

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM



Volumen 7., Broj 1.

KroHem

Impresum

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM

Volumen 7., Broj 1., Travanj 2015.

Nakladnik:

Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM

Za nakladnika:

Damir Nemet

Glavni urednik:

Dražen Pulanić

Tajnica Uredništva:

Lana Desnica

Uredništvo:

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

Tajnica KROHEM-a:

Dijana Perčin

Autori tekstova:

Radmila Ajduković-Stojisavljević

Gorana Aralica

Emina Babarović

Drago Batinić

Josipa Belev

Ines Bojanić

Ernest Bilić

Ervina Bilić

Kristina Crkvenac Gornik

Romana Čeović

Diana Dautović

Lana Desnica

Antica Duletić-Načinović

Nadira Duraković

Davorka Dušek

Ranka Femenić

Magdalena Grce

Ita Hadžisejdic

Sanda Huljev Frković

Ozren Jakšić

Nives Jonjić

Tajana Klepac Pulanić

Igor Komljenović

Josip Konja

Rajko Kušec

Boris Labar

Marija Livajić

Ksenija Lučin

Dina Ljubas Kelečić

Inga Mandac Rogulj

Marko Martinović

Nikolina Matić

Toni Matić

Sanja Mazić

Morana Mikloš

Zdravko Mitrović

Marinka Mravak-Stipetić

Damir Nemet

Alen Ostojić

Steven Živko Pavletić

Maja Pavlović

Vlatko Pejša

Zinaida Perić

Vlatka Periša

Igor Petriček

Iva Ozana Prah

Ema Prenc

Dražen Pulanić

Ljubica Rajić

Jelena Roganović

Zrinko Salek

Ranka Serventi-Seiwerth

Anita Škrtić

Sanja Štifter

Tajana Štoos-Veić

Čedna Tomasović-Lončarić

Ivana Tonković Đurišević

Toni Valković

Radovan Vrhovac

Tamara Vukić

Renata Zadro

Neno Zovko

Silva Zupančić Šalek

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 naslovnicu:

Krvarenja u bolesnika s nasljednom i stečenom hemofilijom, te hemofilijska artropatija u nasljednoj hemofiliji.

Ustupljeno i priređeno ljubaznošću **Josipe Belev**, bacc. med. techn., i dr. sc. **Zinaide Perić**, dr. med.,

Odjel za hemostazu i trombozu, te benigne bolesti krvotvornog sustava, Zavod za hematologiju,

Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb.

Sadržaj

Damir Nemet:	
Uvodnik	3
Nives Jonjić, Toni Valković, Sanja Štifter, Emina Babarović, Ita Hadžisejdić, Marija Livajić, Ksenija Lučin, Antica Duletić-Načinović:	
Važnost mikrookoliša koštane srži u terapiji multiplog mijeloma	5
Ernest Bilić, Zrinko Šalek, Ranka Femenić, Josip Konja, Alen Ostojić, Maja Pavlović, Toni Matić, Ljubica Rajić:	
Terapija ne-Hodgkinovih limfoma u djece pomoću monoklonskih protutijela	8
Jelena Roganović:	
Chediak-Higashi sindrom	12
Zdravko Mitrović, Igor Komljenović, Diana Dautović, Vlatko Pejša:	
Periferno uveden centralni venski kateter (PICC) – prednosti, nedostaci, komplikacije i preporuke za njihovo zbrinjavanje	15
Tajana Štoos-Veić, Anita Škrtić, Radmila Ajduković-Stojisavljević, Ozren Jakšić, Cedna Tomasović-Lončarić, Gorana Aralica, Rajko Kušec:	
Istovremena pojava mijeloproliferativne i limfoproliferativne neoplazme: prikaz pacijenta i kratki pregled dosad poznatog	17
Inga Mandac Rogulj:	
Čimbenici rasta granulocita u mijelodisplastičnom sindromu	20
Marko Martinović:	
Primjena eritropoetina u mijelodisplastičnom sindromu	24
Neno Zovko, Inga Mandac Rogulj:	
Azacitidin u liječenju mijelodisplastičnog sindroma	27
Renata Zadro:	
EUREKA	31
Lana Desnica, Dražen Pulanić, Ranka Serventi-Seiwerth, Marinka Mravak-Stipetić, Ervina Bilić, Romana Čeović, Nikolina Matić, Ljubica Rajić, Ernest Bilić, Nadira Duraković, Zinaida Perić, Tajana Klepac Pulanić, Igor Petriček, Dina Ljubas Kelečić, Tamara Vukić, Davorka Dušek, Ines Bojanić, Sanja Mazić, Ema Prenc, Iva Ozana Prah, Magdalena Grce, Drago Batinić, Renata Zadro, Radovan Vrhovac, Steven Živko Pavletić, Damir Nemet:	
Daljnji napredak multidisciplinarnog tima za liječenje kronične bolesti presatka protiv primatelja i kasnih komplikacija nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica u KBC Zagreb	33
Silva Zupančić Šalek:	
Paroksizmalna noćna hemoglobinurija je stečena trombofilija: prikaz slučaja	37
Kristina Crkvenac Gornik, Morana Mikloš, Sanda Huljev Frković, Ivana Tonković Đurišević, Ernest Bilić, Silva Zupančić Šalek:	
Određivanje inverzije introna 22 i introna 1 u genu za faktor zgrušavanja VIII kod pacijenata s teškim oblikom hemofilije A	40
Josipa Belev:	
Uloga medicinske sestre u sveobuhvatnoj skrbi bolesnika s hemofilijom	43

Boris Labar:

Koliko je KROHEM utjecao na znanstvenu produkciju u hrvatskoj hematologiji? 46

Osnivački sastanak Limfomske radne skupine Europskog hematološkog društva 47

Vlatka Periša:

Kalendar predstojećih hematoloških skupova 48

Povjerenstvo za stručno usavršavanje članova KROHEM-a 49

Pravilnik o stručnom usavršavanju članova KROHEM-a 50

Zahtjev za podmirenje troškova stručnog usavršavanja člana KROHEM-a 51

Izvješće člana KROHEM-a o provedenom stručnom usavršavanju 52

Bilješke 53

Uvodnik

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

Bilten nastavlja izlaziti, no i dalje se sadržaj i prilozi skupljaju dosta dugo i uz brojne pozive urednika doc. dr. Dražena Pulanića. Pred nama je novi sastanak KROHEM-a koji će se održati na Plitvicama, destinaciji koju smo dugo pokušavali realizirati, no zbog zauzetosti hotela to do sada nije uspijevalo. Očekujem da će sastanak biti kvalitetan kao i prethodni, pa vas pozivam da nakon sastanka svoje prezentacije i razmišljanja sročite u tekst i pošaljete za objavljivanje u sljedeći broj Biltena.

Od sastanka do sastanka KROHEM se razvija i napreduje s novim administrativnim i stručnim rješenjima i aktivnostima. Završen je registar članova KROHEM-a koji pored podataka koji služe za komunikaciju među članovima sadrži i evidenciju aktivnosti članova. S obzirom na značajne prednosti koje uživaju članovi KROHEM-a kao što je organizacija stručnih putovanja, stručno usavršavanje, besplatno sudjelovanje na proljetnom i jesenskom sastanku KROHEM-a očekuje se da će članovi ispunjavati i svoje obveze koje su dio našeg zajedničkog npora i ideje da KROHEM služi napretku hrvatske hematologije, edukaciji članova i ujednačavanju pristupa liječenju hematoloških bolesti u svim regijama podjednako s krajnjim ciljem poboljšanja rezultata liječenja naših bolesnika. Zato molim sve članove KROHEM-a da dopune svoje podatke u Registrusu članova, te redovito dopisuju svoje aktivnosti kako bi se pri godišnjoj reviziji članstva mogla evaluirati aktivnost svakoga člana. U zadnje vrijeme postoji izraziti trend povećanja broja članova što govori o kvaliteti rada KROHEM-a i privlačnosti njegovog programa i aktivnosti za sve, a pogotovo mlade članove. Nadamo se da će ovo značajno povećanje broja članova rezultirati i značajnim povećanjem aktivnosti KROHEM-a kako u smislu ispunjavanja registra KROHEM-a, tako i u realizaciji novih epidemioloških i opservacijskih, a u budućnosti nadamo se i intervencijskih studija. Isto tako vjerujem da to donosi novu kvalitetu i u smislu povećanja publicističke aktivnosti KROHEM-a. Ove godine objavljeno je nekoliko priopćenja u obliku postera s rezultatima KROHEM-a i to jedan iz Skupine za hemostazu i trombozu i dva iz Skupine za limfome. Vjerujemo

da će prezentirani rezultati biti uskoro formirani i u publikaciju u stručnoj/znanstvenoj literaturi.

Također je značajna aktivnost postignuta u projektu o kroničnom GVHD-u, u kojem je KROHEM ravnopravna suradna ustanova. GVHD projekt je s timom od oko 25 članova iznimno aktivan u znanstvenom radu i realizaciji postignutih ciljeva, organizirana je baza podataka bolesnika s GVHD-om, do sada je na međunarodnim skupovima objavljeno 8 radova koji su prezentirani u obliku postera, a samo na kongresu EBMT 2015. prihvaćeno je još 6 novih radova koji su prikazani u obliku postera. Krajem svibnja ove godine organizira se 2. simpozij „cGVHD and late complications after stem cell transplantation“ u Zagrebu koji će ponovno, kao i prvi simpozij u studenom 2013. g., okupiti najznačajnije stručnjake tog područja iz Europe i SAD-a, gdje će i članovi zagrebačkog tima prikazati dosadašnja postignuća i rezultate. U okviru postojećeg GVHD projekta prijavljen je novi projekt na europski natječaj Horizon 2020. Prijedlog našeg projekta prošao je prvi krug recenzije (u što ulazi manje od 10% prijava), te je u fazi izrade kompletног prijedloga projekta. U ovom novom projektnom prijedlogu objedinjeno je 12 najprestižnijih svjetskih centara za ovo područje iz Europe i SAD. Radi se o iznimno zahtjevnom potpunu, ali potencijalno velikog značenja, ne samo zato što financiranje takvog projekta iznosi oko 6 milijuna EUR nego i zato što je to izvanredna prilika za povezivanje zagrebačkih centara s najboljim centrima u svijetu.

Krajem prošle godine na jesenskom sastanku KROHEM-a u Osijeku usvojen je Pravilnik o stručnom usavršavanju članova KROHEM-a koji je regulirao sponzoriranje edukacije od strane farmaceutskih kompanija i Povjerenstvu za stručno usavršavanje KROHEM-a dao zaduženje da regulira stručno usavršavanje članova. Sve informacije o tome dobili ste putem elektroničke pošte, a Pravilnik i obrasce za prijavu stručnog usavršavanja kao i za izvješća možete naći na web stranici KROHEM-a, kao i u ovom broju Biltena.

Ove godine je po prvi puta KROHEM svojim sredstvima omogućio stručno usavršavanje svojih članova: jednom članu dva mjeseca usavršavanja u

Beču, nekolicini članova kraća putovanja na kongrese, a za 25 mlađih članova platio troškove sudjelovanja na kongresu o MPN/MDS koji se održava krajem travnja u Zagrebu.

Registri hematoloških bolesti KROHEM-a u koje su uložena značajna finansijska sredstva su gotovo svi završeni i spremni za unošenje podataka, većina već unazad godinu dana. Rezultati ovog projekta ovise sada isključivo o aktivnosti članova i upisivanju podataka o bolesnicima iz svih centara u Hrvatskoj. Zato pozivam sve kolege da se maksimalno angažiraju u ovom projektu, stariji kolege u organizaciji prikupljanja podataka i stimuliranju mlađih članova, a mlađe članove u korektnom upisivanju podataka u registre. Osim edukacijske, stručne i znanstvene koristi mlađi kolege će radom u Registru i opravdati svoje članstvo u KROHEM-u.

Većina radnih skupina KROHEM-a su vrlo aktivne i rezultati njihovog rada vide se kroz podizanje kvalitete zbrinjavanja hematoloških bolesnika u Hrvatskoj, no mislimo da tu još uvijek treba učiniti više. Česti problem je opterećenje liječnika hematologa spoznajom o troškovima pojedinih vrsta liječenja u odnosu na tzv. limite koje nameće uprave bolnica. Naravno da svaki liječnik i kao građanin ima odgovornost uvažavati opće stanje u zemlji i prihvati potrebu racionalizacije troškova liječenja bolesnika te se u tom smislu ponašati odgovorno. Međutim, treba na svaki način izbjegći da se odnos osiguranika i HZZO-a kao osiguravatelja prebacuje na odnos liječnika i bolesnika. Ovakva zamje-

na odnosa koja nam se često agresivno nameće od administracije, pa ponekad i od medija i drugih (a u praksi se vidi da često i uspijeva) nije u skladu s liječničkom etikom. Svjesni smo da se to događa, pa čak imamo dojam da se radi o sustavnom namjernom procesu kako bi se uključivanjem liječnika u taj odnos na neki način problem ograničenih mogućnosti u zdravstvu prebacio na leđa liječnika i prikazao kako su restriktivne odluke rezultat stava liječnika. Vjerojatno zbog toga primjećujemo da se neki, u stručnim krugovima dogovoreni dijagnostički i terapijski standardi i algoritmi, ne primjenjuju u potpunosti te da u različitim centrima bolesnici još uvijek nemaju iste mogućnosti.

Vrlo korisna je suradnja s udrugama bolesnika, te se jedan dio ovih i ovakvih problema može rješavati i zajedničkom akcijom struke i bolesničkih udruga.

Organizacija i rad KROHEM-a prepoznati su i u drugim stručnim krugovima i među farmaceutskim firmama kao poželjan model funkcioniranja te stoga KROHEM i hrvatski hematolozi uživaju značajan ugled. To treba biti poticaj i putokaz da se ne samo nastavi na ovaj način, nego da se razvijaju novi modeli rada, veća aktivnost radnih skupina, organiziranje novih zajedničkih projekata te da se ojača suradnja s drugim stručnim i znanstvenim udrugama u inozemstvu.

Prof. dr. sc. Damir Nemet, dr. med.
predsjednik KROHEM-a

Važnost mikrookoliša koštane srži u terapiji multiplog mijeloma

Nives Jonjić, Toni Valković, Sanja Štifter,
Emina Babarović, Ita Hadžisejdić, Marija Livajić,
Ksenija Lučin, Antica Duletić-Načinović

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Nives Jonjić, dr. med.

Zavod za patologiju

Klinički bolnički centar Rijeka i
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: nives@medri.hr

Multipli mijelom (MM) je maligna hematološka bolest porijekla B stanica koja čini oko 1 % svih malignih oboljenja odnosno oko 10-15 % svih hematoloških neoplazmi. Bolest većinom zahvaća starije osobe i udružena je brojnim kliničkim i laboratorijskim manifestacijama uključujući prisutnost monoklonalnog proteina u serumu i/ili urinu, osteolitičke lezije, oštećenje bubrega, anemiju, rekurentne infekcije, neuropatiju i hiperkalcemiju (1,2).

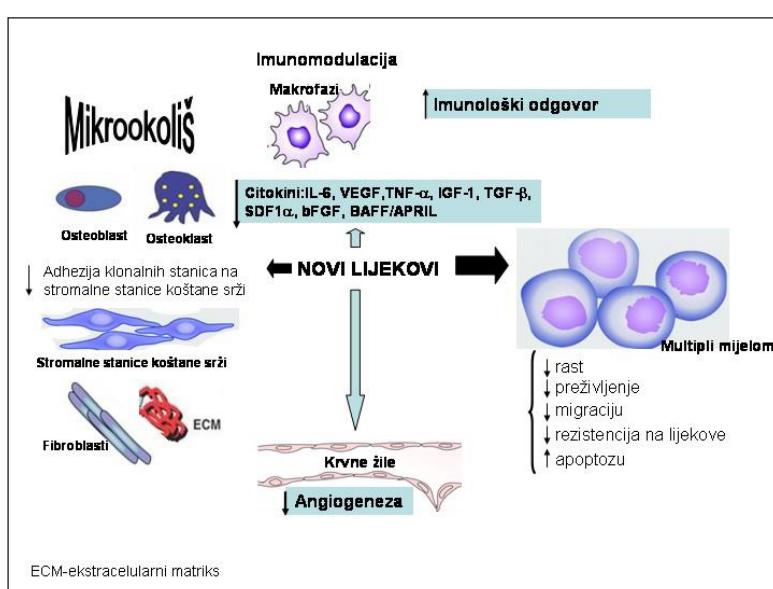
Više od 40 godina kortikosteroidi (deksametazon) i konvencionalna kemoterapija (melfalan i prednison te vinkristin, doksorubicin i deksametazon) bili su osnova terapije MM-a. Autologna transplantacija matičnih stanica (ATMS), kao pionir u terapiji MM-a započela je 1980. godine i od tada je dobro etablimana kao metoda koja je značajno unaprijedila liječenje pojedinih bolesnika. Posljednjih desetak godina, uvođenjem imunomodulatora (talidomid i lenalidomid) kao i inhibitora proteasoma (bortezomib), ishod terapije je značajno promijenjen. Preživljavanje se udvostručio s 3-4 na 6-7 godina, kako za bolesnike koji nisu podobni za ATMS, tako i za one koji su primili visoke doze terapije i ATMS. Međutim, u većine bo-

lesnika, nakon početnog dobrog odgovora na liječenje, dolazi do relapsa, a tijekom vremena razvija se i rezistencija na lijekove (3). Stoga, usprkos poboljšanju preživljavanja MM i dalje ostaje neizlječiva bolest.

MM je citogenetski i molekularno heterogena bolest s brojnim genetskim nestabilnostima od kojih su neke specifične i mogu se povezati s kliničkom prezentacijom i prognozom (4). Razvoj prema učinkovitijoj terapiji zahtjeva detaljno poznavanje raznih genetskih i signalnih putova koji su odgovorni za mijelomagenezu. Važno je identificirati efektivne citogenetske i molekularne markere koji mogu predviđjeti terapijski učinak i/ili prognozu obzirom na veliku korist koji imaju bolesnici (5).

Postojeća konvencionalna kemoterapija i/ili kemoterapija visokim dozama, usmjerena isključivo na mijelomske stanice, postiže samo ograničen uspjeh, čime se naglašava važnost razumijevanja uloge mikrookoliša koštane srži i njegovog specifičnog doprinosa mijelomagenezi (6). Mikrookoliš MM-a sastoji se od klonalnih plazma stanica, proteina vanstaničnog matriksa, stromalnih stanica koštane srži, upalnih stanica i krvnih žila. Postoje čvrsti dokazi da interakcija između tih komponenti igra ključnu ulogu u preživljavanju i dijeljenju mijelomske stanice, stjecanju rezistencije na lijekove i napredovanju bolesti (7).

U ovom kratkom preglednom članku osvrnut ćemo se samo na dva značajna čimbenika mikrookoliša koštane srži, angiogenezu i makrofage koštane srži (MKS), koja su ujedno i prijedlog istraživanja u okviru zajedničkih projekata, s posebnim naglaskom na mogućnost njihova ciljanja u terapiji bolesnika s MM-om (Slika 1.).



Slika 1. Mehanizam djelovanja lijekova na tumorske stanice i mikrookoliš koštane srži u liječenju bolesnika s multiplim mijelomom.

Angiogeneza i VEGF u multiplom mijelomu

Uloga angiogeneze u rastu, progresiji i metastatskom širenju solidnih tumora dobro je prepoznata. Progresija bolesti koja korelira sa stupnjem angiogeneze također je utvrđena u nekoliko malignih hematoloških novotvorina kao što su to ne-Hodgkinov limfom, akutna limfoblastična leukemija, B-kronična limfocitna leukemija, akutna mijeloična leukemija i MM. U progresiji MM-a posebno je ta uloga izražena (8,9).

Ključni posrednici angiogeneze su različiti faktori rasta koji pripadaju obitelji faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF, PIGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D). VEGF luči nekoliko staničnih linija MM, a nalazi se i u plazmi bolesnika s MM-om (10). VEGF se pojačano stvara i u MM, a njegova povećana razina vjerojatno je udružena s aktivnošću bolesti. VEGFR-1 se eksprimira na MM stanicama što ukazuje na mogućnost autokrinog signaliranja. VEGF potiče nekoliko funkcija mijelomske stanice kao npr. njihovu migraciju duž fibronektina (caveolin-1/PI3K/PKCa-ovisnom kaskadom), preživljavanje ("up-regulacijom" Mcl-1 i survivina) i proliferaciju (posredovana MEK/ERK putem) (8). Osim na stanice MM-a i endotel, VEGF također djeluje na osteoblaste, NK stanice, monocyte i prekursore endotelnih stanica (11).

Upotreba talidomida u terapiji MM-a upravo se bazirala na anti-angiogenom učinku kao što se to prepisuje i ostalim imunomodulatornim lijekovima. Terapija dovodi do ukidanja sekrecije IL-6 i VEGF-a. Također, potiče apoptozu, zaustavljanje stanica u G1 fazi staničnog ciklusa i autolognu anti-MM imunost posredovanu NK-stanicama.

