija koja se pojavljuje već nakon prvog ciklusa terapije, a simptomi su najizraženiji nakon petog ciklusa terapije, i obično nakon toga se ne intenziviraju. Sudeći prema dosadašnjim spoznajama, oštećenje mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma je ključan korak u razvoju neuropatije uzrokovane bortezomibom (BINP). Jedan od koraka u razvoju BINP-a je i poremećaj sinteze neuralnih faktora rasta, poremećaj fiziološke neuroprotekcije i posljedična neurodegeneracija odnosno poremećaj programirane stanične smrti živčanih stanica. Zbog sveobuhvatnosti djelovanja ovog lijeka ne začuđuje činjenica da različite vrtste živčanih stanica, njihova tijela, aksoni i mijelinski omotač mogu biti zahvaćeni ovim oblikom neuropatije. Zanimljive promjene su nađene u stanicama dorzalnih ganglija odnosno tijelima osjetnih

stanica perifernog živčanog sustava, što dovodi do senzorne polineuropatijs s pozitivnim (parestezije, bol, alodinija, hiperestezija) i negativnim simptomima (manjak ili odsustvo različitih modaliteta osjeta što neizravno ukazuje na oštećenja različitih vrsta vlakana perifernih živaca (A-delta vlakna osjet hladnog, A-beta vlakna osjet vibracije, C- vlakna osjet toplog i boli). S obzirom na to da je funkciju tankih, nemijeliniziranih, vlakana perifernih živaca moguće objektivizirati jedino primjenom kvantitativnog senzornog testiranja, klasična elektromi-neurografija može previdjeti jedan oblik polineuropatijs uzrokovanе bortezomibom. Oštećenje nemijeliniziranih vlakana može u oboljelih od BINP-a uzrokovati razvoj sindroma neuropatske boli koji osim same boli koja ima neuropatske karakteristike uključuje i poremećaj sna i reaktivni depresivni poremećaj i u tom slučaju bol se liječi sukladno EFNS-ovim smjernicama za liječenje neuropatske boli.

Za razliku od toksične polineuropatijs uzrokovane talidomidom, u oboljelih od BINP-a se može očekivati značajan oporavak neurološkog deficita nakon prekida davanja bortezomiba iako to nije nužno pravilo.

Patofiziologija CUN-a

Način nastanka CUN-a je bio ciljem brojnih istraživanja. Većina zaključaka se svodi na to da nabrojeni citostatici aktiviraju ionske kanale u plazmatskoj membrani stanica korijena dorzalnih ganglija i dorzalnih rogov u kralježničkoj moždini. Zbog poremećene funkcije ionskih kanala dolazi do promjene koncentracije kalcija, kalija, natrija i glutamata unutar citoplazme, što dovodi do niza reakcija koje rezultiraju pojmom neuropatijs i neuropatske boli. Navedene reakcije uključuju otvaranje mPTP pora (engl. *mitochondrial permeability transition pore*) na mitohondrijima te izlaska kalcija iz njih, aktivaciju protein kinaze C, fosforilaciju TRPV receptora (engl. *transient receptor potential vanilloid*) na koji se veže kapsaicin, aktivaciju kalpaza/kalpain sustava, te u konačnici nakupljanje nitričnog oksida i slobodnih radikala koji induciraju oštećenje aksona i tijela živčanih stanica. Upalni proces dovodi do promjena i u stanicama glije i u makrofazima, što također dovodi do promjena unutar neurona i nastanka simptoma CUN-a.

Paklitaksel i vinkristin ostvaruju svoj protutumorski učinak vežući se za tubulin, što dovodi do oštećenja diobenog vretena tijekom mitoze u procesu diobe stanice. Aksonalni mikrotubuli se također sastoje od tubulina i neurotoksičnost paklitaksela i

vinkristina je najčešće uzrokovanа upravo oštećenjem mikrotubula aksona što inicijalno dovodi do poremećaja funkcije samog aksona a sekundarno i do smrti živčane stanice.

Simptomi citostaticima uzrokovanе neuropatijs:

Dominantno osjetni simptomi:

- Parestezije, hiperestezija, hipoestezija, dizestezije, bol
- Hipo i areflexija
- Poremećaj ili nedostatak propriocepcije,
- Poremećaj ili nedostatak osjećaja vibracije,
- Poremećaj ili nestanak osjećaja dodira
- Poremećaj ili nestanak razlikovanja dodira oštrog i tupog predmeta, osjeta boli, hladnog, toplog, fizičnih promjena osjeta temperature

Dominantno motorički simptomi:

- Slabost muskulature,
- gubitak fine motorike,
- poremećaj hoda,

Simptomi od strane autonomnog živčanog sustava:

- Neredovita stolica,
- retencija mokraće,
- seksualna disfunkcija,
- poremećaji regulacije krvnog tlaka

Liječenje CUN-a

Amfostin

U brojnim radovima pokušalo se naći optimalan način liječenja CUN-a. Jedan od lijekova koji se ispitivao je *amfostin*, koji u svom aktivnom obliku potpomaže obnovu DNK, a istodobno ne bi trebao utjecati na učinkovitost kemoterapije. Do sada je objavljeno nekoliko studija o utjecaju **amfostina** na CUN uzrokovanu uporabom taksana. U niti jednoj od objavljenih studija nije nađeno poboljšanje simptoma periferne neuropatijs, neovisno o tome da li se davala manja ili veća doza paklitaksela.

Vitamin E

Vitamin E je dobro poznat antioksidans za koji je ispitivan terapijski učinak u mnogim neurološkim, posebice neurodegenerativnim, bolestima. Za njega se pretpostavlja da štiti stanicu od oksidativnog stresa i tako može smanjiti pozitivne osjetne simptome u okviru kliničke slike CUN-a, simptome poput utrnutosti, mravinjanja, pečenja i neuropatske boli u udovima. U ispitivanjima se promatrao učinak različitih doza vitamina E koji se davao nakon cisplatin, paklitaksela ili kombinacije tih lijekova. U dvije

randomizirane studije vitamin E se davao u dozama od 300 mg i 600 mg tijekom kemoterapije cisplatinom i tri mjeseca nakon toga. Kontrolna skupina nije primala vitamin E. U obje skupine bolesnika kojima su davane različite doze vitamina E, zabilježena je manja učestalost periferne neurotoksičnosti, što je dokazano kliničkim i neurofiziološkim pretragama. Prema rezultatima jedne studije bolesnici koji su razvili klinički sliku CUN-a imali su niže bazalne vrijednosti vitamina E, a vrijednosti vitamina E u plazmi su bile sve niže što je kemoterapija dalje odmicala. Na žalost studija je provedena na malom uzorku bolesnika, te su potrebne znatno veće kontrolirane studije da se nedvojbeno zaključi postoji li povezanost učinka vitamina E na nastanak CUN-a. U jednoj od zadnje publiciranih studija Kottschade i sur zaključuju da nema statistički značajnog učinka vitamina E na prevenciju i liječenje CUN-a.

Infuzije kalcija (Ca) i magnezija (Mg)

Oksalat, metabolit oksaliplatina, veže se za Ca i Mg. Postavljena je hipoteza da taj proces može doprinijeti manjoj neurotoksičnosti oksaliplatina. Učinkovitost Ca i Mg davanih u infuzijama bolesnicima s CUN-om ispitivana je u skupini bolesnika koja je neposredno nakon primanja oksaliplatina razvila CUN. Prema kliničkim opservacijama ta intervencija je dovela do smanjenja simptoma CUN-a. Skupini od 96 bolesnika s karcinomom kolona koji su u okviru kemoterapije primali oksaliplatin dato je u infuziji neposredno prije i neposredno poslije navedenog citostatika 1 g Ca glukonata i Mg sulfata. Nakon toga su bilježeni simptomi CUN-a i u tretiranoj skupini 65% bolesnika nije imalo CUN, dok je u kontrolnoj skupini, koja nije primala Ca ni Mg nađeno svega 37% bolesnika bez simptoma CUN-a. Zamjerka ovom istraživanju je to što je bilo retrospektivno i što nisu rađene objektivne pretrage za dokazivanje neuropatije, nego je temeljeno samo na subjektivnim iskazima bolesnika.