Bortezomib, inhibitor proteasoma uz brojne učinke djelovanja na samu mijelomsku stanicu (blokiranja aktivacije NF- κ B; indukcija apoptoze mijelomske stanice koje su rezistentne na deksamethason, alkilirajuće agense, antracikline) također smanjuje i sekreciju VEGF-om, a time i njime posredovanu angiogenezu. Anti-angiogeni učinak bortezomiba potvrđen je na animalnom i humanom modelu. Bortezomib inhibira kemotaksiju i adheziju endotelnih stanica iz mijelomskog mikrookoliša u funkcionalnim testovima angiogeneze. Mehanizam anti-angiogenog djelovanja udružen je i s inhibicijom sekrecije VEGF i IL-6 iz endotelnih stanica (12). Također, ovisno o dozi, inhibira rast mezenhimalnih matičnih stanica kao i njihovu produkciju angiogenih faktora uključujući VEGF, HGF i bFGF (13).

Najuspješnija anti-angiogena terapija u solidnim tumorima se postiže primjenom humaniziranih pro-

tutijela protiv VEGF, bevacizumaba (Avastin), posebno u kombinaciji s kemoterapijom. Kod MM-a u tijeku je nekoliko studija s primjenom bevacizumaba u kombinaciji s drugim lijekovima kod refraktornih bolesnika i u relapsu (14). Također, u fazi testiranja kao terapija održavanja nakon transplantacije su i druge ciljne molekule kao inhibitori VEGF-receptora tirozin kinaznog puta (7).

Makrofazi koštane srži u multiplom mijelomu

MKS važan su dio mikrookoliša s neposrednim utjecajem na rast tumorskih stanica, neoangiogenezu i remodeliranje vanstaničnog matriksa. Tumorski mikrookoliš općenito snažno utječe na sazrijevanje i diferencijaciju makrofaga u dva različito polarizirana stanja: u klasično aktivirane M1 makrofage koje mogu uništiti tumorske stanice, a proizvode i pro-upalne te anti-angiogene citokine, IL-12, CXCL9 i CXCL10, i alternativno aktivirane M2 makrofage koji podržavaju rast, invaziju, migraciju i metastaziranje, stvaranjem brojnih pro-angiogenih i imunosupresivnih faktora rasta, uključujući EGF, TGF- β i članove FGF i VEGF obitelji (15,16). Općenito, smatra se da makrofazi pridruženi tumoru pokazuju M2 fenotip (17), iako nije jasno da li se to može primijeniti općenito, na različite vrste tumora.

MKS mogu doprinijeti preživljavanju mijelomske stanica i razvijanju rezistencije na liječenje kemoterapijom *in vivo* (18). Istraživanja pokazuju da bi MKS mogli biti dobar prognostički histopatološki pokazatelj u novodijagnosticiranih bolesnika s MM-om, budući da prisutnost ovih stanica (CD68+/CD163+) uz veliku gustoću krvnih žila u koštanoj srži imaju negativan utjecaj na ukupno preživljavanje bolesnika (19). Osim već spomenute uloge u imunosupresiji, promociji tumorske angiogeneze i metastaziranju solubilni CD163 je nedavno potvrđen kao prognostički marker u bolesnika s MM-om (20).

Ostaje za istražiti potencijal makrofaga u terapiji MM-a, bilo blokiranjem M1/M2 polarizacije ili pak indukcijom apoptoze makrofaga, ili nekim drugim mehanizmima. Tako je nedavno opisan učinak gambogične kiseline (GA), inhibitora CXCR4 ekspresije, u supresiji osteoklastogeneze posredovane stanicama MM. Naime, GA putem RANKL-a blokira diferencijaciju makrofaga u osteoklaste (21).

Literatura

1. Mahindra A, Hideshima T, Anderson KC. Multiple myeloma: biology of the disease. *Blood Rev* 2010;24:5-11.
2. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011;364: 1046-1060.
3. Kumar SK, Bensinger WI, Zimmerman TM, Reeder CB, Berenson JR. Phase 1 study of weekly dosing with the investigational oral proteasome inhibitor ixazomib in relapsed/refractory multiple myeloma'. *Blood* 2014;124:1047-1055.
4. Chesi M, Bergsagel PL. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol* 2013;97:313-323.
5. Bazzi M, Badros A. Multiple myeloma, implementing signalling pathways and molecular biologyin clinical trials. *Cancer Biology & Therapy* 2010;10:830-838.
6. Balkumaran A, Robey PG, Fedarko N, Landgren O. Bone marrow microenviroment in myelomagenesis: its potential role in early diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:465-480.
7. Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009;23(1):10-24.
8. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005;105:1383-1395.
9. Ria R, Reale A, De Luisi A, Ferrucci A, Moschetta M. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Am J Blood Res* 2011;1:76-89.
10. Valković T, Babarović E, Lučin K, Štifter S, Aralica M, Pećanić S, Seili-Bekafigo I, Duletić-Načinović A, Nemet D, Jonjić N. Plasma levels of osteopontin and vascular endothelial growth factor in association with clinical features and parameters of tumor burden in patients with multiple myeloma. *Biomed Res Int* 2014;vol. 513170.
11. Medinger M, Fischer N, Tzankov A. Vascular endothelial growth factor-related pathways in hemato-lymphoid malignancies. *J Oncol* 2010;729725
12. Roccaro AM, Hideshima T, Raje N. et al. Bortezomib mediates antiangiogenesis in mutiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer Res* 2006;66:184-191.
13. Wang X, Zhang Z, Yao C. Bortezomib inhibits the angiogenesis mediated by mesenchymal stem cells. *Cancer Invest* 2012;30:657-62.
14. Faiman B, Richards T. Innovative agents in multiple myeloma. *J Adv Pract Oncol* 2014;5:193-202.
15. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454: 436-444.
16. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549-555.
17. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42:717-727.
18. Kim J, Denu RA, Dollar BA et al. Macrophages and mesenchimal stromal cells support survival and proliferation of multiple myeloma cell. *Br J Haematol* 2012;158:336-46.
19. Suyani E, Sucak GT, Akyürek N, Sahin S, Baysal NA. Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter in multiple myeloma', *Ann Hematol* 2013;92:669-677.
20. Andersen MN, Abildgaard N, Maniecki MB, Møller HJ, Andersen NF. Monocyte/macrophage-derived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2014;93:41-47.
21. Pandey MK, Kale VP, Song C, Sung SS, Sharma AK, Talamo G, Dovat S, Amin SG. Gambogic acid inhibits multiple myeloma mediated osteoclastogenesis through suppression of chemokine receptor CXCR4 signaling pathways. *Exp Hematol* 2014;14.pii: S0301-472X(14)00530-X. doi: 10.1016/j.exphem.2014.07.261.

Terapija ne-Hodgkinovih limfoma u djece pomoću monoklonskih protutijela

**Ernest Bilić, Zrinko Šalek, Ranka Femenić,
Josip Konja, Alen Ostojić, Maja Pavlović,
Toni Matić, Ljubica Rajić**

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Ernest Bilić, dr. med.

Klinika za pedijatriju

Klinički bolnički centar Zagreb i

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: ernest.bilic@zg.t-com.hr

Uvod

Limfomi su treća najčešća maligna bolest djece nakon akutnih leukemija i tumora mozga. Ne-Hodgkinov limfom (NHL) čini 8-10% malignih bolesti u djece u dobi između 5 i 19 godina.

U liječenju NHL-a u djece najčešće se primjenjuje kombinirana ciklička kemoterapija. U svijetu postoje različiti protokoli liječenja. Naš centar koristi protokole izvorno nastale u Njemačkoj, NHL-BFM protokole (NHL-BFM 90, NHL-BFM 95), ALL BFM IC 2009 HR i EURO-LB 02.

U odraslih bolesnika rituksimab se uspješno primjenjuje u liječenju svih B-staničnih limfoma (1). Randomizirana, kontrolirana klinička ispitivanja s većim brojem ispitanika o primjeni rituksimaba uz standardne kemoterapijske protokole kod djece nisu do sada publicirani. U literaturi postoje prikazi slučaja i prikazi serija. U ovom radu prikazujemo naše rezultate u liječenju B-NHL-a u djece s i bez rituximaba.

Ispitanici i metode

Cilj rada je utvrditi ukupno preživljjenje djece oboljele od B staničnog ne-Hodgkinovog limfoma liječenih u Zavodu za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb u razdoblju od 1998. do 2012. godine.

Osim toga, cilj istraživanja bio je utvrditi razliku u preživljjenju pacijenata sa stadijima bolesti I i II u usporedbi s onima stadija III i IV. Jedan od glavnih ciljeva ovog rada bio je odrediti utjecaj pridruživanja rituksimaba standardnim kemoterapijskim protokolima na preživljjenje oboljele djece, te je li razlika u preživljjenju u onih kojima je protokolu pridružen rituksimab statistički značajna u usporedbi s djecom liječenom samo uobičajenim kemoterapijskim protokolima.

U istraživanje je uključeno 36 djece, u dobi od 3 do 17 godina, oboljelih od B staničnog ne-Hodgkinovog limfoma. Od ukupnog broja djece 8 je bilo djevojčica, a 28 dječaka. U skupini iznad 10 godina bilo je 17 djece, a u onoj do 10 godina (uključujući i 10 godina) ih je bilo 19. Sva djeca liječena su nekim od uobičajenih protokola, a to su NHL-BFM 90, NHL-BFM 95, ALL BFM IC 2009 HR i EURO-LB 02.

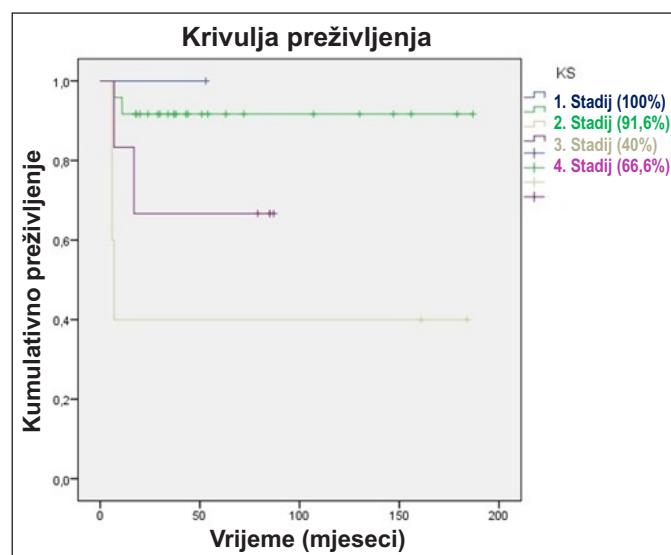
Rezultati

U ovom ispitivanju praćeno je 36 djece oboljele od B-NHL-a. Preživjelo je 29 djece što znači da je ukupno preživljjenje 80,6 %.

Usporedbom preživljjenja djece oboljele od B-NHL-a prema spolovima utvrđeno je bolje preživljjenje ženskog spola - 87,5% naspram muškog - 78,6%, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost.

Rezultati preživljjenja sukladno kliničkom stadiju pokazuju da je u skupini oboljele djece stadija I najbolje preživljjenje, a u skupini pacijenata stadija III najlošije. Usporedbom preživljjenje stadija II i III postignuta je statistički značajna razlika u preživljjenju u korist djece stadija II, naspram onih stadija III ($p = 0,001$).

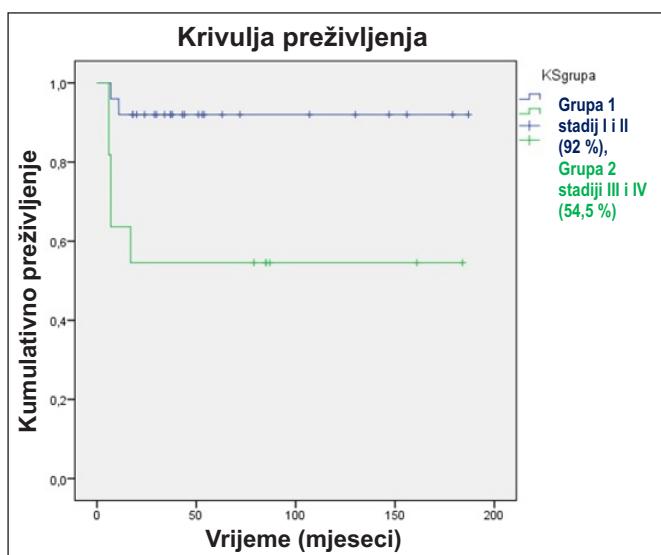
Raspodjelu preživljjenja prema stadijima pokazuje Slika 1.



Slika 1. Preživljjenje djece s B-NHL-om prema kliničkom stadiju bolesti (KS = klinički stadij).

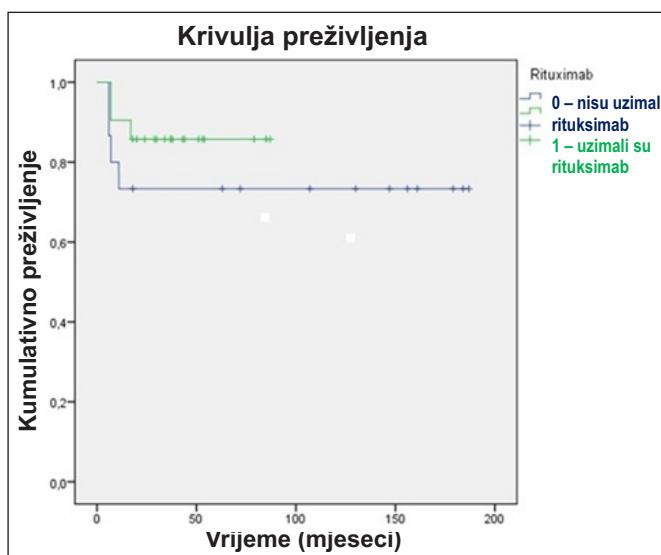
Pregledniji rezultati dobiveni su razvrstavanjem djece stadija I i II u grupu 1, te stadija III i IV u grupu 2. Pri tome je razlika u preživljjenju očekivano

znatno bolja u nižim stadijima bolesti – čak 92,0 %, dok je u onih stadija III i IV samo 54,5 %. Dobiveni rezultati pokazuju statističku značajnost ($p = 0,006$) i prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Preživljenje djece s B-NHL-om razvrstanih prema kliničkom stadiju u grupu 1 – stadij I i II, i u grupu 2 – stadiji III i IV.

Rezultati su pokazali da djeca koja su uz standarde kemoterapijske protokole uzimala rituksimab imaju bolje preživljenje od onih koja nisu i to 85,7 % naspram 73,3 %. To je prikazano Slikom 3.



Slika 3. Preživljenje djece s B-NHL razvrstanih prema tome jesu li uz standardne kemoterapijske protokole uzimala rituksimab ili ne (0 – nisu uzimali rituksimab, 1 – uzimali su rituksimab).

Rezultati preživljjenja djece jesu, odnosno nisu, uzimala rituksimab uz standarde kemoterapijske protokole, prema dobnim skupinama, pokazuju da najbolje preživljenje imaju djeca koja su uzi-

mala rituksimab, a starija su od 10 godina (90 %), dok je najslabije preživljenje u onih koja nisu uzimala rituksimab, a stara su manje od 10 godina (62,5 %). Navedeni podaci prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Tablica pokazuje razliku u preživljjenju djece koja se uzimala rituksimab (1) naspram onih koji nisu (0) prema dobnim skupinama (1= ≤ 10, 2 = >10).

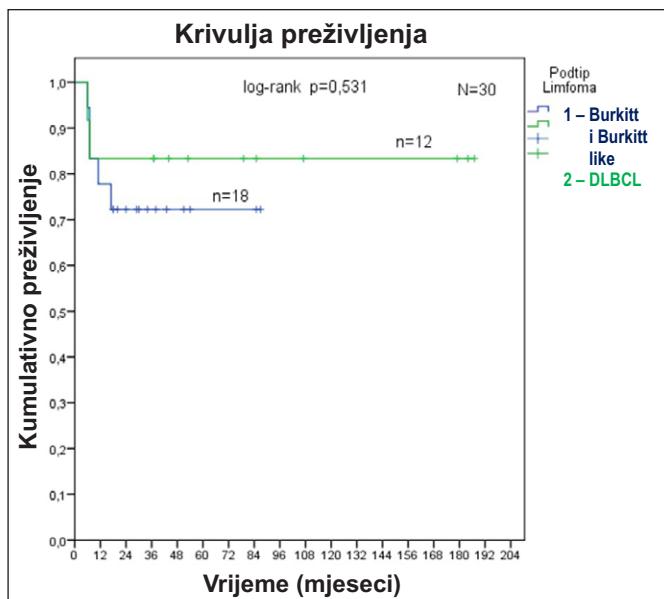
Rituximab	Dobna skupina	Djeca (n)	Broj preživjele djecе	Preživljenje (%)
0	1	8	5	62,5
	2	7	6	85,7
	Ukupno	15	11	73,3
1	1	11	9	81,8
	2	10	9	90
	Ukupno	21	18	85,7

Uzevši u obzir preživljenje prema skupini kliničkog stadija s i bez rituksimaba dodanog u terapiji jasno je utvrđeno da djeca koja nisu uzimala rituksimab, a kliničkog su stadija III ili IV imaju slabo preživljenje (40 %), dok je najbolje u onih kliničkog stadija I i II koja su uzimala rituksimab (93,3 %) što je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Tablica pokazuje razliku u preživljjenju djece koja se uzimala rituksimab (1) naspram onih koji nisu (0) prema skupinama kliničkog stadija (1 – I i II, 2 – III i IV).

Rituximab	Skupina kliničkog stadija	Djeca (n)	Broj preživjele djecе	Preživljenje (%)
0	1	10	9	90
	2	5	2	40
	Ukupno	15	11	73,3
1	1	15	14	93,3
	2	6	4	66,7
	Ukupno	21	18	85,7

Usapoređujući preživljenje pacijenata prema podtipu B-NHL limfoma isključili smo one koji su oboljeli od folikularnog i limfoblastičnog limfoma zbog malog broja bolesnika, tako da su uspoređivani samo oboljeli od Burkitt i Burkitt like limfoma, naspram onih difuznog B velikostaničnog. Rezultati govore u prilog činjenice da je preživljenje difuznih B velikostaničnih naizgled bolje, ali medijan praćenja nije dosegnut niti za jednu skupinu. To je prikazano na Slici 4.



Slika 4. Preživljjenje pacijenata prema podtipu B-NHL limfoma. Brojem 1 označeni su Burkitt i Burkitt like limfomi, a brojem 2 difuzni B velikostanični limfomi (DLBCL).

Rasprava

Sveukupno preživljjenje djece oboljele od B-NHL-a u našoj seriji bolesnika iznosio je 80,6 %. Sa sadašnjim kemoterapijskim protokolima prema literaturnim podacima sveukupno preživljjenje djece s limfomima je između 80 i 90 % u što se uklapaju i rezultati dobiveni u našem istraživanju (2,3,4,5).

Incidenčija bolesti prema spolovima iznosi u literaturi 2-2,5:1 (6,7), a i u našoj seriji bolesnika prevladavaju oboljeli dječaci. Preživljjenje prema spolu u našem istraživanju pokazuje bolju prognozu u djevojčica, no ne nalazimo statistički značajnu razliku koju objašnjavamo premalim brojem bolesnika u ispitivanju.

Rezultati naše serije bolesnika pokazali su da djeca u dobi 10 godina i mlađa imaju lošiju prognozu od starije, no u literaturnim podacima pronađeni su i oprečni podaci (8).

Kod prikaza preživljjenja sukladno kliničkom stadiju dobiveni su uglavnom očekivani rezultati. Pri tome je najbolje preživljjenje u skupini bolesnika stadija I, a najslabije preživljjenje imaju djeca stadija III. Činjenicu da najslabije preživljjenje nije u djece stadija IV, već u onih stadija III objašnjavamo malim brojem djece uključene u istraživanje. Usporedivši preživljjenje stadija II i III postignuta je statistički značajna razlika u preživljjenju u korist djece oboljele od B-NHL stadija II naspram onih stadija III ($p = 0,001$). Statistički značajna razlika u preživljjenju dobivena je i usporedbom preživljjenja skupina

1 i 2 kliničkih stadija pri čemu skupina 1 odgovara kliničkim stadijima I i II, a skupina 2 stadijima bolesti III i IV ($p = 0,006$). Klinički stadij bolesti bitan je prognostički čimbenik i koristan je u predviđanju tijeka bolesti i preživljjenju bolesnika.

Podjelom djece na podtip limfoma utvrdili smo da je bolje preživljjenje za DLBCL nego za Burkitt i Burkitt like limfome. Za folikularne i limfoblastične limfome ne možemo donositi zaključke jer su sva djeca tih podtipova preživjela i nedostatan ih je broj u ispitivanju.

Istraživanjem smo došli do podataka da je preživljjenje bolje ako je rituksimab dio terapijskog protokola. Tada preživljjenje iznosi čak 85,7 %, za razliku od 73,3 % kod one djece koja nisu primala rituksimab. Ti podaci su sukladni s podacima iz literature (2,5).