Triciklički antidepresivi

Nortriptilin, aktivni metabolit amitriptilina blokira ponovnu pohranu serotoninu i noradrenalina u SŽS-u. Tako amitriptilin bi mogao izazvati analgeziju tijekom liječenja CUN-a, posebice parestezija. Da bi se to dokazalo rađena je randomizirana dvostruko slijepa studija, gdje se oboljelima koji su primali cisplatin davao nortriptilin u dozi do 100 mg na dan kroz 4 tjedna. Rezultati su pokazali povoljan učinak nortriptilina, jer je ispitivana skupina kojoj je davan ovaj antidepresiv imala manju bol, bolje su

spavali i imali su nešto manje izražene neuropatske simptome. Važno je naglasiti da je davanje tricikličkih antidepresiva u liječenju CUN-a simptomatsko i odnosi se isključivo na smanjenje bolne komponente kliničke slike CUN-a dok je davanje vitamina E i drugih ranije spomenutih tvari imalo za cilj pokušati etiopatogenetski djelovati na razvoj CUN-a.

Antikonvulzivi

Karbamazepin je antiepileptik koji je u manjoj kontroliranoj studiji bolesnika koji su primali oksaliplatin, 5-fluorouracil i folnu kiselinu doveo do smanjenja simptoma CUN-a. Lijek je davan peroralno u dozi 200-600 mg s ciljem postizanja koncentracije lijeka u serumu od 3-6 mg/L. Osjet vibracije na dlanovima šaka i na stopalima je bio bolji u skupini bolesnika koja ga je primala, u odnosu na skupinu koja nije primala karbamazepin.

Acetyl-L-carnitin

Bolesnicima koji su nakon primanja paklitaksela i cisplatinu razvili CUN, davan je acetyl-L-carnitin u dozi od 1 g i.v. /dan tijekom 10 dana ili 1 g tri puta na dan peroralno tijekom 8 tjedana. Bolesnici su praćeni klinički i rađena je elektrofiziološka obrada. Rezultati ovih početnih ispitivanja nisu pokazali značajniji terapijski učinak ove supstance u liječenju CUN-a.

Glutamin

Neuroprotektivni učinak glutamina (ne esencijalna aminokiselina) je opisan kod nekih pacijentica koje su primale paklitaksel. U prvom radu opisano je dvanaest bolesnica s uznapredovalim karcinomom dojke, koje su u sklopu liječenja primale paklitaksel i 10 g glutamina na dan tijekom 4 dana. Kao kontrolna skupina promatrane su 33 žene s istom dijagnozom koje nisu primale glutamin. U skupini žena koje su primale glutamin učestalost dizestezija je bila manja. Slične rezultati su dobiveni i kod pacijentica koje su primale paklitaksel prije transplantacije matičnih stanica. U životinjskim modelima je dokazano da glutamin regulira sintezu neuralnih faktora rasta. Svi autori navode da je prije donošenja zaključaka potrebno provesti veće randomizirane studije.

Glutation

Glutation je prirodni tioltripeptid koji može prevrirati neurotoksičnost derivata platine. Prepostavlja se da djeluje tako što sprječava nakupljanje platine u dorzalnim korjenovima ganglija u kralježničnoj moždini. Skupina bolesnika s karcinomom kolona je primala 1,5 g/m² glutationa prije oksaliplatina.

Neurološkim i elektrofiziološkim pregledom nađena je značajno manja neurotoksičnost u tretiranih bolesnika, što je klinički bilo prepoznatljivo kao očuvanje osjeta vibracije. Nije nađena značajna razlika u provodljivosti suralnog živca niti u amplitudi osjetnih vlakana.

Učinkovitost glutationa je ispitivana i kod žena oboljelih od karcinoma ovarija, koje su primale cisplatin. Nađeno je da su žene koje su primale glutation imale tjelesnu masu 2 kg veću na kraju terapije, bolju kvalitetu života i manju učestalost depresije. Kod oboljelih od karcinoma želuca koji su liječeni cisplatinom, protektivna učinkovitost glutationa je potvrđena nalazom boljih tetivnih refleksa, boljim nalazom osjeta vibracije, te boljim elektrofiziološkim nalazom ispitivanja provodljivosti živaca (medijanusa, ulnarisa i suralisa).

Eritropoetin

Vjeruje se da eritropoetin osim poticanja eritocitopoeze ima i povoljan učinak na periferni živčani sustav, tako da djeluje neuroprotektivno na Schwannove stanice i dorzalne ganglike. Navedeni očekivani učinci eritropoetina još se moraju dokazati u većim studijama.

Nefarmakološko liječenje citostaticima uzrokovane neuropatije

Neuroprotektivni učinak akupunkture je opisan u bolesnika s bolnom neuropatijom kao komplikacijom šećerne i HIV bolesti. Postoje i radovi s vrlo malim brojem ispitanica oboljelih od ginekoloških malignoma, koje su primale karboplatin i paklitaksel i kojima su tretmani akupunktura pomagali.

Tjelesna aktivnost i vježbanje

Utjecaj tjelesne aktivnosti i vježbanja kao prevencije nastanku CUN-a nije do sada bilo ispitivano u većim studijama. Ali zato postoji nekoliko publiranih radova o povolnjom utjecaju vježbanja, aerobika i vježbi istezanja kod oboljelih od dijabetičke neuropatije i miotone distrofije. Sve studije svoje rezultate temelje na elektrofiziološkom ispitivanju. Osim navedenog ispitivani su i drugi učinci vježbanja, poput volumena muskulature, psihološkog stanja, kvalitete života i potrošnje analgetika. I ovdje su postignuti bolji rezultati u skupine bolesnika koji su redovito vježbali. Međutim većina objavljenih rada vašom metodologijom ne zadovoljavaju kriterije da bi se tjelesna aktivnost i vježbanje mogli nedvojbeno preporučiti kao dopunska terapijska mjera u liječenju i preveniraju periferne neuropatije.

Terapija ultracrvenim svjetлом

PILT (engl. *pulsed infrared light therapy*) ili terapija ultracrvenim svjetлом koje se usmjeri u područje stopala s namjerom da poboljša perfuziju tkiva potičući stvaranje nitričnog oksida je dovela do izvjesnog uspjeha kod dijabetičara s neuropatijom (poboljšan osjet, manji intenzitet boli). Na onkološkim bolesnicima ispitivanja ovom tehnikom nisu rađena.

Transkutana živčana stimulacija (engl. transcutaneous nerve stimulation -TENS)

Kao i kod prethodne tehnike poboljšanje je nastupilo kod oboljelih od dijabetične polineuropatije, dok kod onkoloških bolesnika ova tehnika nije ispitivana u većim skupinama bolesnika.

Kapsaicinske masti

Kod oboljelih od dijabetičke polineuropatije mazanje kože stopala ili potkoljenica 0,05% kapsaicinskog mašću 3-4 puta na dan kroz osam tjedana do prinijelo je smanjenju hipoestezije. Neki su bolesnici morali odustati od ovog liječenja zbog jakog eritema kože. Ni ovaj vid liječenja nije za sada ispitivan kod oboljelih od CUN-a.