Procjenom preživljjenja u djece koja su, odnosno nisu, primala rituksimab prema dobnim skupinama nalazimo najbolju prognozu u onih koji su primali rituksimab, a starija su od 10 godina (90 %). Najslabije preživljjenje opazili smo u djece koja nisu dobivala rituksimab, a dobne su skupine 10 godina i manje (62,5 %).

Preživljjenje pacijenata ovisno o primjeni rituksimaba u terapiji u korelaciji sa skupinom kliničkih stadija pokazuje da je za slabo preživljjenje (40 %) karakteristično terapija bez primjene rituksimaba i viši klinički stadij bolesti.

Iako temeljem našeg istraživanja nismo dobili statistički značajnu razliku u preživljjenju bolesnika ovisno o rituksimabu u terapiji, postoji jasan trend boljeg ishoda u onih koji su primali rituksimab. Prema preporukama J. Worch i sur. (9) za definitivnu ulogu rituksimaba u liječenju B-NHL u djece treba provesti kliničko prospektivo kontrolirano ispitivanje na velikom broju ispitanika. Rituksimab se uglavnom vrlo dobro podnosi uz adekvatnu premedikaciju. Od kasnih nuspojava najznačajnija je hipogamaglobulinemija, kod 3 djece i godinama nakon dovršetka terapije.

Zaključno, sveukupno preživljjenje djece oboljele od B-NHL-a u ispitivanoj seriji bolesnika je 80,6 %. Utvrđena je razlika u preživljjenju djece oboljele od B-NHL-a između spolova koja iskazuje prednost ženskom spolu, ali ta razlika nije statistički značajna. Praćenjem preživljjenja djece po dobi bolje preživljjenje imala su djeca starija od 10 godina.

Podjelom pacijenata prema kliničkom stadiju bolesti u skupinu 1 (stadij I i II) i u skupinu 2 (stadij III i IV) dobiveni su očekivani rezultati prema kojima je bolje preživljjenje u djece nižih kliničkih stadija.

Ta razlika je statistički značajna.

Djeca liječena standardnim kemoterapijskim protokolom kojemu je pridružen rituksimab imaju bolje preživljjenje (85,7 %), nego ona koja nisu dobjivala rituksimab (73,3 %), ali nije postignuta statistička značajnost. Temeljem raspoloživih rezultata zaključujemo da je opravdano uvesti rituksimab kao standardnu komponentu kemoterapijskih protokola, posebice u oboljelih u III i IV stadiju bolesti.

Literatura

1. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R i sur. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl.J.Med.* 2002;346:235–242.
2. Bilić E, Femenić R, Konja J, Simat M, Dubravcić K, Batinić D, Ries S, Rajić L. CD20 positive childhood B-non Hodgkin lymphoma (B-NHL): morphology, immunophenotype and a novel treatment approach: a single center experience. *Coll Antropol.* 2010 Mar;34(1):171-5
3. Reiter,A.(2007).Diagnosis and treatment of childhood non-Hodgkin lymphoma. *Hematology.Am.Soc. Hematol.Educ. Program* 2007,285–296.
4. Meyer-Wentrup F, de Zwart V and Bierings M (2013) Antibody therapy of pediatric B-cell lymphoma. *Front. Oncol.* 3:68. doi: 10.3389/fonc.2013. 00068
5. Samochatova EV, Maschan AA, Shelikhova LN, Myakova NV, Belogurova MB, Khlebnikova OP, Shamardina AV, Ryskal OV, Roumiantseva JV, Konovalov DM, Dubrovina ME, Rumyantsev AG. Therapy of advanced-stage mature B-cell lymphoma and leukemia in children and adolescents with rituximab and reduced intensity induction chemotherapy (B-NHL 2004M protocol): the results of a multicenter study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014 Jul;36(5):395-401.
6. Lanzkowsky P. (2011), Manual of Pediatric Hematology and Oncology, Fifth edition, London, Academic Press. poglavlje 20, str 624 – 646.
7. Arceci RJ, Hann IM, Smith OP. (2006), Pediatric Hematology, Third edition, Oxford, Blackwell Publishing. Poglavlje 21, str 482 – 503.
8. Smith MA, Seibel NL, Altekkruse SF, Ries LAG, Melbert DL, O’Leary M, Smith FO, Reaman GH. Outcomes for Children and Adolescents With Cancer: Challenges for the Twenty-First Century *JCO* May 20, 2010 May 20;28(15):2625-2634
9. Worch J, Rohde M, Burkhardt B. Mature B-cell lymphoma and leukemia in children and adolescents-review of standard chemotherapy regimen and perspectives. *Pediatr Hematol Oncol.* 2013 Sep;30(6):465-83

Chediak-Higashi sindrom

Prof. dr. sc. Jelena Roganović, dr. med.

Klinika za pedijatriju

Klinički bolnički centar Rijeka i

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: jelena.roganovic1@ri.t-com.hr

Chediak-Higashi sindrom (CHS) je rijedak autosomno recesivni poremećaj karakteriziran teškom imunodeficijencijom, rekurentnim piogenim infekcijama, parcijalnim okolukutanim albinizmom, blagim poremećajem koagulacije, progresivnim neurološkim oštećenjima i akceleriranom limfoproliferativnom („limfoma like“) fazom bolesti. Točna incidencija nije poznata. U literaturi je opisano manje od 500 slučajeva. Konsangvinitet je čest.

Patogeneza: Podlježeći defekt u CHS-a je abnormalni transportni protein u organelama, koji rezultira poremećenom fuzijom vezikula i defektnom fagocitozom. Poremećaj uzrokuje mutacija CHS1/LYST gena - lizosomalnog prijenosnog regulatornog gena na kromosomu 1q42.1-2. Većina mutacija su besmislene („nonsense“) ili nulte („null“) mutacije s posljedičnim odsustvom CHS1/LYST proteina. U blažim formama CHS-a nađene su mutacije kriog v smisla („missense“) koje kodiraju djelomično funkcionalan protein.

Glavno obilježje bolesti su promijenjene gigantske granule nađene u svim tjelesnim stanicama. Granule su podrijetlom iz lizosoma i uključuju lizosome, citolitičke granule, gusta tjelešca u trombocitima i melanosome. U neutrofilima su prisutne velike azurofilne granule, a u citotoksičnim T limfocitima uvećane zrele citolitičke granule. Ove patološke granule imaju poremećenu baktericidnu i citotoksičnu funkciju u bakterijskim i virusnim infekcijama. Poremećena je i kemotaksija neutrofila. U trombocitima je značajno smanjen broj gustih tjelešaca/delta serotoninskih granula, što rezultira poremećenom funkcijom trombocita i hemoragijskom dijatezom. U melanocitima su prisutni uvećani melanosomi s poremećenim transportom do keratinocita i epitelnih stanica i rezultirajućim parcijalnim okolukutanim albinizmom. Oštećena je i regeneracija stanične membrane, obzirom da u njoj sudjeluju lizosomi.

Klinička slika: CHS je potencijalno letalna bolest različite kliničke prezentacije. Zbog upadljivih simptoma, okolukutanog albinizma i rekurentnih piogenih infekcija, dijagnoza se najčešće postavlja u dojenačkoj dobi ili ranom djetinjstvu.

Stupanj hipopigmentacije je različit, ovisno o etničkoj pripadnosti oboljelih. Većina bolesnika ima svjetlu put i rijetku svijetloplavu sivkastu ili bijelu kosu s metalnim odsjajem. Kod tamnije pigmentiranih rasa mogu se vidjeti mesta hipo- i hiperpigmentacije na fotoekspoziranim područjima. Bolesnici imaju svijetle oči, obično plave. Smanjena je pigmentacija irisa i retine. Posljedično tome, mogu se pojaviti fotofobija, smanjena oštrina vida, nistagnus i strabizam.

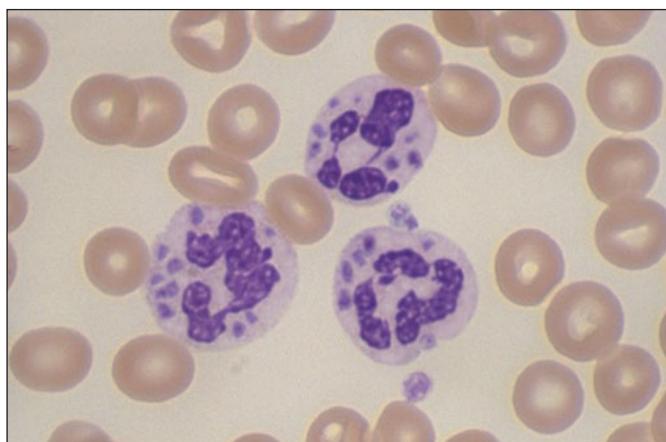
Bakterijske infekcije su teške i česte. Najčešće su infekcije kože, sluznica i respiratornog sustava. Kožne infekcije se mogu manifestirati kao pidodermija, apsesi i ulkusi. Najčešći uzročnici su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* i *Pneumococcus species*. Duboke lezije zacjeljuju sporo s rezidualnim atrofičnim ožiljcima. Česti su gingivitis, ulceracije usne šupljine i periodontitis. Prisutni su blaži poremećaji koagulacije sa sklonosti lakom stvaranju modrica i sluzničnim krvarenjima. Hemoragijska dijateza je izraženija u akceleriranoj fazi bolesti. Hepatosplenomegalija i limfadenopatija su uobičajene, posebice u akceleriranoj fazi.

Unatoč ozbiljnim infekcijama, rano djetinjstvo prezivi 10% bolesnika. U većine preživjelih razvijaju se u adolescenciji i ranoj odrasloj dobi teške neurološke abnormalnosti. Zahvaćen je centralni i periferni nervni sustav. Neurološka oštećenja uključuju mišićnu slabost i senzorne deficite uslijed periferne neuropatije, ataksiju, tremor, pareze kranijalnih živaca i progresivno intelektualno propadanje. Opisani su spinocerebralna degeneracija, parkinsonizam i demencija. Bolesnici koji dožive drugu ili treću dekadu života obično budu vezani uz kolica.

Akcelerirana faza: U više od 80% bolesnika koji ne podlegnu infekcijama razvije se akcelerirana faza bolesti karakterizirana nemalignom masivnom limfohistiocitarnom infiltracijom gotovo svih organa. Najčešći okidač su virusne infekcije, posebice Epstein-Barr virus. Istraživanja ukazuju da virusna

infekcija i/ili oštećena funkcija T limfocita dovode do nekontrolirane aktivacije makrofaga i T limfocita. Ulogu ima i smanjena funkcija NK stanica, abnormalna površinska ekspresija CTLA-4 molekule (uloga u homeostazi T limfocita) i smanjena aktivnost citotoksičnih T limfocita. Bolesnici se prezentiraju vrućicom, izraženom hepatosplenomegalijom i limfadenopatijom, uz pancitopeniju, jaču sklonost krvarenju i težu imunodeficijenciju. Neliječena akcelerirana faza je obično letalna.

Dijagnoza: Dijagnoza CHS-a se najčešće postavlja na temelju analize razmaza periferne krvi na kojem se uočavaju velike azurofilne granule u leucocitima (Slika 1). Azurofilne granule su prisutne u svim stanicama koje sadržavaju granule: stanicama periferne krvi, koštane srži, centralnog i perifernog živčanog sustava, melanocitima, fibroblastima, renalnom tubularnom epitelu i sluznicama probavnog trakta. Dijagnoza se potvrđuje molekularno-genetskim testiranjem CHS1/LYST gena. Vrsta mutacija može biti prediktor težine bolesti, budući da je dokazana korelacija genotipa i fenotipa. Ostale pretrage nisu nužne za dijagnozu. Svetlosnom mikroskopijom stabljike dlake uočavaju su nepravilno raspoređeni pigmentni agregati. Na elektronskoj mikroskopiji u Schwannovim stanicama, miocitima i melanocitima vide se karakteristične velike granule. Moguća je i prenatalna dijagnoza analizom stanica amniona ili korionskih resica u kojima se uočavaju veliki lizosomi, te genska analiza u obiteljima s poznatom mutacijom.



Slika 1. Razmaz periferne krvi bolesnika s Chediak-Higashijevim sindromom. Prisutna gigantska granula u neutrofilima. Izvor: *Hemopathology*.

<http://resources.med.fsu.edu/webpath/hemehtml/heme224.htm>

U laboratorijskim nalazima česta je neutropenija, najvjerojatnije uslijed intramedularne destrukcije neutrofila. Neutrofili i monociti pokazuju smanjen odgovor na kemotaksiju. Oštećeno je i intracelularno razaranje bakterija. Održan je broj NK stanica, ali je njihova citotoksična aktivnost gotovo odsutna. Smanjena je stanična citotoksičnost posredovana antitijelima. Funkcija B limfocita je uredna. Zbog učestalih infekcija uobičajena je hipergamaglobulinemija. Bolesnici s CHS-om imaju poremećenu agregaciju trombocita i produljeno vrijeme krvarenja. U akceleriranoj fazi bolesti prisutna je trombocitopenija. Na magnetskoj rezonanciji prisutna je difuzna atrofija mozga i leđne moždine. Elektroenzefalogram može registrirati epileptogenu moždanu aktivnost. Elektromiografija prikazuje značajno usporenu živčanu provodljivost.

Liječenje: Liječenje bolesnika s CHS-om podrazumijeva antimikrobnu profilaksu, agresivnu antibiotsku terapiju u slučaju bakterijskih infekcija i antiviralne lijekove (aciklovir). Za korekciju neutropenije primjenjuje se granulocitni čimbenik rasta. Primjena interferona gama može djelomično popraviti funkciju NK stanica. U limfoproliferativnoj fazi bolesti djelomičan uspjeh postiže se visokim dozama kortikosteroida, kemoterapijom (etopozid, metotreksat, vinkristin), ciklosporinom i imunoglobulinima. Najčešće se primjenjuje HLH-2004 protokol (protokol za liječenje familijarne hemofagocitne limfohistiocitoze i sekundarnog hemofagocitnog sindroma).

Za korekciju imunoloških i hematoloških manifestacija bolesti, terapija izbora je transplantacija krvotvornih matičnih stanic (TKMS). TKMS je najučinkovitija ako postoji HLA podudaran donor, te ako se učiniti prije razvoja akcelerirane faze bolesti ili kada je bolesnik u remisiji. Nema učinka na progresivno neurološko propadanje i okulokutani albinizam. Eapen i suradnici su izvjestili o petogodišnjem preživljjenju od 62% u 35-oro transplantirane djece s CHS-om. Veća smrtnost zabilježena je u onih koji su transplantirani u limfoproliferativnoj fazi bolesti. Grupa japanskih autora je 2013. godine objavila rezultate u sedmero transplantiranih bolesnika s CHS-om, od kojih je preživjelo njih petero.

Prognoza: Bez TKMS-a većina bolesnika umre prije sedme godine života uslijed teških piogenih infekcija, znatno rjeđe zbog ozbiljnog krvarenja. U najvećeg broja transplantiranih bolesnika i u neko-

licine koja preživi djetinjstvo bez TKMS-a, razvija-ju se teški neurološki poremećaji do druge decenije života.

U Klinici za pedijatriju KBC Rijeka dijagnoza CHS-a postavljena je u dvoje djece. Ovi bolesnici nisu prikazani u tekstu, obzirom da je rad poslan na objavljivanje u indeksirani časopis.

Literatura

1. Bharti S, Bhatia P, Bansal D, Varma N. The accelerated phase of chediak-higashi syndrome: the importance of hematological evaluation. *Turk J Haematol.* 2013;30(1):85-7.
2. Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(1):22-9.
3. Lozano ML, Rivera J, Sánchez-Guiu I, Vicente V. Towards the targeted management of Chediak-Higashi syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:132. doi: 10.1186/s13023-014-0132-6.
4. Nagai K, Ochi F, Terui K, et al. Clinical characteristics and outcomes of Chédiak-Higashi syndrome: a nationwide survey of Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(10):1582-6.
5. Nowicki RJ. Chediak-Higashi syndrome. Preuzeto 30. siječnja 2015. s: <http://emedicine.medscape.com/article/1114607>.
6. Trottestam H, Beutel K, Meeths M, et al. Treatment of the X-linked lymphoproliferative, Griscelli and Chediak-Higashi syndromes by HLH directed therapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2009;52(2):268-72.

Periferno uveden centralni venski kateter (PICC) – prednosti, nedostaci, komplikacije i preporuke za njihovo zbrinjavanje

**Zdravko Mitrović, Igor Komljenović,
Diana Dautović, Vlatko Pejša**

Adresa autora za kontaktiranje:

Dr. sc. Zdravko Mitrović, dr. med.
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Dubrava, Zagreb
E-pošta: mitrovic@mef.hr

Uvod

Periferno uveden centralni venski kateter (PICC) je vrsta trajnog centralnog venskog katetera (CVK). Do njihove pojave unazad pet godina, za produljenu primjenu terapije kod hematoloških i onkoloških bolesnika u Hrvatskoj su se tradicionalno koristili tunnelirani CVK poput Hickmanovog katetera ili port. U ovom trenutku, osim u KB Dubrava gdje su se najprije počeli upotrebljavati, PICC-ovi se koriste na KBC Zagreb u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti i u Klinici za onkologiju. Postoje naznake da će i drugi hematološki centri (KBC Rijeka) krenuti s njihovom upotrebom.

Nedavno je u Liječničkom vjesniku objavljen rad u kojem su prikazana naša iskustva u upotrebi PICC-ova (1). Svrha ovog članka je osvrnuti se na prednosti i najčešće komplikacije upotrebe PICC-a te dati upute za njihovo zbrinjavanje u svakodnevnoj praksi, posebno u manjim bolnicama u kojima bolesnici previjaju PICC-ove ili bivaju hospitalizirani.

Postavljanje PICC-a

Praktična prednost PICC-a u odnosu na druge trajne katetere je činjenica da za PICC nije potreban kirurg i operacijska sala, nego se može postaviti na odjelu, eventualno uz asistenciju intervencijskog radiologa u slučaju opetovane malpozicije katetera. Najvažnije je da cijeli postupak predstavlja znatno manju lokalnu traumu i rizik za pacijenta, jer je ubodno mjesto na nadlaktici. Nedostatak predstavlja činjenica da je potrebno imati UZV aparat za tu namjenu te je nužno ovladati procedurom postavljanja PICC-a koja je ipak komplikiranija u odnosu na procedure za obični CVK. U tom kontekstu, zapravo je ključno imati motiviranog pojedinca (lijecnika ili medicinsku sestrzu/tehničara) koji će ovladati vještini

nom. Komplikacije postavljanja rješavaju se odmah i nisu predmetom razmatranja ovdje.

Previjanje PICC-a

Prednost PICC-a u odnosu na port je mogućnost vađenje krvi bez traume (iako to nije njihova primarna namjena!), što je češće potrebno kod hematoloških bolesnika, a manje kod onkoloških. S druge strane, PICC je potrebno previjati jedanput tjedno. Ako bolesnik živi daleko od mjesta liječenja, nastaje potencijalni problem i rizik od komplikacija zbog toga što osoblje u lokalnim ustanovama često nema iskustva s tom vrstom katetera. Stoga, bolesnike (s pisanim uputama za previjanjem) najčešće upućujemo na dnevne bolnice hematologije/onkologije ili odjel za hemodijalizu u lokalnoj ustanovi, jer je postupak sličan održavanju tunneliranih CVK koji se koriste za dijalizu. Procedura previjanja PICC-a navedena je u Tablici 1. Procedure za održavanje i korištenje PICC-a navedene su u Tablici 2. Bolesnici uvjek dobiju usmene upute oko PICC-a i fizičkih aktivnosti odnosno higijene. Važno je pri tuširanju kateter držati suhim, a ako se ipak namoći, treba ga previti.

Tablica 1. Postupak održavanja (ispiranja) PICC-a.

1. Uz upotrebu sterilnih rukavica, dezinficirati sterilnim tupferom ubodno mjesto PICC-a
2. Staviti Biopatch ili tupfer natopljen jodom (ili barem sterilni tupfer)
3. Promijeniti vanjski fiksator katetera ako se odlijepio ili barem 1x mjesечно
4. Aspirirati 5 do 10ml krvi
5. Isprati kateter s 2x po 20ml fiziološke otopine pod tlakom po sistemu "flush and stop"
6. Staviti novu valvulu
7. Heparinizirati s 0.2ml heparina (bočica od 25000/5ml) i 0.8ml fiziološke otopine*
8. Zaštititi ubodno mjesto sterilnim flasterom, a valvulu velikim sterilnim tupferom

*U novije vrijeme se umjesto heparina koriste gotove otopine za ispiranje katetera (npr. DuraLock-C ili TauroLock)

Tablica 2. Postupak korištenja PICC-a.