Stimulacija kralježnične moždine

Stimulacija kralježnične moždine (SCS, engl. *Spinal cord stimulation*) obuhvaća kiruršku ugradnju elektroda u epiduralni prostor, s ciljem prijenosa električnih impulsa koji dovode temeljem „gate control“ mehanizma do smanjenja boli u području u kojem su izazvane parestезije. Ova metoda se najčešće upotrebljava za liječenje neuropatske radikulopatije pri čemu se preciznim namještanjem elektroda selektivno produciraju parestezije u dermatomu u kojem je izražena neuropatska bol. Prilikom implantacije elektroda važan je odabir elektroda i mjesto na koje se one implantiraju. Nakon postupka implantacije slijedi razdoblje u kojem se vanjskim programatorom odabire obrazac stimulacije, elektrode koje će biti aktivne, način stimulacije i jačina stimulacije. Svi navedeni parametri se podešavaju temeljem izvešća bolesnika dok se ne postigne zadovoljavajuća analgezija odnosno ugodan osjećaj blagog mravinjanja u području u kojem je prethodno bila prisutna jaka bol. Ova tehnika je korisna u nekim bolesnika s neuropatijom i bolnih stanja s dominantnom neuropatskom komponentom (neuropatska radikulopatija, kompleksni regionalni sindrom tipa 1 i 2, stanja nakon traume medule spinalis i dr) no nije učinjeno dovoljno ispitivanja u oboljelih od CUN-a te se ova

metoda ne može sa sigurnošću preporučiti za liječenje bolne komponente kliničke slike CUN-a.

Pike i suradnici su na respektabilnom uzorku oboljelih od karcinoma dojke, ovarijske i vrata izračunali da se na svakog oboljelog koji uz jedan od navedenih karcinoma ima i CUN potroši 17344 američka dolara više u odnosu na bolesnike s istom onkološkom dijagnozom ali bez CUN-a. Oboljeli od CUN-a imaju i 12 puta više posjeta liječniku, više izostaju s posla i, što je očekivano, više borave u bolnici.

Zaključak i preporuke

Uspješnije liječenje onkoloških bolesnika između ostalog uvjetovano je i boljim kemoterapijskim protokolima liječenja. Uporaba vinka alkaloida, derivata platine, taksana i bortezomiba unaprijedila je liječenje malignih bolesti što je dovelo do većeg postotka preživljjenja. Na žalost, uz povećano preživljajne uporabom navedenih lijekova, u bolesnika se nalazi veći broj kasnih posljedica onkološkog liječenja, poput neuropatije (CUN). CUN i bol kao posljedica neuropatije su i glavni ograničavajući čimbenici koji uvjetuju smanjenje doze nekog od navedenih citostatika. Zbog svega navedenog niz je neuroprotektivnih farmakoloških i nefarmakoloških metoda ispitivano da bi se smanjila učestalost CUN-a. U literaturi se najčešće spominju infuzija Ca/Mg, amifostin, glutamin, acetil-L-karnitin i eritropoetin. Eritropoetin potiče eritropoezu i tako može prevenirati težu anemiju, što dovodi i do bolje kvalitete života oboljelih. Na žalost, za niti jedan od nabrojanih lijekova nema dosta podataka da bi se mogao bezrezervno preporučiti kao neuroprotekcija kod CUN-a.

Svakako da je važno prilikom pristupa oboljelima od CUN-a naučiti bolesnika da je prikladna higijena stopala, nošenje udobne obuće, pažljiva vizuelna kontrola nogu tijekom hoda, te izbjegavanje termalnih ozljeda vrlo bitna preventivna mjera kojom se sprječavaju brojne posljedice. Neredovito pražnjenje stolice treba sprječavati dostačnim unosom tekućine te prehranom bogatom vlaknima. Ovi bolesnici su ponekad vrlo zahtjevni i jedino multidisciplinarni pristup liječenju dovodi do zadovoljavajućeg terapijskog rezultata.

LITERATURA:

1. Albers JW, Chaudhry V, Cavaletti G, Donehower RC. *Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds*. Cochrane Database Syst Rev. 2011;2:CD005228.
2. Beijers AJM, Jongen JLM, Vreugdenhil G. *Chemotherapy-induced neurotoxicity: the value of neuroprotective strategies*. Neth J Med 2012; 70:18-25.
3. Delforge M, Blade J, Dimopoulos MA, Facon T, Kropff M, Ludwig H, et al. *Treatment-related peripheral neuropathy in multiple myeloma: the challenge continues*. Lancet Oncol. 2010;11:1086-95.
4. Driessen CML, de Kleine-Bolt KME, Vingerhoets AJM. *Assessing the impact of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity on the quality of life of cancer patients*. Supp Care Canc 2012;20:877-881.
5. Finnerup NB, Sindrup SH, Jensen TS. *The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain*. Pain. 2010;150:573-81.
6. Kautio A-L, Haanpaa M, Saarto T, et al. *Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms*. J Pain Symptom Manage. 2008; 35:31-39.
7. Keswani SC, Bosch-Marce M, Reed N, Fischer A, Semenza GL, Hoke A. *Nitric oxide prevents axonal degeneration by inducing HIF-1-dependent expression of erythropoietin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 22;108:4986-90
8. Knijn N, Tol J, Koopman M, Werter MJ, Imholz AL, Valster FA, et al. *The effect of prophylactic calcium and magnesium infusions on the incidence of neurotoxicity and clinical outcome of oxaliplatin-based systemic treatment in advanced colorectal cancer patients*. Eur J Cancer. 2011;47:369-74
9. Kottschade LA, Sloan JA, Mazurczak MA. *The use of vitamin E for the prevention of chemotherapy induced peripheral neuropathy: results of a randomized phase III clinical trial*. Supp Care Canc 2011;19: 1769-1777
10. Manji H. *Toxic neuropathy*. Curr Opin Neurol 2011;24:484-490
11. Mc Hugh JC, Tryfonopoulos D, Fennelly D, Crown J, Connolly S. *Electroclinical biomarkers of early peripheral neurotoxicity from oxaliplatin*. Eur J Canc Care 2012 May 17. doi: 10.1111/j.1365-2354.2012.01361.x. [Epub ahead of print]
12. Pace A, Giannarelli D, Galie E, Savarese A, Carpano S, Della Giulia M, et al. *Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy: a randomized, placebo-controlled trial*. Neurology. 2010;74:762-6.
13. Park SB, Lin CS, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC. *Dose effects of oxaliplatin on persistent and transient Na⁺ conductances and the development of neurotoxicity*. PLoS One 2011;6:e18469.
14. Pike CT, Birnbaum HG, Muehlenbein CE, et al. *Healthcare Costs and Workloss Burden of Patients with Chemotherapy-Associated Peripheral Neuropathy in Breast, Ovarian, Head and Neck, and Nonsmall Cell Lung Cancer*. Chemother Res Pract. 2012;2012:913848. doi: 10.1155/2012/913848. Epub 2012 Mar 14
15. Saarto T, Wiffen PJ. *Antidepressants for neuropathic pain*. Cochrane Database Syst Rev. 2007(4):CD005454.
16. Singh Jaggi A, Singh N. *Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy*. Toxicology 2012;291:1-9.
17. Stubblefield MD, McNeely ML, Alfano CM, Mayer DK. *A prospective surveillance model for physical rehabilitation of women with breast cancer: chemotherapy-induced peripheral neuropathy*. Cancer 2012; 118(8 Suppl):2250-60.
18. Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C. *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies*. Eur J Cancer. 2008;44:1507-15.

Izvanstanična cirkulirajuća DNA(cfDNA) kao prognostički biljeg u bolesnika s limfomom

**Dino Dujmović, Vedrana Škaro,
Sandra Bašić-Kinda, Dora Markulin,
Ivana Samaržija, Pavle Rončević, Ivo Radman,
Danijela Kolenc, Klara Dubravčić, Igor Aurer**

Adresa autora za kontaktiranje:

Dino Dujmović, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb i

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: ddujmovi@mef.hr

Izvanstanična cirkulirajuća DNA (cfDNA) se može naći u krvi zdravih pojedinaca, a povišene vrijednosti su opisane u kliničkim stanjima kao što su maligne i autoimune bolesti, trauma, infarkt miokarda, nekroza tkiva. U bolesnika sa solidnim tumorima koncentracija cfDNA je od prognostičkog značenja. Podaci u bolesnika s limfomima su vrlo oskudni.

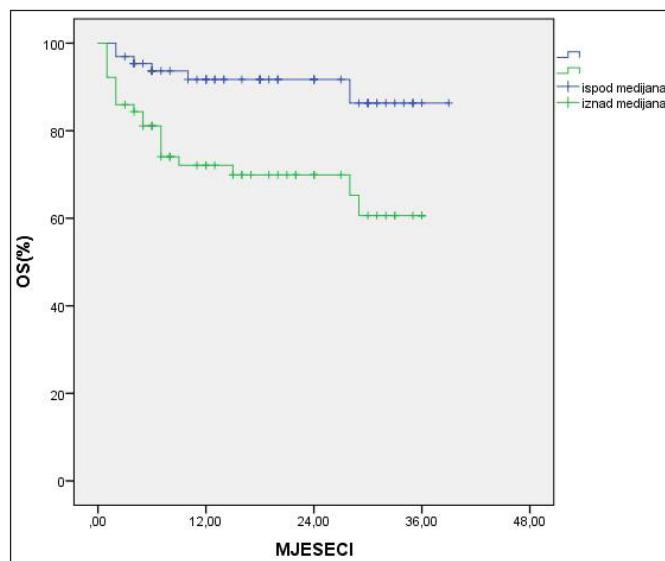
U našem istraživanju smo kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu odredili koncentraciju cfDNA u 129 bolesnika s limfomima prije početka i na kraju liječenja i korelirali nalaz s laboratorijskim i kliničkim parametrima te ishodom liječenja.

Rezultati su pokazali da je 49 bolesnika (38%) imalo povišenu koncentraciju cfDNA. cfDNA je bila viša u bolesnika s proširenom bolesti i korelirala je s dobi bolesnika, LDH-om i koncentracijom beta 2-mikroglobulina. Nije bilo razlike prema spolu, postojanju ekstranodalne lokalizacije kao niti između agresivnih i indolentnih non-Hodgkin limfoma (NHL). Bolesnici s koncentracijom cfDNA iznad medijana su imali lošije preživljjenje i preživljjenje bez znakova bolesti od onih s nižom (Slika 1. i 2.). Razlika između onih s koncentracijom cfDNA unutar i iznad normale nije bila statistički značajna. U multivarijatnoj analizi su prognostički značajni bili dob, beta 2-mikroglobulin i LDH, ali ne i cfDNA. Slični rezultati su dobiveni i u pojedinim podskupinama NHL-a. U bolesnika s Hodgkinovim limfomom koncentracija cfDNA nije korelirala s prognozom. Nakon liječenja je koncentracija cfDNA bila niža u svih bolesnika, no njen pad nije korelirao s ishodom liječenja.

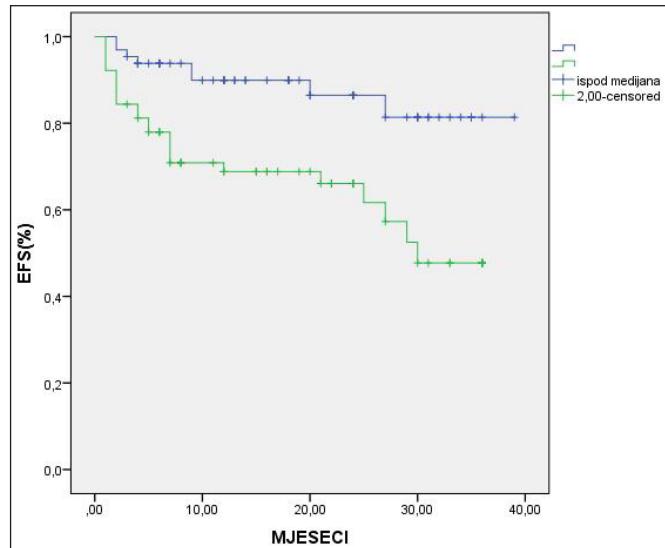
U zaključku, koncentracija cfDNA u bolesnika s limfomom je često normalna, nema razlike između indolentnih i agresivnih NHL-a. cfDNA je viša u bolesnika s uznapredovalim tumorima lošije prognoze, no njeno određivanje ne daje dodatne prognostičke informacije u odnosu na do sada poznate prognostičke parametre.

Tip limfoma	Razina cfDNA (ng/ml) medijan (raspon); broj bolesnika s koncentracijom iznad normale (%)
Sveukupno	20.57 (0.45-2009.45); 49 (38.0)
HL	12.65 (1.95-546.34); 8 (28)

B-NHL	23.43 (0.45-2009.45); 36 (39)
Agresivni B- NHL	26.66 (0.45-1676.44); 27 (41)
B-LCL	24.80 (0.45-1676.44); 18 (38)
MCL	36.62 (7.66-476.60); 4 (50)
BL	15.96 (8.70-534.44); 1 (25)
Intermediarni između BL i B-LCL	955.42 (921.71.-1079); 3 (100)
Intermediarni između HL i B-LCL	9.96(7.78-147.46); 1 (25)
Indolentni B-NHL	17.92 (2.09-2009.45); 9 (36)
FL	16.84 (2.09-251.63); 5 (31)
EMZL	20.95 (11.99-2009.45); 2 (40)
NMZL	15.48 (12.17-931.5); 2 (67)
SLL	12.50 (7.14-17.87); 0
LPL	15.48; 0
T-NHL	38.04 (12.12-892.36); 5 (71)
PTCL	62.08 (12.12-892.36); 3 (75)
ALCL	89.42 (38.04-140.81); 2 (100)
LBL	15.81; 0



Slika 1.



Slika 2.

Kompozitni limfom

Nives Jonjić¹, Sanja Pećanić¹, Irena Seili Bekafigo²,
Toni Valković³

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

² Centar za kliničku citologiju KBC Rijeka

³ Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju, Klinika za internu medicinu, KBC Rijeka

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Nives Jonjić, dr. med.

Zavod za patologiju

Klinički bolnički centar Rijeka i

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: nives@medri.hr

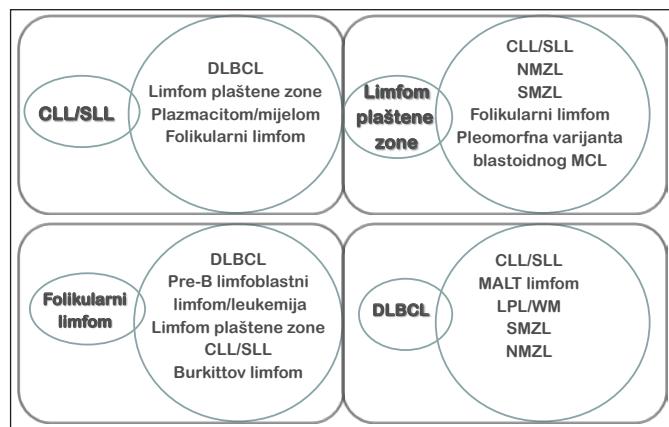
Kompozitni limfom (KL) je rijedak oblik limfoma koji se tijekom godina različito definirao. Prvi put se u literaturi pojmom KL pojavljuje 1954., podrazumijevajući više morfološki različitih oblika limfoma u istog bolesnika (1). Par godina kasnije, Rappaport sa sur. sužava definiciju na različite morfološke slike unutar istog anatomskega sijela (2), a približno dvadeset godina kasnije Kim sa sur. pod pojmom KL podrazumijeva prisutnost HL-a i NHL-a u istim anatomskom sijelu (3). U dalnjim radovima KL se definira kao nalaz dva morfološka i imunofenotipska različita oblika limfoma u istom limfnom čvoru ili nekom drugom sijelu (4).