1. Uz upotrebu latex rukavica dezinficirati vanjsku valvulu katetera
2. Aspirirati 5 do 10 ml krvi
3. Isprati kateter s 2x po 20 ml fiziološke otopine
4. Spojiti sistem za infuziju ili aplicirati lijek putem injekcije
5. Po završetku predviđene terapije isprati kateter kao pod 3
6. Zaštititi valvulu sa sterilnim tupferom
7. Kateter nije potrebno heparinizirati ako se koristi unutar 24 sata

Komplikacije i preporučeni postupci

Ovdje su navedene najčešće komplikacije i prijedlog za njihovo zbrinjavanje. U slučaju nedoumica, svakako je poželjno kontaktirati ustanovu u kojoj je PICC postavljen. Ako se radi o ozbiljnijim komplikacijama, razmotriti upućivanje bolesnika u matičnu ustanovu. Ako je potrebno izvaditi PICC, postupak je kao i kod običnog CVK (samo se nježno izvuče uz kompresiju ubodnog mjesta; vrh je potrebno u slučaju sistemske infekcije poslati na mikrobiologiju).

Okludiran kateter – u slučaju prave okluzije tj. kada nije moguće izvaditi krv (nema povrata) niti primijeniti infuzije kroz kateter – PICC se mora izvaditi. Međutim, sam gubitak povrata NE znači da PICC treba izvaditi. U tom slučaju preporučujemo aspirirati PICC nekoliko puta postupno sa sve većim špricama (2ml, 5ml, 10ml) kako bi se izvuklo što vise sadržaja iz PICC-a. Nakon toga, proprati PICC s 3x20ml F.O. Ako se ne dobije povrat, dolazi u obzir ipak nastaviti infuziju ili rotirati kateter, no to je bolje prepustiti iskusnom osoblju tj. uputiti u centar u kojem je PICC postavljen.

Febrilitet (sepsa) – potrebno je paralelno vaditi hemokulture iz periferije i katetera te ukoliko budu pozitivni, prema IDSA smjernicama (2), PICC se vadi. Važno je istaknuti da pozitivna hemokultura iz katetera ne znači nužno infekciju povezanu s PICC-om i potrebu za njegovim vađenjem (3), posebno ako bolesnik dobro reagira na antimikrobnu terapiju. Ako febrilitet perzistira unatoč antimikroboj terapiji, uz negativne hemokulture, a bez drugih znakova infekcije, PICC se u konačnosti ipak vadi.

Otok ruke – preporučuje se učiniti doppler UZV. Ako je prisutna tromboza vena uz PICC, potrebno je započeti niskomolekularni heparin u terapijskoj

dozi. U našoj ustanovi obično vadimo PICC nakon dva do tri dana, uz nastavak antikoagulantne terapije.

Komplikacije na ubodnom mjestu:

Crvenilo – prema procjeni sestre, napravi se toaleta prema protokolu za previjanje katetera dvaput dnevno. Ako postoje jasni znakovi infekcije, PICC se vadi.

Sukrvica – toaleta prema protokolu za previjanje. Ako se sumnja na “puštanje” katetera, prema procjeni liječnika PICC se vadi.

Krvarenje – najčešće je neposredno nakon postavljanja. Pratiti količinu krvarenja, lokalno kompresija uz eventualno stavljanje lokalnog tupfера s traneksamičnom kiselinom.

Zaključak

PICC je vrlo prihvatljiv kao dugotrajni venski put kod hematoloških bolesnika. Najčešće komplikacije su infekcije, tromboze i okluzije katetera. Pravilnim održavanjem, uz edukaciju bolesnika i osoblja, stopa komplikacija može se dodatno smanjiti.

Literatura

1. Mitrović Z, Komljenović I, Jakšić O i sur. Upotreba periferno uvedenoga centralnog venskog katetera (PICC) u bolesnika sa zločudnim hematološkim bolestima – prikaz vlastitih iskustava. Liječ Vjesn 2014;136:136-40.
2. O’Grady NP, Alexander M, Burns LA i sur. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Am J Infect Control 2011;39(4 Suppl 1):S1–34.
3. Manian FA. IDSA guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related bloodstream infection. Clin Infect Dis 2009;49:1770–1.

Istovremena pojava mijeloproliferativne i limfoproliferativne neoplazme: pričak pacijenta i kratki pregled dosad poznatog

Tajana Štoos-Veić¹, Anita Škrtić²,
Radmila Ajduković-Stojisavljević³, Ozren Jakšić³,
Čedna Tomasović-Lončarić¹, Gorana Aralica¹,
Rajko Kušec⁴

¹ Klinički zavod za patologiju i citologiju, KB Dubrava

² Klinički zavod za patologiju i citologiju, KB Merkur

³ Klinički zavod za hematologiju, KB Dubrava

⁴ Odjel za genetiku i molekularnu dijagnostiku, KB Dubrava

Adresa autora za kontaktiranje:

Prim. dr. sc. Tajana Štoos-Veić, dr. med.

Klinički zavod za patologiju i citologiju

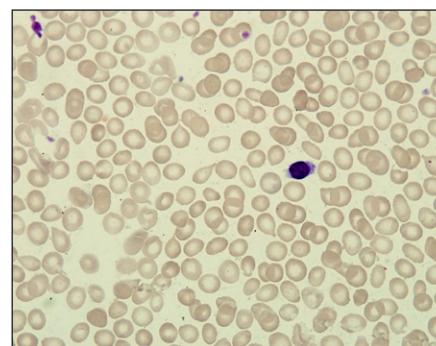
Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

E-pošta: tveic@kdb.hr

Prema do sada objavljenim podacima, učestalost sinkrone ili metakrone pojave kronične mijeloproliferativne i limfatične/plazmastanične neoplazme u istog bolesnika je mala, iznosi manje od 1% slučajeva (1,2). Opisane su sve kombinacije akutnih i kroničnih mijelo- i limfoproliferativnih bolesti, uglavnom kao prikazi pojedinih slučajeva istovremene pojave bolesti ili pak male serije od po nekoliko opisanih slučajeva. Hauck i sur. 2013. godine objavljaju seriju slučajeva iz vlastite arhive uz analizu dotad objavljenog (ukupno 185 pronađenih slučajeva) te zaključuju da je najčešće opisana kombinacija Philadelphia negativne mijeloproliferativne neoplazme (Ph+ MPN) i kronične limfocitne leukemije (B-CLL) (3). Jedina mijeloproliferativna neoplazma koja se većom učestalošću pojavljuje udružena s drugom klonalnom mijeloproliferativnom a ponekad i limfoproliferativnom neoplazmom (LPN) jest sistemna mastocitoza koja je udružena s drugom hematološkom neoplazmom u 30 % slučajeva (4,5). Mala učestalost istovremene pojave dviju kroničnih hematoloških neoplazmi rezultirala je manjkom sistematičnih istraživanja učestalosti te nedostatkom istraživanja eventualne klonalne povezanosti takvih bolesti. U ovom tekstu ćemo kratko prikazati slučaj našeg bolesnika s dvije istovremeno otkrivene hematološke neoplazme u kojeg smo uspjeli dokazati klonalnu neovisnost dviju neoplazmi. Uz to ćemo se osvrnuti i na druge slučajeve istovremene pojave dviju kroničnih hematoloških neoplazmi registriranih u našoj ustanovi uz kratki pregled relevantne literature.

Prikaz slučaja:

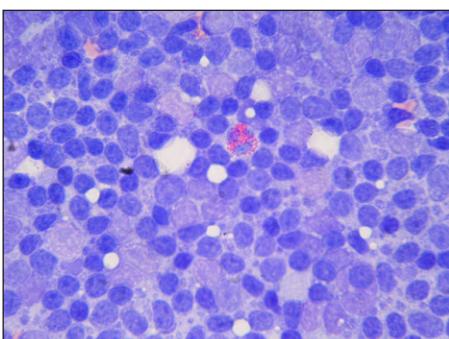
Muškarac star 85 godina, javio se 2004. godine, u internističku ambulantu zbog opće slabosti. Usprkos dobi, dotad nije bolovao od značajnijih bolesti. Fizikalnim pregledom otkrivena je generalizirana limfadenopatija s čvorovima veličine do jednog centimetra, vrlo velika slezena (do u malu zdjelicu) i jetra povećana za 2 cm. Rutinski laboratorijski nalazi otkrivaju leukocitozu ($L 18,5 \times 10^9/L$) uz anemiju ($E 3,9 \times 10^12/L$, Hb 119) i trombocitopeniju ($Tr 92 \times 10^9/L$) te povišen LDH (847) dok su ostali biokemijski nalazi bili su unutar referentnih vrijednosti. U diferencijalnoj krvnoj slici uočeno je skretanje u lijevo do stadija promijelocita uz promjene morfologije eritro-cita (Slika 1.).



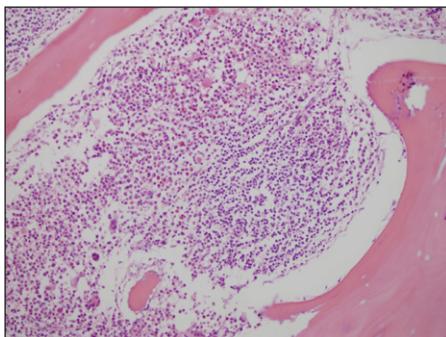
Slika 1. Razmaz periferne krvi – dakriociti (MGG, 1000x).

Kompjuteriziranim tomografijom (CT) prsnog koša i trbuha nađena je povećana slezena bez žarišnih lezija, retroperitonealna limfadenopatija i povećana jetra. Bolesnik je hospitaliziran radi dalje obrade sa sumnjom na limfoproliferativnu bolest. Citološkom punkcijom ingvinalnog limfnog čvora nađena je monotona slika malih limfocita u razmazu te se postavlja sumnja na limfom niskog stupnja maligniteta, moguće malih limfocita (SLL) (Slika 2.). U normocelularnom aspiratu koštane srži se uz uređan odnos loza uočavaju tek povećani megakariociti mjestimice hiperlobuliranih jezgara, a bez infiltracije limfomom. Biopsijom kosti nađe se zadebljana kost, fibroza, žarišta zrele hematopoeze i limfatični noduli koji su ocijenjeni reaktivnima (Slika 3.), iako je imunofenotipizacija protočnim citometrom otkrila malu populaciju od 7% monoklonalnih limfocita ($CD5 +$, $IgM +$, lambda +, negativnih ostalih biljega za CLL ili triholeukemiju). Kariogram je bio uredan 46,xy. Histološka slika ingvinalnog limfnog čvora

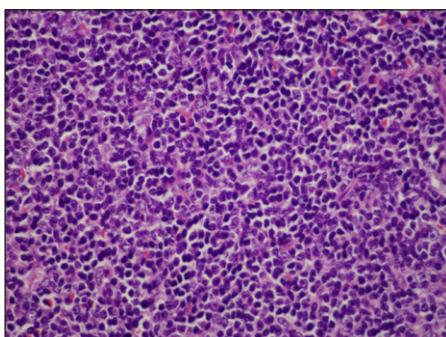
odgovara B- NHL-u malih stanica (CD 20+, CD 5-) (Slika 4.). Konačno je postavljena dijagnoza mijeloproliferativnog sindroma /osteomijeloskleroze (MPS/OMS) uz B-NHL malih stanica, bez infiltracije koštane srži.



Slika 2. Citološki razmaz punktata limfnog čvora – monotona slika malih limfocita (MGG, 1000x).

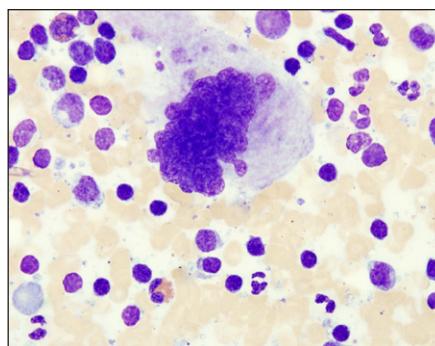


Slika 3. Biopsija koštane srži – vidljivi agregati limfocita i polimorfni megakariociti (HE, 200x).



Slika 4. Biopsija limfnog čvora (HE, 600x).

S obzirom na jako povećanu slezenu napravljena je i citološka punkcija slezene u kojoj je nadena ekstramedularana hematopoeza te mali limfociti koji u to vrijeme nisu ocijenjeni limfomskima (Slika 5.). Imunofenotipizacija protočnom citometrijom punktata slezene nije napravljena. Bolesniku je predložena splenektomija koju nije prihvatio te se gubi iz daljeg praćenja.



Slika 5. Citološki razmaz punktata slezene - ekstramedularna hematopoeza uz male limfocite (MGG, 1000x).

Nakon otkrića *JAK2* mutacije koja je povezana s većinom Ph⁻ MPN-a, učinjena je reevaluacija bolesti. Iz rutinski arhiviranih citoloških razmaza punktata koštane srži, limfnog čvora i slezene izolirana je DNA za molekularne analize metodom ekstrakcije fenolom i kloroformom. Iz razmaza punktata slezene i koštane srži DNA je izolirana neselektivno, dok je iz razmaza punktata limfnog čvora bilo moguće selektivno izdvojiti DNA limfatičnih stanica. Alel-specifičnom PCR reakcijom dokazali smo prisutnost *JAK2* mutiranih stanica u slezeni (stanice ekstramedularne hematopoeze), dok su limfatične stanice iz limfnog čvora bile *JAK2* negativne. Ujedno smo koristeći PCR BIOMED-2 protokol dokazali monoklonalnost limfatičnih stanica u slezeni te time potvrdili da je povećanje slezene uzrokovano kako ekstramedularnom hematopoezom tako i infiltracijom limfomom. Ponovljena je i imunohistokemija limfnog čvora i koštane srži te revidirana dijagnoza glasi primarna mijelofibroza (PMF) *JAK2* + uz istovremeni B-NHL malih limfocita (CD20+; CD 5+), infiltraciju koštane srži limfomom te ekstramedularnom hematopoezom i infiltracijom slezene limfomom.

Pretraživanjem baze podataka KB Dubrava pronašli smo još 5 bolesnika s istovremenom Ph⁻ MPN-om i LPN-om (Tablica 1.). U većine naših bolesnika radilo se o *JAK2*+ MPN a obje su bolesti otkrivene istovremeno. Tri slučaja sukcesivne pojave MPN-a i LPN-a opisana su na 4. Hrvatskom hematološkom kongresu u Zagrebu 2012. godine (KB Merkur). Učestalost istovremene pojave MPN-a i LPN-a u Hrvatskoj nije poznata.

Tablica 1. Neke kliničke značajke bolesnika s istovremenom MPN-a i LPN-a u KB Dubrava.

DOB (godine)	JAK2+ MPN	LPN	E	Hb	L	Tr	Praćenje (godine nakon dg)
84	OMS	B-NHL	3,9	119	18,5	92	Preminuo (?)
71	ET	CLL	4,4	132	35,3	281	Preminuo (4)
68	ET	CLL	4,61	149	36,2	535	Preminuo (2)
41	ET	MGUS	5,3	150	7,4	502	živ
57	ET	B-NHL	4,32	123	7,5	159	živ
76	CMML (JAK2-)	MGUS	3,57 4,9	112 118	2,8 27	41 176	Preminuo (4)

Kao što smo već naveli, sistematicna istraživanja istovremene pojave MPN-a i LPN-a su malobrojna, kako njihove učestalosti i međusobne povezanosti, tako i eventualne klonalne povezanosti. Dok neki autori podupiru mišljenje da se uglavnom radi o klonalno nepovezanim bolestima (3), ima i drugačijih stavova. Vannucchi i sur. nalaze JAK2 mutaciju u limfoidnim stanicama nekih bolesnika s istovremenom MPN-om i LPN-om te tvrde da bolesnici s MPN-om imaju 3 puta veći rizik od razvoja LPN-a nego opća populacija (6). U nekim radovima korištene su kromosomske aberacije ili spolni kromosomi kao marker (7) te se pokazalo da u većini slučajeva obje bolesti nastaju neovisno iz dviju različitih, klonalno nepovezanih pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica. Haucke i sur. (3) su na nizu slučajeva iz svoje arhive pokazali da maligne limfatične stanice nisu JAK2 mutirane u bolesnika s konkombinantnom MPN-om i LPN-om iako su neki raniji radovi navodili da zdrave limfatične stanice (B,T,NK linije) u pojedinim bolesnika s JAK2 pozitivnom MPN-om mogu biti nosioci JAK2 mutacije (8,9), vjerojatno zbog nastanka somatske JAK2 mutacije u raznim fazama razvoja pluripotentne hematopoetske matične stanice. U slučaju povezanosti B-CLL-a s MPN-om nastanak druge klonalno neovisne neoplazme može se tumačiti aberantnim imunološkim statusom vezanim uz LPN te ev. genetičkim i/ili toksičnim oštećenjima vezanim uz dob. S druge strane, u slučajevima pojave drugih MPN/LPN/MM-a moguće se ipak radi o klonalno povezanim bolestima tj. o nastanku obje bolesti iz jednog aberatnog kloga (10-12). Istraživanja klonalnosti na većim skupinama bolesnika trebala bi dati jasniji odgovor na pitanja o mogućem mehanizmu istovremenog nastanka dviju hematoloških bolesti. U ovom trenutku, izgleda da bolesnici s dvije bolesti nemaju lošiju prognozu od bolesnika sa samo jednom kroničnom hematološ-

kom neoplazmom. LPN koje se najčešće javljaju u kombinaciji s MPN-om je B-CLL indolentnog kliničkog tijeka ili plazmocitom/MGUS.

Literatura

1. Florensa L, Vallespi T, Woessner S, Domingo A, Crespo N, Rozman M et al. Incidence and characteristics of lymphoid malignancies in untreated myelodysplastic syndromes. Leuk Lymphoma. 1996; 23: 609–612.
2. Laurenti L, Tarnani M, Nichele I, Ciolfi S, Corteletti A, Forconi F et al. The coexistence of chronic lymphocytic leukemia and myeloproliferative neoplasms: a retrospective multicentric GIMEMA experience. Am J Hematol. 2011;86: 1007–1012.
3. Hauck G, Jonigk D, Kreipe H, Husein K. Simultaneous and Sequential Concurrent Myeloproliferative and Lymphoproliferative Neoplasms. Acta Haematologica. 2013;19:187-196.
4. George TI, Horny HP: Systemic mastocytosis. Hematol Oncol Clin North Am. 2011; 25:1067–1083, vii.
5. Sotlar K, Colak S, Bache A, Berezowska S, Krokowski M, Bültmann B, Valent P, HornyHP: Variable presence of KITD816V in clonal haematological non-mast cell lineage diseasesassociated with systemic mastocytosis. J Pathol. 2010; 220(5):586-595.
6. Vannucchi AM, Masala G, Antonioli E, Susini MC, Guglielmelli P, Pieri L et al. Increased Risk of Lymphoid Neoplasms in Patients with Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009; 18(7):2068-2073.
7. Swierczek S, Nausova J, Jelinek J, Liu E, Roda P, Kucerova J et al. Concomitant JAK2V617F-positive Polycythaemia Vera and B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia in Three Patients Originating from Two Separate Hematopoietic Stem Cells. Am J Hematol. 2013; 88(2):157-158.
8. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B-and T- lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. Br J Haematol. 2007; 136(5):745-751.
9. Bogani C, Guglielmelli P, Antonioli E, Pancrazzi A, Bosi A, Vannucchi AM. B-, T-, and NK-cell lineage involvement in JAK2V617F-positive patients with idiopathic myelofibrosis Haematologica. 2007;92(2):258-9.
10. Reddi DM, Lu CM, Fedoriw G, Liu YC, Wang FF, Ely S et al. Myeloid neoplasms secondary to plasma cell myeloma: an intrinsic predisposition or therapy-related phenomenon? A clinicopathologic study of 41 cases and correlation of cytogenetic features with treatment regimens. Am J Clin Pathol. 2012;136(6):855-66.
11. Nilsson T, Nilsson L, Lenhoff S, Rylander L, astrand-Grundstrom I, Strombeck B et al. MDS/AML associated cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: evidence for frequent de novo occurrence and multipotent stem cell involvement of del(20q). Genes Chromosomes Cancer. 2004; 41:223-231.
12. Schmetzer HM, Mittermuller J, Duell T, Wilmanns W:Development of myeloma and secondary myelodysplastic syndrome from a common clone. Cancer Genet Cytogenet. 1998;100:31-35.

Čimbenici rasta granulocita u mijelodisplastičnom sindromu

Inga Mandac Rogulj, dr. med.

Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur, Zagreb
E-pošta: imandac@yahoo.com

Uvod

Mijelodisplastični sindrom (MDS) je heterogeni grupa poremećaja krvotvorne matične stanice karakteriziran citopenijom, nepostojanjem ostalih hematopoetskih ili ne-hematopoetskih poremećaja kao uzroka citopenije i prisutnošću karakterističnih promjena u koštanoj srži (1).

Morfološki kriteriji uključuju više od 10% displastičnih promjena u najmanje jednoj od tri stanične linije (eritroidnoj, granulocitnoj, megakariocitnoj), povišen postotak blasta ($>5\%$) ili prisutnost MDS-povezanih kromosomske promjene.

Kod bolesnika koji nemaju kromosomske ili molekularne promjene, citopenija treba biti prisutna barem 6 mjeseci (2).

Kod oko trećine bolesnika s MDS-om može doći do progresije poremećaja u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML).