Pojam KL treba razlikovati od diskordantnog limfoma koji predstavlja dva različita oblika limfoma u različitim sijelima u istog bolesnika, dok sekvencijalni limfom podrazumijeva različite oblike limfoma koji se javljaju u istom anatomskega sijelu, ali jedan iza drugog. Konačno, KL treba razlučiti od pojma transformacije ili progresije koji obuhvaća prijelaz limfoma u agresivniji oblik (5). Primjer transformacije je prijelaz kronične limfocitne leukemije/limfoma malih limfocita (CLL/SLL) u agresivniji oblik, fenomen poznat kao Richterov sindrom. Većinom bolesnici razviju difuzni B veliko stanični limfom (DLCL), međutim bolesnici mogu razviti i tzv. Hodgkinovu varijantu Richterovog sindroma (6,4). U slučaju potonje transformacije važno je razdvojiti stanice nalik Reed-Sternbergovim (RS) od pravih RS-stanica (6).

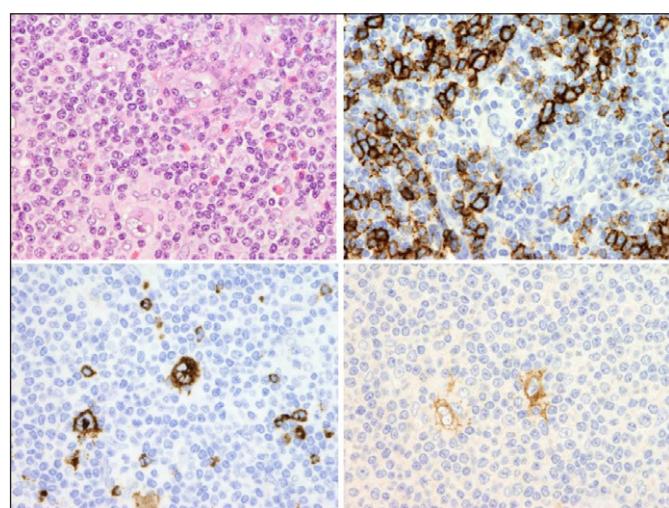
Kompozitni limfom je rijedak, međutim točna pojavnost ove bolesti nije potpuno poznata obzirom na nedostatak konsenzusa oko definicije (primjene različitih klasifikacijskih sustava tijekom godina). Relativna učestalost KL-a u različitim studijama kreće se od 1% do 4.7% unutar ne-Hodgkinovih

limfoma (7). Životna dob i spol ovise o tipu limfoma koji se pojavljuje dok sijelo može biti nodalno i ekstranodalno (npr. gastrointestinalni trakt, kosti, slezena i drugdje). Ako dolazi do zahvaćanja koštane srži obično to čini agresivnija komponenta KL-a. Terapija je usmjerena na agresivniju sastavnici (4,6).

Različite kombinacije limfoma tvore KL, kao npr.: dva oblika ne-Hodgkinovog limfoma (NHL) perifernih limfocita B (Slika 1.); NHL limfocita B i Hodgkinov limfom (HL) (Slika 2.); NHL limfocita B i limfocita T te NHL limfocita T i HL (6). Pato-geneza različitih oblika limfoma nije u potpunosti razjašnjena (4).



Slika 1. Primjer udruženosti pojedinih oblika ne-Hodgkinovih limfoma limfocita B u sklopu kompozitnog limfoma. DLBCL, difuzni B veliko stanični limfom; CLL/SLL, kronična limfocitna leukemija/limfom malih stanica; NMZL, nodalni limfom marginalne zone; SMZL, limfom marginalne zone u slezenu.



Slika 2. Primjer kompozitnog limfoma u limfnom čvoru sastavljen od limfoma malih stanica i Hodgkinova limfoma miješane celularnosti (A). Limfom malih stanica je imunohistokemijski CD20 pozitivan dok Hodgkinove stanice pokazuju karakterističan fenotip CD15 (C) i CD30 (D).

Komponente koje tvore KL mogu i ne moraju biti klonalno povezane. Incidencija klonalne povezanosti kod različitih oblika KL-a varira tako npr. u slučaju folikularnog limfoma niskog gradusa i DLCL je obično česta. Suprotno tome klonalna povezanost je vrlo rijetka u slučaju KL kojeg tvore T limfociti indolentnog oblika i limfom velikih T stanica NHL. U slučajevima KL-a gdje je NHL B limfocita udružen s HL-om, klonalnost je utvrđena u dosta slučajeva (8,9). S druge pak strane klonalna povezanost je vrlo rijetka u KL-u sastavljenim od NHL B limfocita i NHL T limfocita ili NHL T limfocita i HL-a (10). Moguća objašnjenja za klonalnu povezanost ili nepovezanost, koja se nalazi kod KL-a, su različita od slučajnosti, genetske nestabilnosti, genetske predispozicije, zajedničke prekursorske stanice, imunodeficijencije, izloženosti virusu ili karcinogenu te brojna druga moguća objašnjenja (6).

Histološki i imunofenotipski nalaz odgovara obliku limfoma koji tvori KL. Važno je adekvatno uzorčenje kako se dijagnoza ne bi previdjela kao što se to može dogoditi u slučaju nepravilno uzorčenih iglenih biopsija ili aspiracija (ako uzorak nije uzet s više mjesta unutar čvora/ekstranodalnog sijela). Imunofenotip je važan jer može pomoći u utvrđivanju klonalne povezanosti između dviju komponenti, npr. limfomi koji eksprimiraju CD5 i CD23 i imaju isti citoplazmatski imunoglobulinski laki lanac, što znači da su klonalno povezani. Međutim, ponekad različiti imunofenotip tumorskih stanica ne isključuje mogućnost njihove klonalne povezanosti. U takvim slučajevima molekularna analiza je ključna za njihovo utvrđivanje.

Zaključno možemo reći da KL uključuje dva ili više različita morfološka i imunofenotipska oblika limfoma neovisno o klonalnoj povezanosti ili ne. Nadalje, važno je istaknuti da pojavnost (incidencija) KL-a vjerojatno i nije toliko rijetka, pa ih treba uzeti u obzir pri diferencijalnoj dijagnozi. Sukladno navedenom važno je svaki punktat/biopsiju pažljivo uzorčiti i analizirati s ciljem da se KL ne previdi posebno znajući da biologija pojedinih komponenti tumora nije ista i da terapijski pristup može biti značajno drugačiji.