U svakodnevnoj kliničkoj praksi, dijagnoza MDS-a postavlja se nakon analize periferne krvi i koštane srži, uz citomorfologiju i histopatologiju, konvencionalnu citogenetiku i FISH, te sve više i protočnu citometriju.

Ovisno o postotku blasta u koštanoj srži, broju citopenija, citogenetskim abnormalnostima i citogenetskim grupama rizika, ovisnost o transfuziji, određuju se prognostički indeksi (IPSS, IPSS-R, WPSS). Prognostičku važnost u MDS-u pokazali su parametri vezani uz dob bolesnika, komorbidity, fibroza koštane srži (>2), povišen LDH i b2 mikroglobulin, serumski albumin, te brojne somatske mutacije.

Mijelodisplastični sindrom se najčešće pojavljuje kod starijih bolesnika (prosjek 70 godina), dok je oko 10% bolesnika mlađe od 50 godina. Incidencija MDS-a je 4/100 000 stanovnika, dok se kod starijih od 70 godina dijagnosticira kod 40-50/100 000 stanovnika (2,3).

Iako je etiologija mijelodisplastičnog sindroma najčešće nepoznata, poznato je kako se poremećaj češće pojavljuje u ranije liječenih bolesnika. Rizik za pojavu mijelodisplastičnog sindroma i akutne mi-

jeloične leukemije nakon autologne transplantacije perifernih matičnih stanica je veći ako je leukafeze trajala 5 ili više dana, ako je bolesnik liječen radioterapijom te ako je liječen s 4 ili više linija kemoterapije prije autologne transplantacije (4).

U liječenju bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom važno je bolesnika klasificirati u višu ili nižu prognostičku grupu i odabrati odgovarajuću terapiju.

Liječenje bolesnika niskog prognostičkog rizika danas je uglavnom potporno i odnosi se na profilaksu ili liječenje infektivnih komplikacija zbog neutropenije, transfuzije trombocita kod znakova hemoragijske dijateze ili eritrocita kod simptomatske anemije, a kelatori željeza primjenjuju se kod sekundarne hemokromatoze (5).

U ovom tekstu osvrnut će se na primjenu granulocitnih čimbenika rasta (G-CSF) kod bolesnika s MDS-om.

Dosadašnje spoznaje

Sigurnost primjene, bojazan da će čimbenik rasta granulocita potaknuti klonalnu evoluciju kod MDS-a i ubrzati put prema AML-u, te brojne nuspojave (ruptura slezene, fibroza koštane srži, rast ne-hematopoetskih tumora, neutrofilne dermatoze, plućni infiltrati, leukemoidna reakcija) samo su neki od dvojbi koji zaustavljaju hematologe kod primjene G-CSF-a u MDS-u (5).

Prva iskustva primjene čimbenika rasta neutrofilsnih granulocita i makrofaga (GM-CSF) kod bolesnika s MDS-om opisana su prije gotovo 30 godina.

U istraživanju faze I, kod 8 bolesnika s MDS-om primijenjena je GM-CSF kontinuirana infuzija u dozi 30 do 500qg/m² kroz 2 tjedna koja je imala za učinak povećanje broja leukocita za 5 do 70 puta, više od 5 puta povećanje broja neutrofilsnih granulocita te 3 do 10 puta povećanje broja trombocita. Mijelogram je opisao povećanu celularnost koštane srži kao i smanjen postotak blasta, a najčešća nuspojava je bila bol u dugim kostima (6).

Randomizirana multicentrična studija primjene GM-CSF-a kod 101 bolesnika s MDS-om (RA,RARS i $<10\%$ RAEB), procjenjivala je terapijski odgovor u porastu hemoglobina, neutrofilsnih granulocita i trombocita, a bez znakova progresije bolesti. Kod 14 od 16 bolesnika s normalnim kariotipom postignut je zadovoljavajući terapijski odgovor, kako i kod 14 od 27 s citogenetskim mutacijama, a

35% bolesnika provelo je terapiju kroz 8 tjedana (7).

Primjena G-CSF-a smanjila je učestalost infektivnih komplikacija kod bolesnika s MDS-om, a koje su i najčešći uzroci smrti prema podacima objavljenim u nekoliko kliničkih opservacijskih studija (8).

Infekcije kod bolesnika s MDS-om imaju više etioloških čimbenika: različiti terapijski protokoli, neutropenija, funkcionalno oštećenje neutrofilnih granulocita, oštećenje B i T-limfocita, smanjena učinkovitost NK stanica i regulatornih T-limfocita, raniji komorbiditeti, kronične infekcije te alogenična transplantacija perifernih matičnih stanica (8,9).

Primjena G-CSF-a u standardnoj dozi nakon kemoterapije može poboljšati neutropeniju kod 30-70% neutropeničnih MDS bolesnika, a bolji rezultati dokazani su kod bolesnika niskog rizika (8,9).

Opravdana je primjena G-CSF-a kod bolesnika s MDS-om niskog rizika i delecijom 5q uz terapiju lenalidomidom, kad je broj neutrofilnih granulocita ispod $1 \times 10^9 / L$. Ovakav pristup smanjuje odgađanje lenalidomida radi neutropenije, a odgađanje se povezuje sa slabijim citogenetskim odgovorom (10).

Ne preporučuje se primjena G-CSF-a kod bolesnika s MDS-visokog rizika, iako je mijelotoksičnost hipometilirajućih lijekova kod bolesnika visokog rizika, izmijenila praksu u pojedinim centrima pa se G-CSF daje i kao profilaksa odgađanja terapije azacitidinom (11).

Studija koja je ograničila profilaktičku primjenu filgrastima kod 102 neutropenična bolesnika s MDS-om tipa RAEB i RAEB-t, pokazala je kraće ukupno preživljenje u skupini RAEB+filgrastim (10 vs 21mj), a nije bilo značajne razlike kod bolesnika s RAEB-t (12).

Dosadašnje studije nisu dale odgovor o preporučenoj dozi G-CSF-a, pa se uglavnom primjenjuju pojedina osobna iskustva autora, a ne činjenice medicinske prakse osnovane na dokazima.

Tako pojedini autori primjenjuju pegilirani filgrastim u dozi 1 mg kao potkožnu injekciju svaka 1 do 3 tjedna, ali se većina slaže kako je primjena G-CSF-a filgrastima do 3 puta tjedno i u najnižoj mogućoj dozi prihvatljiva (5,13).

Iskustva Lindberg i suradnika odnose se na primjenu G-CSF-a u kombinaciji s eritropoetinom, ako na uvodnu terapiju ESA nije došlo do zadovoljavajućeg odgovora koji procjenjuju nakon 8 tjedana. Početna doza G-CSF-a je najčešće 300 mcg/sc dvaput tjedno. Ponekad i sam bolesnik utječe na smanjivanje učestalosti primjene G-CSF-a ako ima nuspojave (bolove u kostima, varijacije raspona broja leukocita

od urednih vrijednosti pa do leukemoidnih reakcija). Kod MDS bolesnika koji s vremenom razviju refrakternost na ESA, dosadašnja istraživanja i prikazi manjeg broja bolesnika iz pojedinih kliničkih centara, nisu pokazali učinkovitost nekog drugog terapijskog pristupa, osim najbolje moguće potporne transfuziološke terapije. Kod bolesnika koji su primali ESA uz G-CSF i postali refraktorni na ESA, nastavak liječenja azacitidinom nije pokazao terapijski učinak. (14)

S obzirom na poznate nuspojave azacitidina, od kojih je najučestalija mijelosupresija, brojne su preporuke pojedinih stručnih društava o profilaktičkoj primjeni G-CSF-a, u svrhu sprječavanja odgode terapije. Ako se G-CSF primjenjuje, i ovdje vrijedi preporuka o primjeni najniže doze, te primjeni G-CSF-a u razdoblju nakon završetka terapije azacitidinom. Prema Lindberg i suradnicima, kontraindicirana je primjena G-CSF-a tijekom terapije azacitidinom. Ako se G-CSF ne primjenjuje, očekivani oporavak neutropenije tijekom terapije azacitidinom je oko 16 dana, a ako ipak ne dođe do oporavka neutropenije, novi ciklus azacitidina se može nastaviti nakon 35, umjesto 28 dana, ali duža odgoda se ne preporučuje radi samih farmakoloških karakteristika azacitidina (14,15).

Prema preporuci Santini, mijeloidni čimbenici rasta bi se trebali primjenjivati kod svih MDS-bolesnika liječenih azacitidinom, ako je razina neutrofilnih granulocita ispod 500/ql i ako se radi o bolesniku sklonom infektivnim komplikacijama (šećerna bolest tip II, KOPB). Ako nije moguće primijeniti G-CSF, indicirana je antimikrobna profilaksa ako se radi o MDS-u nepovoljne citogenetike, s niskom razinom hemoglobina i trombocita, a incidencija teških infektivnih komplikacija značajno raste ako je razina neutrofilnih granulocita manja od 700/mcL. (11).

Većina autora ipak ističe kako su navedene preporuke uglavnom osobna iskustva koja nisu provjereni u randomiziranim prospektivnim kliničkim studijama.

Novije smjernice pojedinih hematoloških grupa kod MDS-bolesnika preporučuju uvođenje G-CSF-a uz preporuke o načinu i dužini primjene.

Tako Bejar i suradnici u prijedlogu terapijskog algoritma o liječenju MDS bolesnika niskog rizika, preporučuju uvođenje G-CSF-a kod bolesnika s anemijom i neutropenijom (s ili bez trombocitopenije) uz ESA ako je razina serumskog EPO $< 500 \text{ u/L}$ (3).

Europska grupa za medicinsku onkologiju (ESMO) u svojim kliničkim smjernicama za dijagnostiku, terapiju i praćenje bolesnika s MDS-om,

navodi kako samo 7% bolesnika s MDS-niskog rizika ima broj leukocita manji od $1500/\text{mm}^3$ te je u toj skupini neutropenija rijetko povezana s opasnim infektivnim komplikacijama, ako se popratno ne koriste lijekovi koji pogoršavaju neutropeniju.

U takvim slučajevima, primjenom G-CSF-a može se poboljšati neutropenija kod 60-75% bolesnika, te se granulocitni čimbenik rasta može koristiti kao profilaksa neutropenijske vrućice uz antimikrobne lijekove. Dugotrajnija primjena G-CSF-a nije pokazala značajnijeg utjecaja na preživljenje (16).

ESMO u svojim smjernicama izdvaja MDS bolesnike niskog rizika kod kojih je primjena G-CSF-a opravdana ako se radi o bolesnicima sa simptomatskom anemijom i bez del5q, u kombinaciji s ESA. Druga grupa izdvaja MDS-bolesnike niskog rizika sa simptomatskom neutropenijom i infektivnim komplikacijama, ali se ističe kratkotrajna primjena (16).

Malcovati ispred ELN-MDS grupe u terapijskom algoritmu također navodi mogućnost primjene G-CSF-a uz ESA ako se radi o MDS-u niskog IPSS rizika, te ako je razina serumskog EPO niža od $500\text{mU}/\text{ml}$, a ako se nakon 6-8 tjedana monoterapije s ESA nije postigao zadovoljavajući terapijski odgovor (17).

Kod MDS-bolesnika intermedijarnog-1 IPSS rizika, može se dodati G-CSF uz ESA kod simptomatske anemije, ukoliko je razina serumskog EPO niža od $500\text{mu}/\text{ml}$ i bolesnik zahtijeva manje od 2 transfuzije filtriranih eritrocita mjesечно (16,17).

Britansko društvo za standarde u hematologiji izdvaja grupu MDS-bolesnika sa sideroblastičnim fenotipom koji bi mogli imati terapijski odgovor na ESA u kombinaciji s G-CSF-om. Bolesnici bi trebali biti liječeni kroz maksimalno 16 tjedana, a procjena uvodne terapije ESA+/- G-CSF bila bi učinjena nakon 8 tjedana (18).

Većina autora se slaže da izostanak odgovora ili slabiji odgovor na terapiju ESA nakon 6-8 tjedana, nije razlog za ukidanje terapije, nego se treba pokušati dodati G-CSF i procijeniti odgovor nakon sljedećih 6-8 tjedana.

NCCN smjernice preporučuju G-CSF kod neutropeničnih MDS-bolesnika s čestim ili rezistentnim bakterijskim infekcijama (19).

Zaključak

Čimbenici rasta neutrofilnih granulocita polako zauzimaju mjesto u terapijskim algoritmima bolesnika s MDS-om.

Dosadašnja klinička praksa pokazala je opravdanost njihove primjene u kombinaciji s eritropoetinom, kod neutropeničnih bolesnika sa čestim ili rezistentnim bakterijskim infekcijama te uz terapiju mijelosupresivnim citostaticima radi prevencije odgađanja ciklusa liječenja. Iako većina studija ograničava primjenu kod bolesnika niskog ili intermedijarnog-1 rizika, sve veća primjena hipometilirajućih lijekova dovela je do širenja terapijske indikacije i kod bolesnika visokog rizika, a u svrhu sprječavanja infektivnih komplikacija ili odgode ciklusa liječenja. Potrebno je ubuduće definirati dozu i dužinu primjene G-CSF-a, s obzirom na to da su dosadašnje preporuke osobna iskustva pojedinih autora, a prospektivne randomizirane kliničke studije nisu napravljene.

Literatura

1. Fenaux P. Myelodysplastic syndrome: state of the art pathology, diagnosis and management. Best Pract Res Clin Haematol. 2013;26:307-8.
2. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J et al. Revised IPSS for MDS. Blood. 2012.
3. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. Blood. 2014 Oct 30; 124(18):2793-803.
4. Kalaycio M1, Rybicki L, Pohlman B, Sobecks R, Andresen S, Kuczkowski E, Bolwell B Risk factors before autologous stem-cell transplantation for lymphoma predict for secondary myelodysplasia and acute myelogenous leukemia. J Clin Oncol. 2006;24(22):3604-10.
5. Steensma DP. Hematopoietic growth factors in myelodysplastic syndromes. Semin Oncol. 2011; 38(5):635-47.
6. Vadhan-Raj S, Keating M, LeMaistre A, Hittelman WN, McCredie K, Trujillo JM, Broxmeyer HE, Henney C, Guterman JU. Effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndromes. N Engl J Med. 1987;317(25):1545-1552.
7. Willemze R, van der Lely N, Zwierzina H, Suciu S, Solbu G, Gerhartz H, Labar B, Visani G, Peetermans ME, Jacobs A, et al. A randomized phase-I/II multicenter study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) therapy for patients with myelodysplastic syndromes and a relatively low risk of acute leukemia. EORTC Leukemia Cooperative Group. Ann Hematol. 1992;64(4):173-80.
8. Dayyani F1, Conley AP, Strom SS, Stevenson W, Cortes JE, Borthakur G, Faderl S, O'Brien S, Pierce S, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. Cancer. 2010;116(9):2174-9.

9. Andréa Toma, Pierre Fenaux, François Dreyfus, Catherine Cordonnier Infections in myelodysplastic syndromes. Haematologica. 2012;97:1459-1470.
10. Adès L1, Boehrer S, Prebet T, Beyne-Rauzy O, Legros L, Ravoet C, Dreyfus F, Stamatoullas A, Chaury MP, Delaunay J, Laurent G, Vey N, Burcheri S, Mbida RM, Hoarau N, Gardin C, Fenaux P. Efficacy and safety of lenalidomide in intermediate-2 or high-risk myelodysplastic syndromes with 5q deletion: results of a phase 2 study. Blood. 2009;113(17):3947-52.
11. Valeria Santini, Thomas Prebet, Pierre Fenaux, Norbert Gattermann, Lars Nilssone, Michael Pfeilstöcker, Paresh Vyasg, Alan F. Listh Minimizing risk of hypomethylating agent failure in patients with higher-risk MDS and practical management recommendations. Leukemia Research. 2014;38(12):1381–1391.
12. Greenberg P, Taylor K, Larson R, et al. Phase III randomized multicenter trial of recombinant human G-CSF in MDS. Blood. 2009;113(17):3947-52.
13. Kam Newman, Lori Maness-Harris, Ihab El-Hemaidi, Mojtaba Akhtari. Revisiting Use of Growth Factors in Myelodysplastic Syndromes. Asian Pacif J Cancer Prev. 2012;13:1081-1091.
14. Hellström-Lindberg E, van de Loosdrecht A. Erythropoiesis stimulating agents and other growth factors in low-risk MDS. Best Pract Res Clin Haematol. 2013;26(4):401-10.
15. Jadersten M, Montgomery SM, Dybedal I et al. Long-term outcome of treatment of anemia in MDS with erythropoietin and G-CSF. Blood 2005;106:803-811.
16. P. Fenaux, D. Haase, G. F. Sanz, V. Santini, C. Buske Myelodysplastic syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2014; 25 (suppl 3): iii57-iii69.
17. Malcovati L1, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, Del Cañizo C, Della Porta MG, Fenaux P, Gattermann N, Germing U, Jansen JH, Mittelman M, Mufti G, Platzbecker U, Sanz GF, Selleslag D, Skov-Holm M, Stauder R, Symeonidis A, van de Loosdrecht AA, de Witte T, Cazzola M; European Leukemia Net. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. Blood. 2013;122(17):2943-64.
18. Killick, S.B., Carter, C., Culligan, D., Dalley, C., Das-Gupta, E., Drummond, M., Enright, H., Jones, G. L., Kell, J., Mills, J., Mufti, G., Parker, J., Raj, K., Sternberg, A., Vyas, P. & Bowen, D. and British Committee for Standards in Haematology Guidelines for the diagnosis and management of adult myelodysplastic syndromes. Br J Haemat. 2014;164:503–525.
19. Myelodysplastic syndrome, NCCN guidelines version 1.2015.

Primjena eritropoetina u mijelodisplastičnom sindromu

Dr. sc. Marko Martinović, dr. med.

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

Barem 80 % pacijenata s MDS-om pri dijagnozi ima normocitnu ili makrocitnu anemiju (1), s time da oko 50 % pacijenata ima razinu hemoglobina manju od 100 g/L (1). Uz uobičajene simptome kao što su slabost, nemoć, intolerancija napora, javljaju se simptomi i arterijske insuficijencije s obzirom na to da je većina pacijenata starija od 65 godina: bol u prsima, glavobolja, vrtoglavica, poremećaji kognitivnih funkcija, klaudikacija. Značaj razine anemije je prepoznat i od strane talijansko-njemačke grupe hematologa koja je osmisnila WPSS (2).

Slika 1.

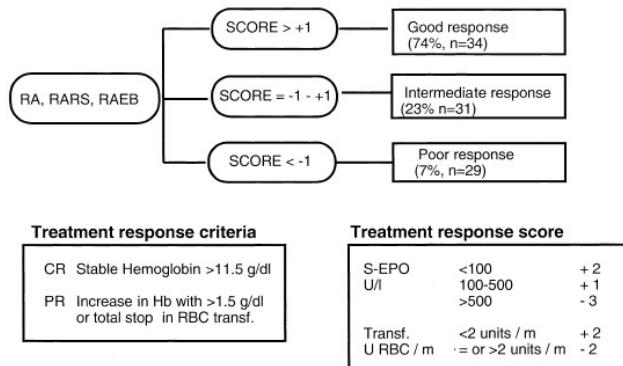
Prognostic Category	WPSS Prognostic Score Value			
	0	1	2	3
WHO category	RCUD, RARS, MDS with isolated del(5q)	RCMD	RAEB-1	RAEB-2
Cytogenetics	Good	Intermediate	Poor	
Severe anemia	Absent	Present		

Cytogenetics are based on IPSS groups
Severe anemia defined as hemoglobin < 9 g/dL in males or < 8 g/dL in females

Risk Category	Risk Score
Very low	0
Low	1
Intermediate	2
High	3-4
Very high	5-6

Razvojem bolesti povećava se vjerojatnost nastanka ovisnosti o transfuzijama eritrocita (TKE). Kod niskorizične 39%, kod intermedijarne-1 50%, intermedijarne-2 63%, te visokorizične skupine pacijenata prema IPSS-u će 79% razviti ovisnost o TKE-u (3). Razina hemoglobina niža od 90 g/L u muškaraca odnosno 80 g/L u žena je neovisno vezana na sniženo ukupno preživljjenje, te viši rizik smrti neovisnih o leukemiji i srčanih uzroka smrti (4). Simptomatska anemija kod niskorizičnih tipova MDS-a može se liječiti: transfuzijama koncentrata eritrocita, faktorima rasta, imunosupresivima, lenalidomidom (posebno kod tipa s izoliranom delekcijom 5q). Prema Međunarodnoj radnoj skupini poboljšanjem se smatra razina hemoglobina iznad 110 g/L (5). Transfuzija eritrocita se obično primjenjuje kod asimptomatskih pacijenata pri Hgb ≤80 g/L, no

prag primjene ovisi o dobi, prisutnosti simptoma anemije te komorbiditetima. Preporučuju se filtrirani koncentrati eritrocita (KE) radi umanjivanja rizika potencijalnih komplikacija (izosenzitizacija, trombocitima, infekcija virusima npr. CMV-om, febrilne reakcije, imunosupresija). Prednosti TKE-a su brzo postizanje nestanka simptoma anemije, dostupnost i djelotvornost. Mane TKE-a su preopterećenje željezom – sekundarna hemokromatoza, te rizik razvoja multiplih aloantitijela. Eritropoetin potiče eritropoezu preveniranjem apoptoze eritroidnih progenitora, a do nedjelotvornosti endogenog eritropoetina dolazi zbog jake upalne citokinske aktivnosti, poremećene signalizacije receptora, neadekvatne reakcije na hipoksiju u smislu preniske sekrecije eritropoetina te pojačane apoptoze kao značajke MDS-a. Lijekovi za stimuliranje eritropeze mogu smanjiti ili minimizirati potrebu za transfuzijama kod pacijenata s niskim ili umjereno rizičnim oblicima MDS-a (po IPSS skoru), ciljna grupa su pacijenti s razinom serumskog eritropoetina ≤ 500 mU/ml i potrebom za transfuzijom KE < 2 jedinice/mjesečno (6). Noridijska skupina je razvila lako primjenjiv model za predviđanje odgovora na terapiju eritroetinom (7).