LITERATURA:

1. Custer RP. Pitfalls int he diagnosis oflymphoma and leukemia from the pathologist's point of view. In: Proceedings of the 2nd National Cancer Conference. New York, NY: American Cancer Society; 1954:554-557.
2. Rappaport H, Winter WJ, Hicks EB. Follicular lymphoma: a re-evaluation of its position int he scehem of malignantlymphoma based on a survey of 253 cases. Cancer 1956;9:792-821.
3. Kim H, Hendrickson R, Dorfman RF. Composite lymphoma. Cancer 1977;40:959-976.
4. Mokhtar NM. Review art icle: composite lymphoma. J Egypt Natl Canc Inst 2007;19:171-175.
5. Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM et al. Clonal evolution of B cells in transformation from low-to high-grade lymphoma. Eur J Immunol 1999;23:1253-1264.
6. Ioachim HL, Medeiros LJ. Ioachimm's Lymph Node Pathology. Composite lymphoma. 4th Edition Lippincott Williams & Wilkins. p: 452-459.
7. Hoppe RT. Histologic variation in non-Hodgkin's lymphomas. Cancer Treat Rep 1981;65:935-939.
8. Rosenquist R, Menestrina F, Lestan M et al. Indications for peripherallight-chain revision and somatic hypermutation without a funtional B-cell receptor in precursors of a composite diffuse large B-cell and Hodgkin's lymphoma. Lab Invest 2004;84:253-261.
9. Schmitz R, Renne C, Rosenquist R et al. Insights into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocation and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin'sand non-Hodgkin's lymphomas. Leukemia 2005;19:1452-1458.
10. Wood GS, Bahler DW, Hoppe Rt et al. Transformation of mycosis fungoides: T-cell receptor beta gene analysis demonstrating a common clonalorigin for plaque-type mycosis fungoides and CD30+ large cell lymphoma. J Invest Dermatol 1993;101:296-300.

Fungal InfectioN Database (FIND) – invazivne aspergiloze: izvješće o upisivanju pacijenata iz hrvatskih centara

Alen Ostojić¹, Njetočka Gredelj Šimec², Viktor

Zatezalo², Radovan Vrhovac^{1,3}

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

² Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolest
KB Merkur

³ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa autora za kontaktiranje:

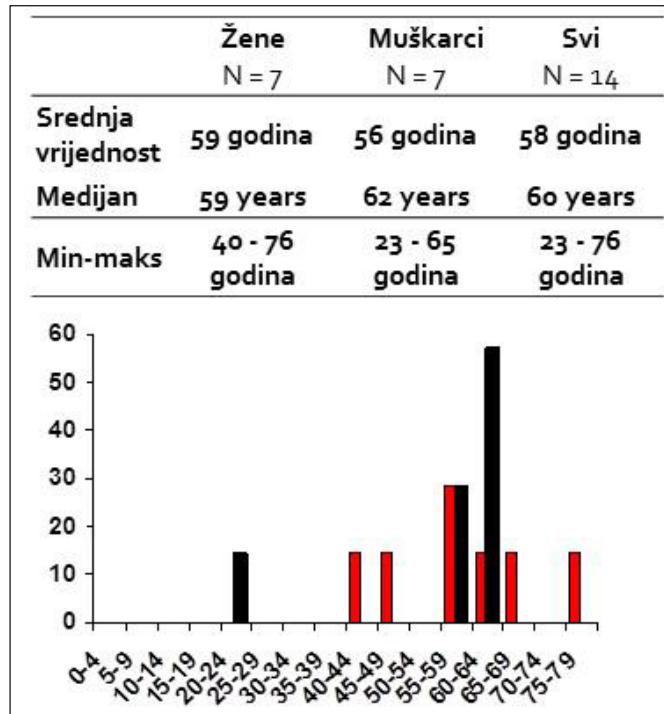
Alen Ostojić, dr. med.

Zavod za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti
KBC Zagreb i Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet

E-pošta: aostonic@kbc-zagreb.hr

Pridruživanjem dvaju hrvatskih centara – KBC Zagreb i KB Merkur – međunarodnom FIND Registrumu invazivnih aspergiloza, u Registar su upisani bolesnici sa zločudnim hematološkim bolestima koji su razvili invazivnu aspergilozu tijekom 2012. godine. Upisano je 14 bolesnika (KBC Zagreb 8, KB Merkur 6) s medijanom dobi pri dijagnozi 60 godina (23-76 godina) (Slika 1.), od kojih je bilo 50% muškaraca.

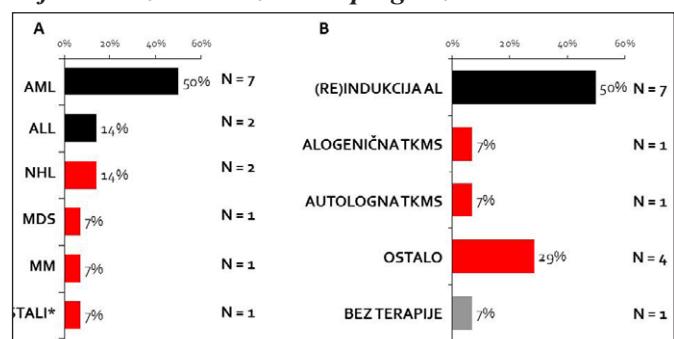
Slika 1. Dob bolesnika pri dijagnozi



Kod 11 bolesnika, s obzirom na snagu dokaza,¹ dijagnosticirana je vjerojatna, a kod 3 bolesnika dokazana invazivna aspergiloza. Većina bolesnika su bili u tijeku liječenja intenzivnom kemoterapijom

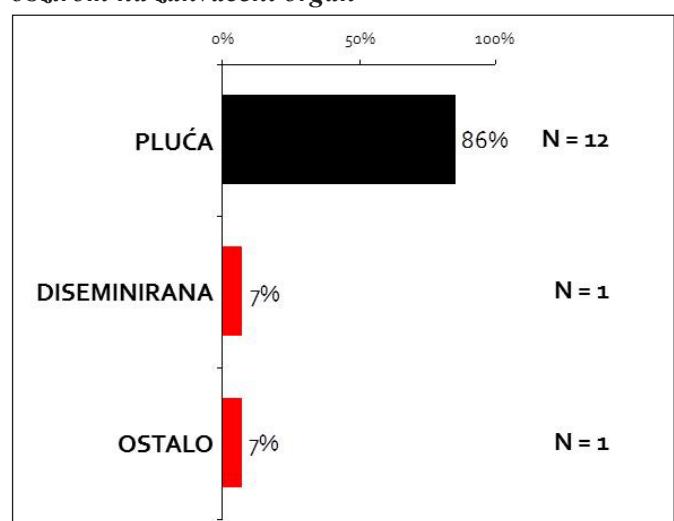
zbog akutne leukemije (Slika 2. A i B), a s obzirom na zahvaćeni organ, uglavnom se radilo o invazivnoj plućnoj aspergilozi (Slika 3.).

Slika 2. Dijagnoze (A) i terapije (B) bolesnika tijekom kojih su razvili invazivnu aspergilozu



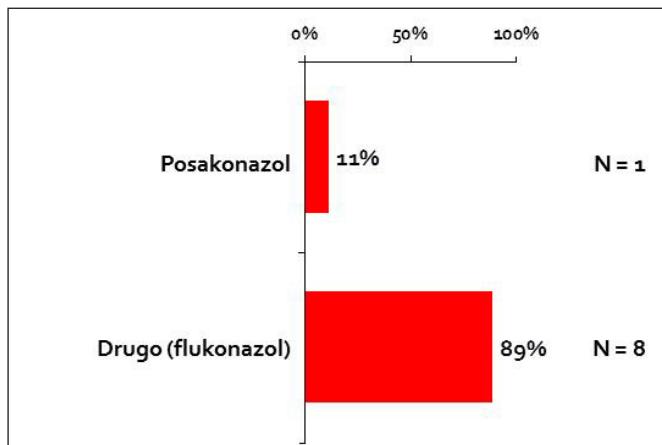
AML – akutna mijeloična leukemija; ALL – akutna limfoblastična leukemija; Ne-Hodgkinov limfom; MDS – mijelodisplastični sindrom; MM – multipli mijelom; AL – akutna leukemija; TKMS – transplantacija krvotvornih maticnih stanica; *jedan bolesnik s imunotrombocitopenijom i autoimunom hemolitičkom anemijom na terapiji kortikosteroidima

Slika 3. Udio kliničkih entiteta invazivne aspergiloze s obzirom na zahvaćeni organ



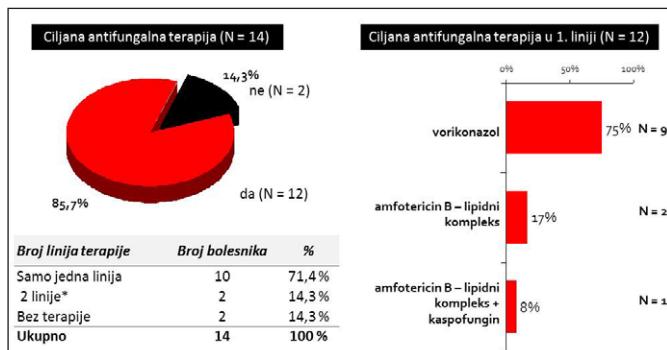
Duboka neutropenija (neutrofili < 0.5 x10⁹/L) u trajanju više od 10 dana bila je čimbenik rizika kod 10 bolesnika, plućna bolesti kod njih troje, terapija kortikosteroidima u trajanju više od 21 dan provođena je kod troje oboljelih, dok je akutna bolest davaatelja protiv primatelja (en. graft versus host disease) zabilježena kod jednog oboljelog. U vrijeme razvoja invazivne aspergiloze, 64.3% bolesnika primalo je antifungalnu profilaksu (Slika 4.), a medijan je vremena od početka primjene antifungalne profilaksse do postavljanja dijagnoze invazivne aspergiloze iznosio 21 dan (7-49 dana).

Slika 4. Antifungalna profilaksa kod oboljelih od invazivne aspergiloze



Empirijska antifungalna terapija primjenjena je kod šest bolesnika (vorikonazol – 6 bolesnika, lipidni kompleks amfotericina B – 1 bolesnik), dok je nakon postavljanja dijagnoze kod njih 12 provedena ciljana antifungalna terapija (Slika 5.).

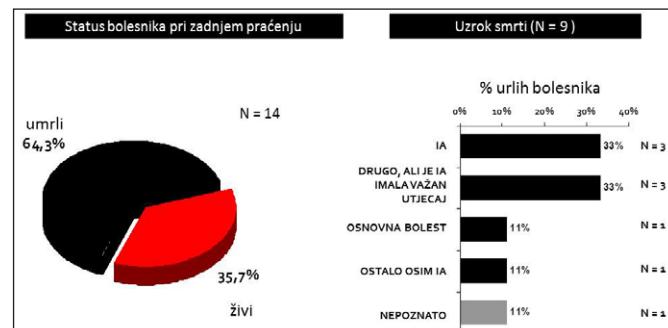
Slika 5. Ciljana antifungalna terapija



U tri bolesnika na provedenu terapiju verificirana je kompletan remisija invazivne aspergiloze, u

četiri bolesnika parcialna remisija, stabilna bolest zabilježena je u njih dvoje, a progresija u pet bolesnika. Nakon medijana praćenja od jednog mjeseca (u trenutku analize, svibanj 2013.), 64% bolesnika je umrlo, pri čemu je potrebno istaknuti kako je u većine njih invazivna aspergiloza bila glavni uzrok smrti ili je znatno pridonijela letalnom ishodu (Slika 6.). U tijeku je registracija bolesnika s postavljenom dijagnozom IA u 2013. godini, te će izvještaj s novo-registriranim bolesnicima biti prikazan na jednom idućih sastanaka KROHEM-a.

Slika 6. Status bolesnika pri zadnjem praćenju (svibanj 2013.)



IA – invazivna aspergiloza

LITERATURA:

- 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*. Jun 15 2008;46(12):1813-1821.

Intervju s dr. Marcom Mielcarekom, hematologom i medicinskim direktorom programa za transplantaciju perifernih matičnih stanica i koštane srži kod odraslih u Seattle Cancer Care Alliance i Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, SAD



Slika 1. Dr. Marco Mielcarek

Razgovarala i pripremila:

Inga Mandac Rogulj, dr. med., specijalist internist-hematolog, Zavod za hematologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

Kad je prije više od 20 godina došao iz Njemačke u istraživački laboratorij kod dr. Beverly Torok-Storb u Fred Hutchinson Cancer Research Center, dr. Marco Mielcarek je planirao provesti dvije godine u istraživanju regulatornih mehanizama u hematopoezi, a onda se vratiti u Njemačku.

Danas je hematolog i medicinski direktor programa za transplantaciju perifernih matičnih stanica i koštane srži kod odraslih u Seattle Cancer Care Alliance i Fred Hutchinson Cancer Research Center.

Dr. Mielcarek, zašto ste se odlučili baviti hematologijom?

Moje zanimanje za hematologiju je počelo još u studentskim danima kad sam svjedočio impresivnim terapijskim uspjesima u nekim hematološkim poremećajima. Pa čak i prije 30-ak godina su brojni bolesnici mogli biti izliječeni. Priroda hematopoetskog i imunološkog sustava je tako kompleksna te nam dopušta da sistematski proučavamo funkcije i brojne poremećaje ovih sastavnica. Možemo reći da je hematopoetski sustav u toj raznolikosti jedinstven, pa nam se otvaraju brojne istraživačke mogućnosti.

Koja su Vaša područja interesa u hematologiji?

Najveći dio svog istraživačkog interesa sam usmjeroio u područje alogenične transplantacije perifernih matičnih stanica i koštane srži. Privuklo me

to područje jer sam našao mogućnosti da radim na poboljšavanju preživljjenja hematoloških bolesnika, osobito nakon alogenične transplantacije, a ujedno sam povezao i moje zanimanje za imunologiju.

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

Postoji nekoliko većih uspjeha u alogeničnoj transplantaciji matičnih stanica.

Prvo, različiti pristupi u potpornoj terapiji su se unazad nekoliko godina značajno poboljšali i tako omogućili i bolje podnošenje samog postupka transplantacije te brži oporavak bolesnika. Na primjer, rutinsko monitoriranje citomegalovirusa (CMV) te pravovremena terapija u slučaju CMV reaktivacije, gotovo su u potpunosti eliminirali često smrtonosnu posttransplantacijsku komplikaciju poput CMV-pneumonije.

Učinak novije generacije antifungika, uz sve manju toksičnost, dodatno je poboljšao posttransplantacijski oporavak bolesnika.

Drugo, poboljšana tehnologija HLA-tipizacije rezultirala je u boljoj podudarnosti donora što je smanjilo mortalitet.

Treće, razvoj brojnih protokola kondicioniranja smanjenog intenziteta, omogućilo je i starijim bolesnicima ili onima s komorbiditetima, da budu kandidati za alogeničnu transplantaciju. Kako je ionako većina hematoloških malignih poremećaja učestali u dobi iznad 60 godina, danas imamo mogućnosti izlječenja alogeničnom transplantacijom i u toj skupini bolesnika.

Koje su najčešće komplikacije alogenične transplantacije i što se može učiniti da se one smanje?

Relaps hematološke bolesti i reakcija presatka protiv primatelja (GVHD) s pridruženim infekcijama, su dvije najvažnije komplikacije koje utječu na uspjeh transplantacije. Nedavno je postalo jasno kako kliničke manifestacije GVHD-a nisu poželjne kako bi se smanjio relaps bolesti; protektivni učinak graft-versus-leukemia učinaka postoji i u slučaju odstupnosti GVHD-a.

Zbog toga je potrebna učinkovitija prevencija i terapija GVHD-a, a u slučaju smanjenja relapsa

bolesti, naučili smo i kako što bolje inkorporirati ciljanu terapiju u protokole kondicioniranja i kako primijeniti optimalnu terapiju održavanja nakon alogenične transplantacije.

Statini ulaze u hematologiju unazad nekoliko godina s obećavajućim rezultatima kod bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom inducirajući apoptozu leukemijskih stanica. Vaše područje interesa odnosi se na primjenu statina u liječenju GVHD-a?