Na internetskim stranicama NCCN-a se lako mogu naći smjernice za doziranje različitih eritropoetina, kao i njihove nuspojave. Ovdje je prikaz usporedbe rizika i koristi primjene eritropetina u odnosu na TKE:



COMPARISON OF RISKS AND BENEFITS OF ESA USE VERSUS RED BLOOD CELL TRANSFUSION*

If anemia is not due to absolute or functional iron deficiency, there are currently only two proven methods of improving Hb: ESAs and red blood cell transfusion. Listed below are risks and benefits of each method.

		ESA in the Cancer Setting	Red Blood Cell Transfusion
Risks	<ul style="list-style-type: none"> Increased thrombotic events Possible decreased survival Time to tumor progression shortened 	<ul style="list-style-type: none"> Transfusion reactions (eg, hemolytic, febrile, non-hemolytic, lung injury) TACO Virus transmission (eg, hepatitis, HIV) Bacterial contamination Iron overload Increased thrombotic events Possible decreased survival 	
Benefits	<ul style="list-style-type: none"> Transfusion avoidance Gradual improvement in anemia-related symptoms 	<ul style="list-style-type: none"> Rapid increase of Hb and hematocrit levels Rapid improvement in anemia-related symptoms 	

Eritropoetin nije registriran za primjenu u MDS-u, ali primjenu epoetina preporučuju American Society of Hematology (ASH), American Society of Clinical Oncology (ASCO) i National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Pacijenti s niskim ili umjereno-1 rizičnim oblikom MDS-a izuzeti su od općih preporuka ASH-a i ASCO-a da se izbjegavaju eritropoetini u liječenju anemije koja je posljedica maligne bolesti kod pacijenata koji ne primaju mijelosupresivnu kemoterapiju. Ako je primjena eritropetina neuspješna, nakon 3 mjeseca se mogu dodati kod pacijenata s anemijom teškog stupnja ili nakon 6 mjeseci kod anemije srednje teškog stupnja. Brojne publikacije potvrđuju sigurnu primjenu eritropoetina u MDS pacijenata, kao što su meta-analize u kojoj su autori Ross i suradnici ukazali na

učinkovitost eritropoetina u liječenju anemije (8), Moyo i suradnici procjenjivali odgovor na liječenje monoterapijom epoetinom te uspoređivali epoetin alfa i darbepoetin alfa (9), Mundle i suradnici uspoređivali eritropetin G-CSF ili GM-CSF (10), dok su Azzara sa suradnicima retrospektivno procjenjivali učinkovitost eritropoetina alfa (11), a Greenberg sa suradnicima prospektivno procjenjivao učinkovitost i sigurnost eritropoetina s ili bez G-CSF-a (12). U prilog neodobrenoj („off label“) upotrebi eritropetina u liječenju bolesnika s MDS-om pokazala je presječna studija francuske skupine u kojoj je 39.5% oboljelih dobivalo jedan od eritropoetina (13). U Republici Hrvatskoj je dostupno nekoliko eritropoetina, a farmakoekonomska analiza prema aktualnim cijenama izgleda ovako:

kratkodjelući eritropoetin	darbopoetin
150 - 300 IU/kg 3 x tjedno	40.000 IU 1 x tjedno
	2,25 mg/kg 1 x tjedno
	500 mg svaka 3 tjedna

Retacrit 12.000 - 24.000 IU 3 x tjedno	Retacrit 40.000 IU 1 x tjedno	Aranesp 180 mg 1 x tjedno	Aranesp 500 mg svaka 3 tjedna
425,59 - 849,93 kn 3 x tjedno	1.399,57 kn 1 x tjedno	2.182,20 kn 1 x tjedno	6.061,64 kn 1 x tjedno
5.107,04 - 10.198,00 kn mjesečno	5.598,29 kn mjesečno	8.728,80 kn mjesečno	8.082,19 kn mjesečno

Aktualna cijena 4 doze koncentrata eritrocita je 2.297,68 kn. Zaključno: kronične transfuzije značajno smanjuju kvalitetu života MDS pacijenata, dok eritropoetin omogućuje simptomatsko liječenje anemija u značajnog broja pacijenata s MDS-om. Nadalje, eritropoetin može poboljšati preživljjenje pogotovo kod pacijenata s razinom serumskog eritropoetina ≤ 500 mU/mL i potrebom za transfuzijom KE < 2 jedinice/mjesečno (6), s time da simultana primjena G-CSF-a ima sinergistički učinak.

Literatura

1. Steensma DP, Bennett JM: The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc. 2006;81:104 J Clin Oncol. 2007;25(23):3503-10.
2. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, Della Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Giagounidis A, Hildebrandt B, Bernasconi P, Knipp S, Strupp C, Lazzarino M, Aul C, Cazzola M: Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol. 2007;25(23):3503-10.
3. Jabbour E, Kantarjian HM, Koller C, Taher A: Red blood cell transfusions and iron overload in the treatment of patients with myelodysplastic syndromes. Cancer. 2008;112(5):1089-95.
4. Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, Ambaglio I, Kuendgen A, Nachtkamp K, Travagliano E, Invernizzi R, Pascutto C, Lazzarino M, Germing U, Cazzola M: Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). Haematologica. 2011;96(10):1433-40.
5. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, Pinto A, Beran M, de Witte TM, Stone RM, Mittelman M, Sanz GF, Gore SD, Schiffer CA, Kantarjian H: Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. Blood. 2006;108(2):419-25.
6. Hellström-Lindberg E, Gulbrandsen N, Lindberg G, Ahlgren T, Dahl IM, Dybedal I, Grimfors G, Hesse-Sundin E, Hjorth M, Kanter-Lewensohn L, Linder O, Luthman M, Löfvenberg E, Oberg G, Porwit-MacDonald A, Rådlund A, Samuelsson J, Tangen JM, Winquist I, Wisloff F; Scandinavian MDS Group: A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. Br J Haematol. 2003;120:1037.
7. Hellström-Lindberg E, Gulbrandsen N, Lindberg G, Ahlgren T, Dahl IM, Dybedal I, Grimfors G, Hesse-Sundin E, Hjorth M, Kanter-Lewensohn L, Linder O, Luthman M, Löfvenberg E, Oberg G, Porwit-MacDonald A, Rådlund A, Samuelsson J, Tangen JM, Winquist I, Wisloff F; Scandinavian MDS Group: A validated decision model for treating the anaemia of myelodysplastic syndromes with erythropoietin + granulocyte colony-stimulating factor: significant effects on quality of life. Br J Haematol. 2003;120(6):1037-46.
8. Ross SD, Allen IE, Probst CA, Sercus B, Crean SM, Ranganathan G: Efficacy and safety of erythropoiesis-stimulating proteins in myelodysplastic syndrome: a systematic review and meta-analysis. Oncologist. 2007;12(10):1264-73.
9. Moyo V, Lefebvre P, Duh MS, Yektashenas B, Mundle S: Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. Ann Hematol. 2008;87(7):527-36.
10. Mundle S, Lefebvre P, Vekeman F, Duh MS, Rastogi R, Moyo V.: An assessment of erythroid response to epoetin alpha as a single agent versus in combination with granulocyte- or granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor in myelodysplastic syndromes using a meta-analysis approach. Cancer. 2009;115(4):706-15.
11. Azzarà A, Carulli G, Galimberti S, Baratè C, Fazzi R, Cervetti G, Petrini M.: High-dose (40,000 IU twice/week) alpha recombinant human erythropoietin as single agent in low/intermediate risk myelodysplastic syndromes: a retrospective investigation on 133 patients treated in a single institution. Am J Hematol. 2011;86(9):762-7.
12. Greenberg PL, Sun Z, Miller KB, Bennett JM, Tallman MS, Dewald G, Paietta E, van der Jagt R, Houston J, Thomas ML, Cella D, Rowe JM.: Treatment of myelodysplastic syndrome patients with erythropoietin with or without granulocyte colony-stimulating factor: results of a prospective randomized phase 3 trial by the Eastern Cooperative Oncology Group (E1996). Blood. 2009;114(12):2393-400.
13. Kelaidi C, Stamatoullas A, Beyne-Rauzy O, Raffoux E, Quesnel B, Guerci A, Dreyfus F, Brechignac S, Berthou C, Prebet T, Hicheri Y, Hacini M, Delaunay J, Gourin MP, Camo JM, Zerazhi H, Taksin AL, Legros L, Choufi B, Fenaux P: Daily practice management of myelodysplastic syndromes in France: data from 907 patients in a one-week cross-sectional study by the Groupe Francophone des Myélodysplasies. Haematologica. 2010;95:892-899.

Azacitidin u liječenju mijelodisplastičnog sindroma

Neno Zovko, Inga Mandac Rogulj

Adresa autora za kontaktiranje:

Inga Mandac Rogulj, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Merkur, Zagreb

E-pošta: imandac@yahoo.com

Uvod

Mijelodisplastični sindrom (MDS) obuhvaća heterogenu skupinu klonalnih zločudnih tumora hematopoetskog sustava sa zajedničkim obilježjem hipercelularne i displastične koštane srži s nedjelotvornom hematopoezom i posljedičnom citopenijom u perifernoj krvi, te rizikom transformacije u akutnu leukemiju (1,2).

Kriterij za citopeniju u MDS-u je hemoglobin niži od 100 g/L, apsolutni broj neutrofila (ANC) niži od $1,8 \times 10^9/L$ i broj trombocita niži od $100 \times 10^9/L$. Displazija može biti udružena s povišenom razinom mijeloblasta u perifernoj krvi i koštanoj srži.

Postotak blasta u koštanoj srži, povećan broj citopenija i abnormalni kariotip, pokazali su se kao najvažniji nezavisni prognostički čimbenici loše prognoze u MDS-u, zbog čega je i definiran međunarodni prognostički indeks (IPSS) koji bolesnike svrstava u 4 podgrupe te izdvaja i one posebno rizične za progresiju u AML.

WHO prognostički sustav (WPSS) uključuje i WHO klasifikaciju te ovisnost o transfuzijama eritrocita, dok revidirani IPSS (R-IPSS) uzima u obzir citogenetske abnormalnosti, broj i težinu citopenija te postotak blasta.

Bolesnici sa MDS-om srednjeg (INT-2) i visokog rizika imaju preživljenje od 0.4 do 1.2 godine, kao i visok rizik od progresije bolesti u akutnu mijeloičnu leukemiju (AML) (3).

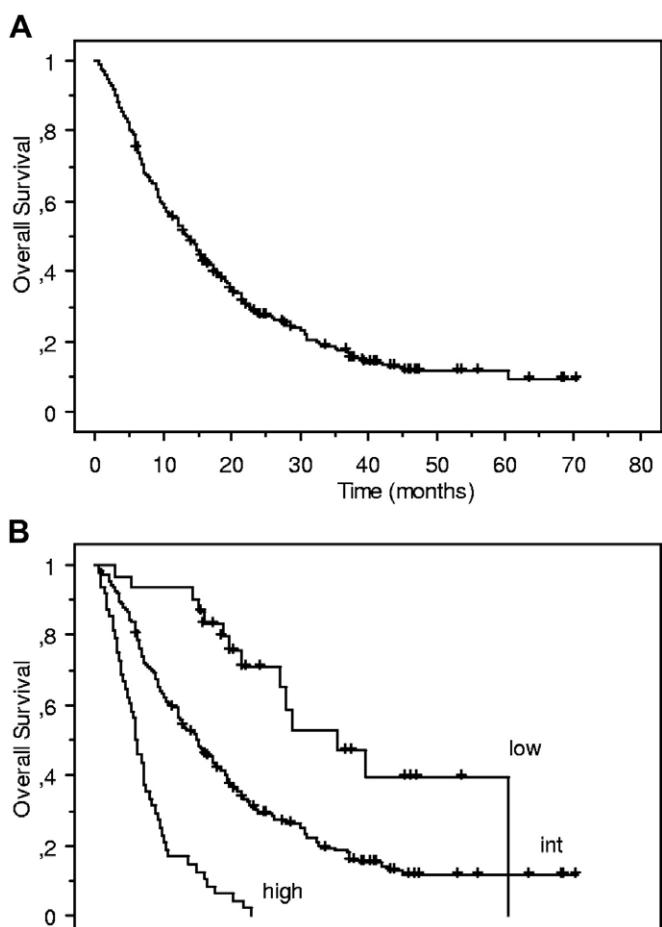
Jedini oblik liječenja s potencijalom izlječenja je alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica koja je danas indicirana kod MDS bolesnika visokog rizika po IPSS.

Većina bolesnika nije podobna za ovaj oblik liječenja zbog životne dobi (medijan dobi pri dijagnozi je 74 godine) (4), nedostatka podudarnog donora ili pridruženih komorbiditeta. Takav oblik liječenja može dovesti do preživljjenja bez znakova relapsa kod 35-50% bolesnika.

Najrašireniji oblik liječenja koji se primjenjuje je potporno liječenje koje se sastoji od transfuzija krvnih pripravaka i uporabe antimikrobnih lijekova kako bi se smanjio broj infektivnih komplikacija (5).

Dosadašnja iskustva u primjeni azacitidina

Američka agencija za hranu i lijekove (eng. US Food and Drugs Administration, FDA) 2004. godine je prihvatile hipometilirajuću tvar, azacitidin, za liječenje MDS-a, na temelju značajnog produljenja vremena do transformacije MDS-a u AML i smrти bolesnika u usporedbi s potpornom terapijom (6). Upravo iz navedenog razloga, azacitidin je prepoznat kao nova "prva linija terapije" (engl. *first-line therapy*) u liječenju bolesnika s MDS-om, i to upravo onih koji imaju visok rizik za progresiju bolesti u AML, bolesnika koji imaju INT-2 ili MDS visokog rizika. Točan mehanizam djelovanja azacitidina još uvijek nije u potpunosti poznat. Nepravilna, aberantna DNA metilacija u promotorskim regijama bogatim citozinskim i gvaninskim dinukleotidima (CpG otočići) pokazala se važnom u patogenezi MDS-a (7). Dodavanje metilnih grupa (metilacijom) na 5' položaj citozinskih nukleotida u CpG otočićima pretežno je katalizirano enzimom znanim kao DNA metiltransferaza (DNAMT), i u konačnici vodi utišavanju gena koji su uključeni u normalnu mijeloidnu diferencijaciju. Azacitidin je analog citozinskog nukleotida koji inhibira DNAMT, tako da se ireverzibilno inkorporira u nukleinsku kiselinu za vrijeme S-faze staničnog ciklusa i blokira djelovanje enzima. Azacitidin postaje biološki aktiviran tako što se fosforilira uridin-citidin kinazom i pretežno se ugrađuje u ribonukleinsku kiselinu (RNA), dok se otprilike samo 10% takvog fosforiliziranog azacitidina inkorporira u deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA). Redukcijom DNA metilacije i promjenom ekspresije gena mogla bi se održati normalna hematopoeza. Iako su pretkliničke studije pokazale da azacitidin inducira hipometilaciju i uzrokuje citotoksični efekt, studije do sada nisu pokazale definitivnu povezanost između stupnja hipometilacije i kliničkog odgovora na terapiju (7).



Ukupno preživljenje 282 bolesnika sa MDS-visokog rizika liječenih azacitidinom, medijan praćenja 41,3 mjeseca

Raphael Itzykson et al. Blood. 2012;119:6172-3.

Dvije velike randomizirane kliničke studije su ispitivale učinak azacitidina kod bolesnika s MDS-om. Prva studija koju je provela Cancer and Leukemia Group B uključivala je 191 MDS bolesnika, neovisno o stupnju rizika bolesti, randomiziranih u dvije skupine u kojoj je jedna skupina primala azacitidin u dozi 75 mg/m^2 tjelesne površine kroz 7 dana svakih 4 tjedna, dok je druga primala samo potpornu terapiju. Odgovor na terapiju je bio kod 60% bolesnika liječenih azacitidinom, te samo 5% kod onih koji su primali potpornu terapiju. U skupini bolesnika koji su primali azacitidin kompletan remisija (KR) je postignuta u 7%, parcijalna remisija (PR) u 16% i poboljšanje hematoloških parametara u 37% bolesnika. U bolesnika kod kojih je jedina terapija bila najbolja potporna terapija nije postignuta niti jedna PR, ni KR. Medijan odgovora na terapiju je bio 15 mjeseci. Bolesnici koji su primali azacitidin su osjetili poboljšanje kvalitete života izraženo kroz Health-Releated Quality Of Life (HRQoL) uključujući umor, fizički napor, osjećaj zaduhe, psihosocijalni nemir i pozitivni utjecaj. Preživljenje u azacitidinskoj skupini je bilo povoljnije nego u skupini

koja je primala samo potpornu terapiju, 20 mjeseci prema 14 mjeseci (6).

Druga, faza III kliničkog ispitivanja je uključivala samo pacijente s INT-2 i visokim rizikom prema International Prognostic Score System (IPSS), njih ukupno 358. Bili su randomizirani prema azacitidinu ili jednom od tri standardna terapijska protokola. Bolesnici koji su bili kontrola primali su samo potpornu terapiju, niske doze citarabina ili inducijsku kemoterapiju koja je prethodila randomizaciji. Nakon medijana praćenja od 21.1 mjeseca primijećeno je dulje vrijeme preživljivanja kod bolesnika liječenih azacitidinom koje je iznosilo 24.5 mjeseci u odnosu na 15 mjeseci kod bolesnika liječenih na ostala tri načina ($p=0.0001$), neovisno o dobi bolesnika, postotku blasta u koštanoj srži i kariotipu. 17 % bolesnika liječenih azacitidinom je postiglo KR, a 12 % PR. U kontrolnoj skupini 8 % je postiglo KR, a 4 % PR. Poboljšanje hematoloških parametara je uočeno kod 49 % prema 29 % (8).

Danas se azacitidin preporučuje kao prva linija terapije u bolesnika s MDS-om INT-2 ili visokog rizika jer se većini bolesnika liječenih azacitidinom produljuje vrijeme bez znakova progresije bolesti i poboljšava kvalitetu života (9).

Na početku liječenja se preporučuje primjeniti azacitidin u dozi od 75 mg/m^2 tjelesne površine kroz 7 dana s pauzom od četiri tjedna. Druga shema koja je u širokoj upotrebi je shema 5-2-2, pri čemu bolesnici dobivaju 75 mg/m^2 tjelesne površine dnevno kroz 5 dana, nakon toga 2 dana bez terapije (najčešće preko vikenda) i ponovno terapija kroz 2 dana, te se shema ponavlja nakon 4 tjedna. Učinkovitost sheme 5-2-2 u odnosu na sedmodnevnu shemu do sada nije evaluirana u prospektivnim randomiziranim kliničkim studijama, iako rezultati dviju studija podupiru upravo shemu 5-2-2 (10,11).

Preporučuje se da bolesnici primaju azacitidin kroz najmanje 6 mjeseci, a ako se kod bolesnika utvrdi stabilna bolest (SB), terapija bi se trebala nastaviti sve dok ne dođe do progresije bolesti ili dok se pojavi neprihvatljiva toksičnost azacitidina. Dosadašnje studije pokazuju kako je rizik progresije MDS-a u AML u prvih 6 mjeseci terapije do 8 puta manji, nego uz najbolju moguću potpornu terapiju. Terapija azacitidinom se ne bi trebala prekidati kada bolesnik dosegne svoj maksimalan odgovor na terapiju, osim u slučaju kada remisija bolesti traje više od 12 mjeseci, iako su i u ovakvim slučajevima odluke uglavnom individualizirane (12). Kod pojedinih bolesnika na terapiji azacitidinom terapijski odgovor može se održavati i kroz više od 15 ciklusa,

ali veliki broj bolesnika ipak uđe u progresiju.

Krvni parametri se često mogu pogoršati u prvih nekoliko ciklusa terapije dok se ne primijeti pozitivan odgovor na terapiju. S obzirom na mijelosupresiju koja nastaje tijekom terapije, pojedini autori preporučuju i redukciju doze azacitidina na 100 mg dnevno, ako se reevaluacijom uoči citopenija, bez prisustva blasta u koštanoj srži. Oporavak hematoloških parametara nakon završetka ciklusa azacitidinom uglavnom se uoči nakon 2 tjedna (trombociti 15 dana, neutrofilni granulociti 16 dana, anemija 14 dana) (12). U slučaju prolongirane neutropenije, može se odgoditi novi ciklus na 35 dana, iako ta preporuka nije uključena u službene smjernice. Santini kod starijih bolesnika s prolongiranom teškom neutropenijom ($ANC < 500/\mu\text{L}$) savjetuje primjenu G-CSF, ali ne u tijeku ciklusa azacitidinom. Kako je trajanje neutropenije duže nego kod bolesnika s AML, savjetuje se i primjena antifungalnih lijekova u profilaksi (13).

Većina bolesnika osjetljivih na terapiju dosegne prvi klinički terapijski odgovor oko šestog ciklusa terapije. Gotovo polovina svih bolesnika osjetljivih na terapiju ima kontinuirano poboljšanje hematoloških parametara i hematološko poboljšanje od prvog terapijskog odgovora sve do postizanja PR ili KR (12), dok 92% osjetljivih dosegne maksimalan terapijski odgovor oko 12. ciklusa terapije azacitidinom (14).

Citološku punkciju koštane srži bi trebalo učiniti 4 ili 6 i 12 mjeseci od početka terapije i ponovno u slučaju sumnje na progresiju bolesti ili pojave toksičnosti azacitidina (12).

Studijom provedenom u Nizozemskoj pokazalo se da bi rani porast broja trombocita za najmanje dvostruku vrijednost nakon prvog ciklusa terapije azacitidinom mogao biti pozitivni prediktor dobrog budućeg terapijskog odgovora svih triju hematopoetskih loza, remisije bolesti i duljeg preživljjenja bolesnika (15).

Francuska grupa je 2011. godine prikazala rezultate liječenja MDS-a visokog rizika azacitidinom te su naveli kako je grupa bolesnika s postotkom blasta u koštanoj srži ispod 15%, uz uredan kariotip, bez ranijeg liječenja niskim dozama citarabina imala bolji odgovor na azacitidin. Neovisni čimbenici koji su bili povezani s kraćim ukupnim preživljjenjem, uključili su ovisnost o transfuzijama eritrocita (>4 doze/8 tj.), loš ECOG (>2), intermedijarni ili visoki IPSS citogenetski rizik te prisutnost cirkulirajućih blasta. Ove su čimbenike kombinirali u jednostavni prognostički model nazvan francuskim prognostičkim indeksom za azacitidin, definirajući 3 grupe

bolesnika sa značajno različitim preživljjenjem (međijan OS nije postignut, 15 mј. i 6,1 mј.) (16).

Alhan i suradnici su kod 42 bolesnika s MDS-om intermedijarnog-2 i visokog rizika procjenjivali prediktivnu važnost protočne citometrije u odgovoru na terapiju azacitidinom. Prisutnost mijeloidnih progenitora s aberantnim imunofenotipom je značajno utjecala na izostanak terapijskog odgovora, a prognostički indeks definiran je uz korištenje bodovnog indeksa protočne citometrije (FCSS). Značajno niži FCSS uočen je kod bolesnika koji su nakon 3 ciklusa azacitidina postigli kompletan odgovor, u odnosu na one s progresijom bolesti (17).

Primjena azacitidina kod MDS bolesnika visokog rizika, a koji su kandidati za alogeničnu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica analizirana je u brojnim kliničkim studijama. Usپoređivani su bolesnici kod kojih je predtransplantacijski pristup bila najbolja moguća potporna terapija ili azacitidin, a po Damaj i suradnicima, nije nađeno značajne razlike u mortalitetu bez znakova relapsa nakon alo-transplantacije (18). Slično je pokazao Gerds kod 68 bolesnika kod kojih je usپoređivana predtransplantacijska terapija intenzivnim liječenjem u odnosu na azacitidin (19).

Većina autora zaključuje kako bi odluka o predtransplantacijskom liječenju trebala biti individualna, ali kod MDS bolesnika visokog rizika, ako kod dijagnoze imaju postotak blasta u koštanoj srži 10-19%, nije preporučljivo čekati 3 do 4 mjeseca odgovarajućeg donora i bolesnika ostaviti bez citostatske terapije.

Zaključak

Unatoč značajnim promjenama u liječenju bolesnika s MDS-om, osobito onih s visokim rizikom, postotak bolesnika sa zadovoljavajućim terapijskim odgovorom je nezadovoljavajući. Otkada su azacitidin, lenalidomid i decitabin u razdoblju od 2004. do 2006. odobreni od FDA, nije bilo novoodobrenih lijekova u zadnjih 9 godina.

Terapijski ciljevi u 2015. trebaju biti usmjereni na povećanje postotka bolesnika koji bi bolje odgovorili na terapiju hipometilirajućim lijekovima, pronaći kombinacije azacitidina s ostalim lijekovima koje bi možda mogle biti novi zlatni standard u prvoj liniji liječenja MDS bolesnika visokog rizika. Kako azacitidin ima svoje mjesto i u liječenju određenih grupa MDS bolesnika takozvanog „višeg“ niskog rizika, potrebno je definirati bolesnike kod kojih bi se povećao terapijski odgovor uz azacitidin kao mo-

noterapiju ili potpornu terapiju. Trenutno je u tijeku više od 15 kliničkih studija koje analiziraju terapijski učinak azacitidina s drugim otprije poznatim ili novim lijekovima.

Literatura

1. Fenaux P. Myelodysplastic syndrome: state of the art pathology, diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2013;26:307-8.
2. Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I, Vardiman JW, Hellstrom – Lindberg E. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (ed.) WHO Classification of Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition. International Agency for Research on Cancer, 2008.
3. Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2014;124(18):2793-803.
4. Williamson PJ, Kruger AR, Reynolds PJ. Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol.* 1994;87:743.
5. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2008;111(10):4841-51.
6. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol.* 2002;20:2429–40.
7. Shen L, Kantarjian H, Guo Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2009;28:605-13.
8. Gore SD, Fenaux P, Santini V, et al. A multivariate analysis of the relationship between response and survival among patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated within azacitidine or conventional care regimens in the randomized AZA-001 trial. *Haematologica.* 2013;98:1067-72.
9. Kornblith AB, Herndon JE 2nd, Silverman LR, et al. Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2002;20:2441–52.
10. Garcia R, De Miguel D, Bargay J, et al. Effectiveness of various dosage regimens of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes: safety and efficacy final data from the Spanish Azacitidine Compassionate Use Registry [abstract 1853]. *Blood.* 2010;116:772.
11. Lyons RM, Cosgriff TM, Modi SS, et al. Hematologic response to three alternative dosing schedules of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* 2009;27:1850–6.
12. Wells R.A., Dphil MD, Leber B, Zhu N.Y., Storring J.M. Optimizing outcomes with azacitidine: recommendations from Canadian centres of Excellence. *Curr Oncol.* 2014;21(1):44–50.
13. Santini V, Prebet T, Fenaux P, et al. Minimizing risk of hypomethylating agent failure in patients with higher-risk MDS and practical management recommendations. *Leuk Res.* 2014;38(12):1381-91.
14. Silverman LR, Fenaux P, Mufti GJ, et al. Continued azacitidine therapy beyond time of first response improves quality of response in patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 2011;117:2697–702.
15. van der Helm LH, Alhan C, Wijermans PW, et al. Platelet doubling after the first azacitidine cycle is a promising predictor for response in myelodysplastic syndromes (mds), chronic myelomonocytic leukaemia (cmml) and acute myeloid leukaemia (aml) patients in the Dutch azacitidine compassionate named patient programme. *Br J Haematol.* 2011;155:599–606.
16. Itzykson R, Thepot S, Quesnel B, et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood.* 2011;117(2):403-411.
17. Alhan C, Westers TM, van der Helm LH, Eeltink C, Huls G, Witte BI, Buchi F, Santini V, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA. Absence of Aberrant Myeloid Progenitors by Flow Cytometry is Associated with Favorable Response to Azacitidine in Higher Risk Myelodysplastic Syndromes. *Cytometry Part B.* 2014;86B:207–215.
18. Damaj G, Mohy M, Robin M, Beguin Y, Michallet M, Chevallier P, Beguin Y, et al. Upfront allogeneic SCT after reduced-intensity/nonmyeloablative conditioning for patients with myelodysplastic syndrome: a study by the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:1349-1355.
19. Gerds AT, Gooley TA, Estey EH, Appelbaum FR, Deeg HJ, Scott BL. Pretransplantation therapy with azacitidine vs induction chemotherapy and posttransplantation outcome in patients with MDS. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(8):1211-8.

EUREKA

Prof. dr. sc. Renata Zadro

*Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
Klinički bolnički centar Zagreb i
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: rzadro@mef.hr*

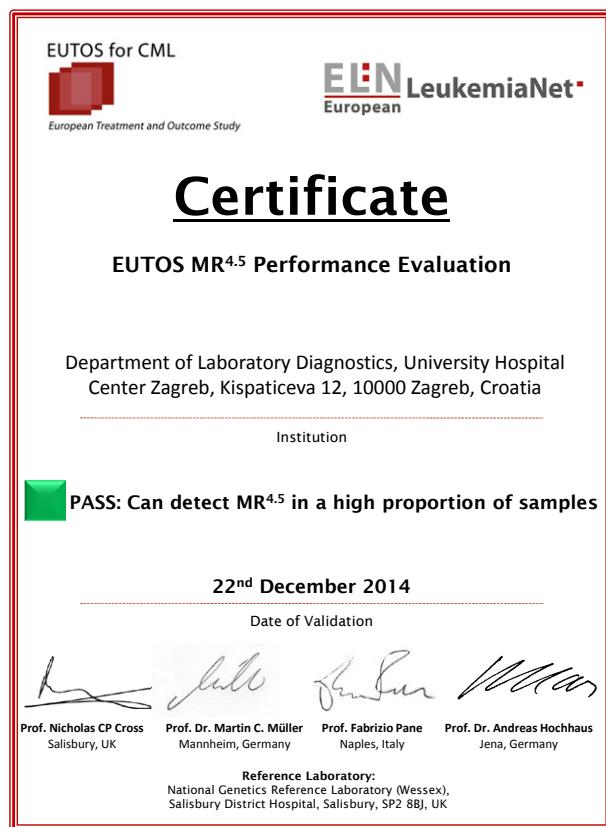
EUREKA (engl. *EUropean survey on the assessment of deep molecular REsponse in chronic phase CML patients after at least two years of therapy with tyrosine Kinase inhibitors*) je anketa na razini europskih laboratorija o postizanju dubokoga molekularnog odgovora u bolesnika u kroničnoj fazi CML-a (kronična mijeloična leukemija) nakon najmanje dvije godine terapije inhibitorima tirozin kinaze (TKI).

Svrha ovog registra projekta EUTOS (engl. *EUropean Treatment and Outcome Study*) Europske leukemijske mreže (engl. *European LeukemiaNet*, ELN) je prikupljanje podataka o standardiziranom molekularnom odgovoru u svakodnevnoj praksi izvan kliničkih studija. Pri tom je cilj pokazati izvedivost i pouzdanost procjene dubokoga molekularnog odgovora za sve bolesnike na području Europe.

ELN preporuča mjerjenje razine fuzijskog prijepisa bcr-abl1 kvantitativnom polimeraznom lančanom reakcijom (RQ-PCR) svaka 3 mjeseca. Prema aktualnim preporukama postizanje značajnoga molekularnog odgovora (MR³) nakon 12 mjeseci terapije inhibitorima tirozin kinaze smatra se optimalnim odgovorom na terapiju (1). Međutim, terapijom s djelotvornijim inhibitorima tirozin kinaze postiže se dublji odgovor za što su potrebne osjetljivije metode detekcije (2). Također, iskazano je zanimanje za postizanje komplettnog molekularnog odgovora (engl. *Complete Molecular Response*, CMR) jer je poznato da dio bolesnika nakon duljeg perioda s CMR može prekinuti terapiju s TKI i pri tom zadržati molekularnu remisiju (3). CMR je teško definirati pa su uvedene kategorije molekularnog odgovora MR⁴ i MR^{4.5} koje uključuju uzorce s pozitivnim i negativnim fuzijskim prijepisom bcr-abl1 sa definiranim osjetljivostima izraženim putem ekspresije kontrolnog (referentnog) gena (2).

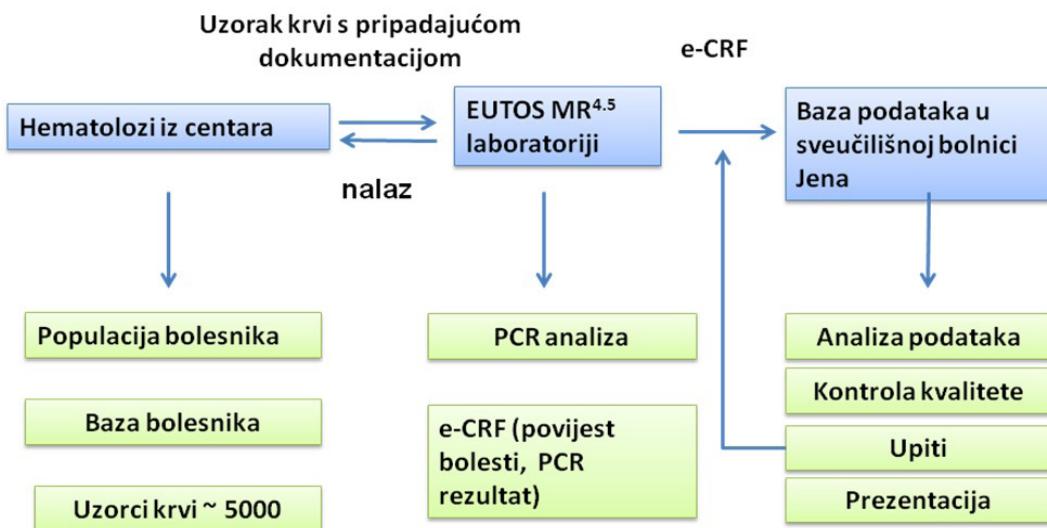
Bolesnici koji su pod terapijom najmanje 24 mjeseca će najvjerojatnije postići dublji molekularni odgovor što zahtijeva uporabu osjetljivih molekularnih metoda te su za provođenje ove ankete pozvani la-

boratoriji koji su prošli stroge kriterije za dobivanje certifikata MR^{4,5}. Među njima je i Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb (Slika 1.).



Slika 1. Potvrda 2. kruga evaluacije o postizanju MR^{4.5}.

Kriteriji uključenja u anketu su bolesnici (muškarci i žene stariji od 18 godina) s dijagnozom bcr-abl1 pozitivne CML u kroničnoj fazi na terapiji jednim ili više inhibitora tirozin kinaze najmanje 24 mjeseca i koji su potpisali informirani pristanak. Dvadeset (20) mL EDTA periferne krvi uzorkuje se kao dio rutinskog molekularnog praćenja i zajedno s ispunjenim CRF-om (engl. *Case Report Form*) se šalje u MR^{4.5} certificirani laboratorij. Uzorak krvi istog bolesnika se šalje jedanput ili više puta s razmakom od najmanje 10 tjedana tijekom 2 godine. Laboratorij nakon izvedene pretrage upisuje podatke s CRF-a zajedno s rezultatom u elektronski CRF koji se uključuje u bazu podataka EUREKA. Nalaz s rezultatom RQ-PCR-a se uobičajeno šalje liječniku koji je tražio pretragu (Slika 2.).



Slika 2. Dijagram tijeka ankete EUREKA.

Anketa će omogućiti uvid u postizanje dubokoga molekularnog odgovora nakon analize 5000 uzoraka koji će biti obrađeni u bazi podataka EUREKA u Sveučilišnoj bolnici Jena u razdoblju 2013. do 2015. godine. Time će se dobiti uvid u postotak CML bolesnika u Europi s postignutim MR^{4,5}. Dobiveni rezultati će potaknuti raspravu o učinkovitosti terapijskih protokola i promjeni preporuka kako bi što više bolesnika dostiglo TRF (engl. *Therapy Free Remission*).

Dodatak: Preporuke za izražavanje rezulta pretrage kvantitativni PCR bcr-abl1 u svrhu praćenja minimalne ostatne bolesti i procjene dubokoga molekularnog odgovora (4)

Procjena MR uz nemjerljivu bolest

Primjer 1.

- $bcr-abl1$ 10 kopija $abl1$ 45 400
- $bcr-abl1$ 10 kopija $abl1$ 69 500

Rezultat:

$$\frac{(\text{zbroj } bcr-abl1=20)}{(\text{zbroj } abl1=114\ 900)} \times CFx100 = 0,0086\% = MR^4$$

Primjer 2.

- $bcr-abl1$ nemjerljiv $abl1$ 9 000
- $bcr-abl1$ 3 kopije $abl1$ 8 000

Rezultat:

neprikladan za procjenu MR jer je broj kopija $abl1$ u svakom analiziranom uzorku
 $< 10\ 000$

Primjer 3.

- $bcr-abl1$ nemjerljiv $abl1$ 92 800
- $bcr-abl1$ 3 kopije $abl1$ 112 000

Rezultat:

$$\frac{(\text{zbroj } bcr-abl1=3)}{(\text{zbroj } abl1=204\ 800)} \times CFx100 = 0,0007\% = MR^5$$

Procjena MR uz nemjerljivu bolest

Primjer 1.

$bcr-abl1$ nemjerljiv	$abl1$	114 000
$bcr-abl1$ nemjerljiv	$abl1$	122 500
$bcr-abl1$ nemjerljiv	$abl1$	124 000

Rezultat:

$$\text{nemjerljiv } bcr-abl1 \text{ uz } 360\ 500 \ abl1 = MR^5$$

Primjer 2.

$bcr-abl1$ nemjerljiv	$abl1$	30 000
$bcr-abl1$ nemjerljiv	$abl1$	35 000

Rezultat:

$$\text{nemjerljiv } bcr-abl1 \text{ uz } 65\ 000 \ abl1 = MR^{4,5}$$

Primjer 3.

$bcr-abl1$ nemjerljiv	$abl1$	7 000
$bcr-abl1$ nemjerljiv	$abl1$	8 500

Rezultat:

neprikladan za procjenu MR jer je broj kopija $abl1$ u svakom analiziranom uzorku
 $< 10\ 000$

Literatura

1. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF i sur. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood. 2013;122:872-84.
2. Mahon FX, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F i sur. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. Lancet Oncol. 2010;11:1029-35.
3. Cross NC, White H, Müller MC, Saglio G i Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2012;26:2172-5.
4. Cross NC, White H, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E i sur. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2015, February 5 Epub ahead of print

Daljnji napredak multidisciplinarnog tima za liječenje kronične bolesti presatka protiv primatelja i kasnih komplikacija nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica u KBC Zagreb

Lana Desnica¹, Dražen Pulanić¹, Ranka Serventi-Seiwerth¹, Marinka Mravak-Stipetić², Ervina Bilić³, Romana Čeović⁴, Nikolina Matić⁴, Ljubica Rajić⁵, Ernest Bilić⁵, Nadira Duraković¹, Zinaida Perić¹, Tajana Klepac Pulanić⁶, Igor Petrićek⁷, Dina Ljubas Kelečić⁸, Tamara Vukić⁹, Davorka Dušek¹⁰, Ines Bojanić¹¹, Sanja Mazić¹¹, Ema Prenc¹, Iva Ozana Prah¹, Magdalena Grce¹², Drago Batinić¹³, Renata Zadro¹³, Radovan Vrhovac¹, Steven Živko Pavletić¹⁴, Damir Nemet¹

¹Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,

²Zavod za oralnu patologiju, Klinika za stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ³Klinika za neurologiju KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ⁴Klinika za kožne i spolne bolesti KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ⁵Klinika za pedijatriju, Zavod za hematologiju i onkologiju, KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ⁶Dom zdravlja istok, Zagreb, ⁷Klinika za oftalmologiju KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, ⁸Klinička jedinica za kliničku prehranu Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb, ⁹Klinički zavod za rehabilitaciju i ortopedsku pomagala KBC Zagreb, ¹⁰Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", ¹¹Zavod za transfuziologiju KBC Zagreb, ¹²Institut Ruđer Bošković,

¹³Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,

¹⁴Transplantation and Immunology Branch, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, SAD

Adresa autora za kontaktiranje:

Lana Desnica, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: lana.grkovic@gmail.com

Danas se u svijetu sve veći broj bolesnika s malignim i nemalignim bolestima liječi transplantacijom alogeničnih krvotvornih matičnih stanica (aloTKMS). Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ima dugu tradiciju transplantacije u hematologiji, od prve aloTKMS učinjene 1983. godine (među prvima u ovom dijelu Europe), prve autologne transplantacije 1988. godine (također među prvima u ovom dijelu Europe) sve do danas kada se u našem centru provode svi najsuvremeniji postupci u liječenju transplantacijom krvotvornih matičnih stanica s oko 60 aloTKMS-a svake godine. Kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. *Chronic graft versus host disease - cGVHD*) vodeći je uzrok morbiditeta i mortaliteta koji nije povezan s relapsom osnovne bolesti u osoba nakon aloTKMS-a. Incidencija cGVHD-a je od 40 do 70% ovisno o pojedinim studijama, u porastu je zbog starije životne dobi transplantiranih bolesnika, sve manjeg peritransplantacijskog mortaliteta, uporabe perifernih krvotvornih matičnih stanica i sve većeg broja transplantacija od nesrodnog darivatelja. Bo-

lest zahvaća brojne organe, zahtijeva multidisciplinarni pristup s različitim subspecijalistima i dugotrajnu imunosupresivnu terapiju. Važno je što ranije prepoznati simptome i znakove bolesti kako bi se pravodobno započelo liječenje i spriječio nastanak nepovratnih oštećenja, invalidnosti i smrti. Godine 2005. National Institutes of Health (NIH) konsenzus o cGVHD-u značajno je promijenio dotadašnje standarde za postavljanje dijagnoze, klasifikacije i stupnjevanja bolesti, kao i mjerjenje odgovora na terapiju. Prošle 2014. godine održan je novi NIH konsenzus o cGVHD-u koji je modificirao navedene standarde dopunivši ih novim saznanjima o cGVHD-u.