Radimo na nekoliko terapijskih pristupa u sprječavanju akutnog GVHD-a.

Postoje snažni dokazi iz pretkliničkih studija i retrospektivnih kliničkih istraživanja kako primjena statina kod donora može biti povezana sa značajno reduciranim rizikom teškog akutnog GVHD-a kod primatelja.

U našem laboratoriju u Fred Hutchinson Cancer Research Center proučavamo učinak statina na funkciju T-limfocita, ali tako da se ne izazove globalna imunosupresija koja bi povećala rizik od infekcija. Provodimo dva prospektivna klinička istraživanja u kojima se donorima perifernih matičnih stanica kroz 2 tjedna prije sakupljanja matičnih stanica, daje atorvastatin. Ciljevi ovih studija su prevenirati akutni GVHD trećeg i četvrтog stupnja kod primatelja.

Mislite li da je kronični GVHD dobro prepoznat od strane hematologa?

Kronični GVHD sa svojim brojnim komplikacijama, često može biti težak dijagnostički i terapijski izazov hematolozima koji se rutinski ne bave alogeničnom transplantacijom. U našoj klinici, bolesnike otpuštamo kući najčešće oko 3 mjeseca nakon transplantacije, što znači da u tom vremenu preuzimamo cjelokupnu skrb za bolesnika, a naše suradne hematologe educiramo o znakovima i simptomima kroničnog GVHD-a na koje trebaju обратити pozornost.

Naš tim dugoročnog praćenja bolesnika nakon alogenične transplantacije (najčešće do 5 godina nakon transplantacije), omogućuje redovite kontrole bolesnika, ali i pomaže njihovim nadležnim liječnicima s brojnim savjetima i preporukama nakon otpusta bolesnika iz našeg Centra.

Znamo kako neprepoznati i neliječeni kronični GVHD smanjuje kvalitetu života i povećava posttransplantacijski mortalitet.

Stoga je važno da budemo maksimalno posvećeni našim bolesnicima i trudimo se osigurati im najbolje moguće liječenje i njegu nakon transplantacije.

Godišnji sastanak Europske mreže za limfome plaštenih stanica u Dubrovniku

Prof. dr. sc. Igor Aurer

Od 24. do 26. listopada 2013. godine u organizaciji Krohema u Dubrovniku je održan godišnji sastanak Europske mreže za limfome plaštenih stanica (EU MCL Network). Voditelj mreže je prof. dr. Martin Dreyling s Medicinskog fakulteta Sveučilišta Ludwig Maximilian i Sveučilišne bolnice Grosshadern iz Muenchena u Njemačkoj, a organizator s hrvatske strane je bio prof. dr. Igor Aurer.

Europska mreža za limfome plaštenih stanica okuplja najveće europske stručnjake za ovu vrstu bolesti, a u njoj sudjeluju i hrvatski hematolozi i patolozi, članovi Krohema. Sastanak, na kome je sudjelovalo 60 sudionika, hematologa, patologa, stručnjaka za molekularnu biologiju i genetiku iz Europe i Izraela, održan je u prostorijama Interuniverzitetskog centra (IUC) gdje je većina sudionika bila i smještena.

U četvrtak popodne su članovi nekoliko europskih kooperativnih skupina prikazali klinička istraživanja faze I i II koja su u tijeku ili trebaju uskoro započeti. U petak je sastanak počeo prikazom aktualnih kliničkih istraživanja faze III kao i dodatnih analiza već završenih istraživanja. Potom su raspisani planovi za nova klinička istraživanja faze III koja bi u starijih od 65 godina trebala uključivati

dodatak lenalidomida terapiji održavanja rituksimabom, a u mlađih dodatak ibrutiniba standardnoj terapiji. Planirano je da u potonjem istraživanju sudjeluje i Krohem. Popodne su prikazivani rezultati eksperimentalnih i pretkliničkih istraživanja pojedinih centara. U subotu su prikazani rezultati završenih manjih kliničkih istraživanja. Prof. Aurer je prikazao rezultate liječenja bolesnika s limfomom plaštenih stanica iz našeg projekta praćenja bolesnika liječenih rituksimabom tijekom 2007. i 2008. godine.

Hematopatolozi, pod vodstvom Wolfgamga Klappera iz Kiela u Njemačkoj, su imali svoju radionicu na kojem su uspoređivali rezultati korištenja različitih imunohistokemijskih protutijela i varijabilnost u procjeni izraženosti Ki67 i drugih biljega između različitih patologa.

Sastanak je prošao u odličnoj atmosferi, dijelom zbog šarma Interuniverzitetskog centra, lijepog vremena, prekrasnog grada Dubrovnika, a dijelom sigurno i zbog izvrsne organizacije za što je prvenstveno bila zasluzna prim. dr. Sandra Bašić-Kinda. Sažetak sastanka će biti objavljen, najvjerojatnije u časopisu Leukemia & Lymphoma.



Slika 1. Sudionici sastanka u atriju Interuniverzitetskog centra u Dubrovniku.

Kalendar predstojećih hematoloških skupova

Priredila: Vlatka Periša, dr. med.

- **European Focus on Myeloproliferative Neoplasms and Myelodysplastic Syndromes**
Od 02.05 do 04.05.2014. u Češkoj (Prag)
- **18th ESH - EBMT Training Course on Haemopoietic Stem Cell Transplantation**
Od 08.05. do 10.05.2014. u Austriji (Beč)
- **32nd Tutorial on Lymphoid Malignancies (Kiev): Type I Hematology Tutorial: Diagnostic Work-Up of Hematological Diseases, Focus on Lymphoid Malignancies**
Od 16.05 do 17.05.2014. u Ukrajini (Kijev)
- **International Conference on Myelodysplastic Syndromes**
Od 15.05. do 17.05.2014. u Portugalu (Estoril)
- **50th ASCO Annual Meeting**
Od 30.05. do 03.06.2014. u SAD-u Chicago
- **EHA - 19th Congress of the Hematology Association**
Od 12.06. do 15.06.2014. u Italiji (Milano)
- **THD-EHA-ESH Tutorial on Consultive Hematology – Case based**
Od 28.06 do 29.06.2014. u Turskoj (Van)
- **16th Annual John Goldman Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy**
Od 04.09. do 07.09.2014. u SAD-u (Philadelphia)
- **Multiple Myeloma – Translational Research**
Od 05.09. do 07.09.2014. u Španjolskoj (Barcelona)
- **3rd World Congress on Controversies in Hematology (COHEM)**
Od 11.09. do 13.09.2014. u Istanbulu (Turska)
- **ESH-EHA 33rd Tutorial on Thrombosis, Hemostasis and Iron**
Od 12.09. do 14.09.2014. u Estoniji (Tallin)
- **ISHBT-EHA-ESH Tutorial on Lymphoid Malignancies**
Od 26.09. do 28.09.2014. u Indiji (Kolkata)
- **ELN Frontiers Meeting 2014**
Od 16.10 do 19.10.2014. u Njemačkoj (Berlin)
- **6th International Conference on Myeloproliferative Neoplasms**
Od 23.10. do 25.10.2014. u Portugalu (Estoril)
- **Lymphoma & Myeloma 2014: An International Congress on Hematologic Malignancies**
Od 23.10. do 25.10.2014. u SAD-u (New York)
- **2nd International Conference on Multiple Myeloma**
Od 07.11. do 09.11.2014. u Grčkoj (Atena)
- **International Conference on New concepts in B Cell Malignancies: From molecular pathogenesis to personalized treatment**
Od 14.11. do 16.11.2014. u Grčkoj (Thessaloniki)
- **56th ASH Annual Meeting and Exposition**
Od 06.12 do 09.12. 2014. u SAD-u (San Francisco).