U prethodnom broju Biltena Krohema izvijestili smo da je u KBC Zagreb u 2013. godini formiran multidisciplinarni tim za liječenje cGVHD-a i dugotrajnih komplikacija nakon aloTKMS-a u suradnji s National Cancer Institute (NCI), NIH, SAD uz projektnu potporu fonda „Jedinstvo uz pomoć znanja“ (eng. *Unity Through Knowledge Fund*) financiran od Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH i Svjetske banke. Riječ je o međunarodnom projektu “*Clinical and biological factors*

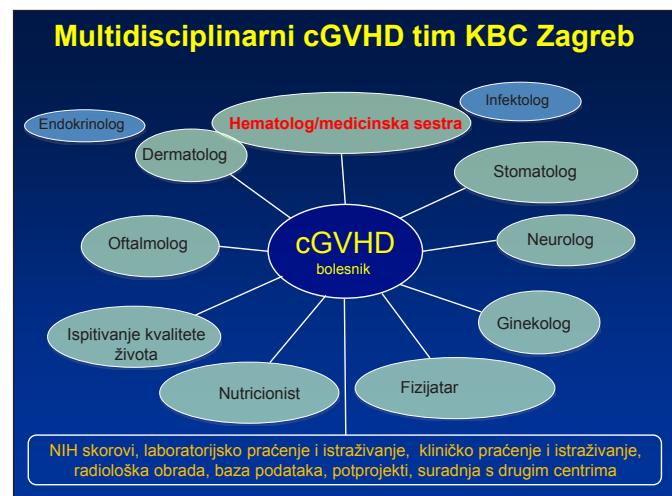
determining severity and activity of chronic Graft-versus-Host Disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation”, čiji su voditelji prof. dr. Steven Živko Pavletić i prof. dr. Damir Nemet. U tom projektu istraživanja kroničnog GVHD-a sudjeluje osam institucija: NCI/NIH iz SAD, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Institut Ruđer Bošković, Klinika za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević”, Dom zdravlja Zagreb – istok, te Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM.



Slika 1

U našem multidisciplinarnom timu za kronični GVHD (Slika 1) bolesnike prvo pregleda hematolog: uz uobičajenu anamnezu i status (osnovna bolest, vrsta aloTKS-a, poslijetransplantacijska anamneza, lijekovi, infekcije, stupanj reintegracija u svakodnevni život) ispituju se podaci o prijašnjem akutnom GVHD-u, početak cGVHD-a, trenutni simptomi i znakovi koji upućuju na cGVHD (koža, oči, usta, gastrointestinalni trakt, jetra, pluća, genitalni i muskuloskeletalni sustav). Nапослјетку се испunjавају стандардни формулари за evaluaciju cGVHD-a: NIH formular za kronični GVHD i formular A. Nakon pregleda pacijent se upućuje medicinskoj sestri koja organizira i koordinira daljnju obradu (laboratorijske hematološke, biokemijske, endokrinološke, koagulacijske i mikrobiološke analize, radiološku obradu, te spirometriju). Zatim pacijenta pregledaju subspecijalisti - članovi tima za cGVHD (Slika 2): dermatolog, stomatolog, oftalmolog, neurolog, fizijatar, nutricionist, ginekolog (ženske bolesnice), a ovisno o kliničkoj indikaciji i endokrinolog, pulmolog, infektolog, gastroenterolog... Ako 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. 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 donese odluka o dalnjem liječenju. Koristeći detaljni multidisciplinarni pristup do sada je sustavno analiziran 51 bolesnik nakon aloTKS-a, od kojih sedmero nije imalo dijagnostičke kriterije za postavljanje dijagnoze cGVHD-a. Među bolesnicima sa cGVHD-om, najčešće zahvaćeni organi sa cGVHD-om bili su koža, zglobovi/fascija, oči i pluća, a većina bolesnika imala je težak oblik bolesti (NIH cGVHD skor 3).



Slika 2

Osim formiranja multidisciplinarnog tima za cGVHD i stručne aktivnosti, projekt o kroničnom GVHD-u rezultirao je razvojem niza kliničkih i laboratorijskih znanstveno-istraživačkih potprojekata, razvojem originalne baze podataka, nabavkom opreme, izradom web stranice projekta (Slika 3.), te znanstvenoj produkciji koja se očituje u aktivnom sudjelovanju s prezentacijama na nizu međunarodnih i domaćih znanstvenih kongresa i sastanaka (6. kongres Hrvatskog društva hematologa i transfuziologa s međunarodnim sudjelovanjem, Rovinj, ožujak 2014.; međunarodni kongres European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), Milano, Italija, travanj 2014.; međunarodni kongres European federation for neurological societies - Joint Congress of European Neurology, Istanbul, Turska, svibanj, 2014.; redovni polugodišnji sastanak KROHEM-a u Osijeku, studeni 2014.; međunarodni kongres EBMT u Istanbulu, Turska, ožujak 2015.). Na projektu o kroničnom GVHD su zaposlene posli-

jedoktorandica dr. sc. Iva Ozana Prah i doktorandica Ema Prenc. Također, aplicirali smo s novim cGVHD projektom na veliki natječaj Europske Unije Horizon 2020, gdje je institucija iz Republike Hrvatske koordinator predloženog projekta a suradne ustanove su iz niza zapadnoeuropskih država te SAD; za sada je taj novi projektni prijedlog prošao prvi stupanj vrlo rigorozne međunarodne recenzije (Slika 4).



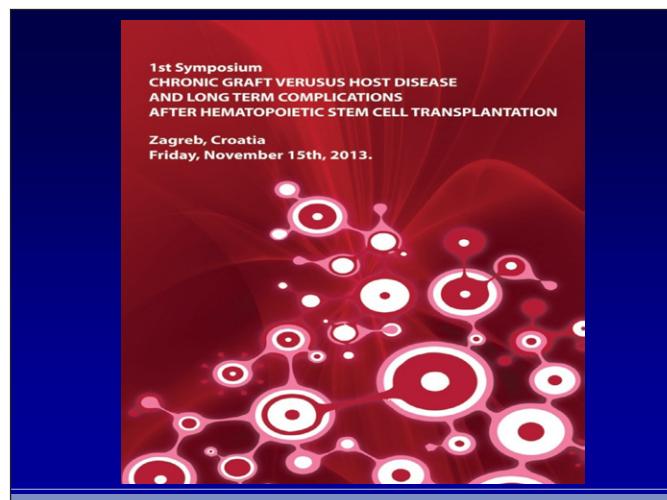
Slika 3



Slika 4

Aktivnost na području kroničnog GVHD-a rezultirala je i organizacijom 1. simpozija o kroničnom GVHD-u i dugotrajnim komplikacijama nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica održanom u Zagrebu u studenom 2013. gdje je sudjelovao niz međunarodnih stručnjaka iz područja cGVHD-a (prof. dr. Steven Živko Pavletić, SAD, dr. Daniel Wolff, Njemačka, dr. Hildegard Greinix i dr. Anita Lawitschka, Austrija, dr. Rafael Duarte-Palomino, Španjolska, dr. Grzegorz Basak, Poljska) kao i članovi cGVHD tima iz Zagreba (Slike 5-7). Ove godine, 29. svibnja 2015., u Zagrebu organiziramo 2. simpozij o kroničnom GVHD-u i dugotrajnim

komplikacijama nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica, ponovno s uglednim inozemnim i domaćim predavačima (Slika 8).



Slika 5



Slika 6



Slika 7



Slika 8

Sveukupno gledajući, daljnji napredak multidisciplinarnog tima za kronični GVHD KBC Zagreb osigurao je detaljni i ekstenzivni pristup tim diferenčnim bolesnicima koristeći najsvremenije svjetske NIH cGVHD standarde. Ovakav pristup omogućuje ne samo napredak u njihovom liječenju, već i suradnju našeg centra s inozemnim institucijama i skupinama koje se bave cGVHD-om, te pozicioniranje na jedno od vodećih mesta u Europi u ovom važnom biomedicinskom području.

Paroksizmalna noćna hemoglobinurija je stečena trombofilija: prikaz slučaja

Prof. dr. sc. Silva Zupančić Šalek, dr. med.

*Odjel za hemostazu i trombozu, te benigne bolesti krvotvornog sustava
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinički bolnički centar Zagreb
E-pošta: silva.zupancic-salek@zg.t-com.hr*

Paroksizmalna noćna hemoglobinurija (PNH) je progresivna, po život opasna, stečena bolest koju karakterizira nemaligna klonalna ekspanzija matične hematopoetske stanice. Bolest je posljedica somatske mutacije gena pig-A koji uzrokuje poremećaj u sintezi glikozilfosfatidil inozitola (GPI). Zato je manje GPI-veznih inhibitora komplementa (CD 55 i CD 59) na površni stanice što posljedično uzrokuje pojačanu, kroničnu komplementom posredovanu intravaskularnu hemolizu, hipereaktivnost trombocita i njihovu agregabilnost. To je kompleksan i rijedak hematološki poremećaj koji se manifestira trijasom: hemolitička anemija, slabost koštane srži i stečena trombofilija. PNH je najopasnije stanje stečene trombofili u medicini prema Luzzano i suradnicima (1). U Tablici 1. vidi se incidencija venske tromboembolije i relativni rizik u bolesnika s PNH u usporedbi s ostalim naslijednim trombofilijama.

Trombofilno stanje	Opća populacija (%)	Incidencija VTE (na 100 bolesnika/godinu)	Relativni rizik prve VTE u usporedbi s općom populacijom
PNH	0.002	6.24	62x (2)
Manjak AT	0.02	1.7	5x-8x
Manjak proteina S	0.03	1	5x-8x
Manjak proteina C	0-2	1	5x-8x
F II G20210A	2	0.13	2x
Faktor V Leiden	4.8	0.1	2x-4x

Tablica 1. Incidencija i relativni rizik venske tromboembolije (VTE) u bolesnika s PNH u usporedbi s naslijednim trombofilijama.

Pojava venske tromboembolije (VTE) u bolesnika s PNH je 62 puta vjerojatnija nego u ostalih naslijednih trombofilnih stanja. Do sada nije utvrđena

povezanost između naslijednih trombofilnih stanja i PNH (3). Prisutnost mutacija FV Leiden, mutacije protrombina i MTHFR u PNH bolesnika odgovara pojavnosti u normalnoj populaciji, dok u malim skupinama PNH bolesnika nije dokazna prisutnost naslijednog deficit-a antitrombina, proteina C i S. Međutim, Dragoni i sur. (4) ukazali su visoku pojavnost antifosfolipidnih antitijela u bolesnika s PNH u usporedbi sa zdravim dobrovoljcima. Kako se radi o malom broju bolesnika s PNH taj nalaz nije moguće definitivno potvrditi.

Rizik pojave tromboze korelira s veličinom PNH granulocitnog klena. Rezultati studije Hall i suradnika (5) pokazali su da desetogodišnji rizik VTE u bolesnika s PNH granulocitnim klonom većim od 50 % iznosi 44 %. U bolesnika s malim granulocitnim klonom i to oko 10 %, rizik iznosi 5.8 % što je još uvijek više nego u općoj populaciji. Za sada nije poznato postoji li korelacija veličine klena drugih linija s rizikom pojave tromboze. Viši je rizik pojave venske tromboze u bolesnika s PNH Afričko-američkog i Latino-američkog porijekla dok je niži rizik u Kineza i Japanaca (6). U Japanaca se objašnjava značajno nižim PNH granulocitnim klonom u usporedbi sa zapadnjačkim bolesnicima (7). Nema korelacije između ovisnosti o transfuziji ili stupnju anemije i pojavi tromboze.

Tromboza u PNH bolesnika manifestira se različitim lokalizacijama u tijelu. Najčešća je pojava intrabdominalne tromboze i tromboze cerebralnih vena. Jedna od teorija objašnjava prisutnost aktiviranih neutrofila u mikrocirculaciji jetre, pa CD59 negativni neutrofili koje nalazimo u bolesnika s PNH ulaze u interakciju s trombocitima, oslobađaju se-rinske proteaze koje koncentriraju prokoagulatnu aktivnost.

Tromboembolija je uzrok smrti u dvije trećine bolesnika s PNH. Najčešća klinička lokalizacija tromboze intrabdominalno je tromboza jetrenih vena (Budd-Chiarijev sindrom) koja se javlja u 40.7% bolesnika s PNH (8,9,13) i predstavlja najčešću trombotsku komplikaciju. Može uzrokovati jetrenu insuficijenciju i čest je uzrok smrti u PNH bolesnika. Tromboza gornjeg sagitalnog sinusa i cerebralnih vena je druga lokalizacija po učestalosti pojava tromboze u PNH bolesnika i česta je neurološka komplikacija koja uzrokuje smrt u više od jed-

ne trećine bolesnika. Tromboza kožnih vena s bolnom diskoloracijom poput purpure fulminans može zahvatiti veliku površinu kože. Pojava tromboze u području gornje mezenterijalne vene dovodi do infarkta crijeva. Ponekad tromboza zahvaća male, periferne vene mezenterijalnog debla što uzrokuje prolaznu ishemiju crijeva, a time se može objasniti pojava opetovanih bolova u trbuhu s temperaturom, opstrukcijom i rektalnim krvarenjem. Zatim je moguća tromboza bubrežnih vena s oštećenjem funkcije bubrega. Tromboza dubokih vena nogu javlja se češće nego u općoj populaciji u otprilike jedne trećine PNH bolesnika. Moguće su i arterijske tromboze kao prva manifestacija PNH i to cerebralnih i koronarnih arterija (9,10). Arterijske tromboze javljaju se uglavnom u mladih bolesnika i to *de novo* u arterijskim bez značajne aterosklerotske bolesti.

Od 29 % do 44 % bolesnika s PNH javi se samo jedna ataka tromboze tijekom trajanja PNH bolesti. U 19 % bolesnika dokazano je kako visceralna tromboza (jetrena, mezenterična, portalna, splanhnična, tromboza donje šuplje vene) prethodi pojavi PNH, a inače se pojavljuje u otprilike oko pete godine bolesti. Bolesnici s PNH u kojih je tromboza prisutna pri dijagnozi bolesti samo 40 % preživljava 4 godine. Relativni rizik smrti povećan je 5-15.4 puta. Tromboza je najvažniji prognostički faktor preživljivanja bolesnika s PNH (10). Kompleksni su mehanizmi koji dovode do tromboze u PNH bolesnika. Uključuju brojne faktore: aktivaciju trombocita, komplementom posredovanu hemolizu, oštećenu biološku raspoloživost dušičnog monoksida, oštećenje sustava fibrinolize i endotelnu disfunkciju (10).

Prikaz bolesnice

Bolesnica ima 48 godina i majka je dvoje djece. U 2002. g./VI mj. dijagnosticirana je Coombs negativna hemolitička anemija i trombocitopenija, koja nije reagirala na primjenu kortikosteroida i opetovane primjene intravenskih imunoglobulina. 2002./IX mj. PHD kosti nalazi hipocelularnu koštanu srž s normalnom megakariocitopoezom i produkcijom trombocita. Liječena antilimfocitnim globulinom. Nakon završene terapije primila je u dva navrata transfuziju koncentrata eritrocita. Tijekom 2003. godine uredna crvena krvna slika. Hitno zaprimljena u bolnicu 2004./IX mj. radi bolova u trbuhi i leđima. U KKS anemija s Hb 75 g/L sa sniženim brojem trombocita $39 \times 10^9/L$. Učinjen ultrazvuk abdomena i CT te se dokaže da se radi o Budd-Chiarijevom sindromu s trombozom v. lienalis i mezenterijal-

nom trombozom. Nije dokazana mutacija FV Leidena niti protrombina. Započeto je liječenje heparinom male molekulske težine na što se vidi kliničko poboljšanje i postavlja se dijagnoza PNH: 74% neutrofilnog PNH kloni i 7.7% eritrocitnog kloni PNH. Tijekom godina prati se porast neutrofilnog kloni PNH koji 2013./X mj. iznosi 96% neutrofilnog PNH kloni (tip II i III) i 6% eritrocitnog PNH kloni (tip II i III). Radi pojave ascitesa, povećane jetre i slezene obrađuje se radi sumnje na recidiv tromboze. Liječi se primjenom heparina male molekulske težine, diureticima, faktorom rasta granulopoeze (G-CSF) i vitaminima. 2014./X mj. pojava melene i hematohezije i slijedi hospitalizacija u interventnoj gastroenterologiji. Gastroskopski se verificiraju subkardijalni varikoziteti, varikoziteti jednjaka te je odlučeno provesti kirurško liječenje. 6.11.2014 učinjena op. Sec. Sugiura (splenektomija, devaskularizacija distalnog dijela jednjaka i želuca, transekcija jednjaka staplerom i uspostava anastomoze ezofagojejunalis TT), kolecistektomija, resekcija 2. segmenta jetre u kojem se nađe hemangioma. PHD nalaz jetre nalazi promjene koje odgovaraju Budd-Chiarijevom sindromu. Postoperacijski oporavak bez većih komplikacija. Mjesec dana po operaciji Hb 83, E 3.43, a broj leukocita i trombocita se normalizirao (L 5.4, Trc 388) s povišenim LDH (618 U/L , < 240 normala). U terapiji prima heparin male molekulske težine, diuretik, beta-blokator, peroralno željezo. Zadnja kontrola u veljači 2015.g. s Hb 99, L 5.1 i Trc 190. PNH klon: eritrocitni (10%, tip II+III), monocitni (94.7%) i granulocitni (95.4%).

PNH bolesnicima s velikim granulocitnim klonom ($>50\%$) koji je u progresiji treba obvezno primijeniti tromboprofilaksu, a napose onima koji ne primaju ekulizumab. Oprezno u bolesnika s pridruženom trombocitopenijom radi mogućeg krvarenja. Podaci nacionalnog registra PNH bolesnika u Leedsu jasno ukazuju pozitivan učinak ekulizumaba koji značajno smanjuje pojavu VTE-a i time poboljšava preživljivanje, a najnoviji rezultati upućuju da uz liječenje ekulizumabom više i nije potrebna primarna tromboprofilaksa. Za sada nema jasnih smjernica o primjeni antiagregacijske terapije u prevenciji arterijske tromboze u bolesnika s PNH.

Bolesnici s PNH i dokazanom trombozom liječe se s heparinom male molekulske težine i antagonistima vitamina K poput bolesnika s akutnom epizodom tromboembolije. Antikoagulancije se primjenjuju kako bi spriječili recidiv tromboza u bolesnika s PNH, no vrlo često su neučinkovite bez istovremene

primjene ekulizumaba. Trombolitička terapija dolazi u obzir u onim slučajevima kad se radi o akutnoj epizodi VTE koja životno ugrožava bolesnika. Uloga novih antikoagulancija u sekundarnoj prevenciji još nije ispitana.

Danas je čvrsta indikacija za početak liječenja ekulizumabom razvoj akutnog trombotskog incidenata u bolesnika s PNH (11,12). Temeljem pojedinačnih objavljenih slučajeva o prevenciji VTE-a varfarinom uz ekulizumab nemaapsolutne sigurnosti u preventiji pa stoga treba pažljivo odvagnuti odluku o prekidu antikoagulantne terapije. Neki smatraju kako pridružena trombocitopenija zbog slabosti koštane srži možda jest razlog za prekid antikoagulantne terapije. Joanna Haughton i sur. (14) objavili su rezultate serije bolesnika s PNH i Budd-Chiarijevim sindromom kako primjena ekulizumaba uz antikoagulancije može spriječiti daljnji razvoj Budd-Chiarija, odnosno ako je komplikacija bolesti utvrđena može spriječiti brzu progresiju bolesti. Također olakšava postavljenje TIPPS-a i značajno poboljšava ishod bolesti. Bilo koji kirurški *shunt* ili drugi zahvat pa čak i transplantacija jetre su neučinkoviti u bolesnika s PNH bez primjene ekuizumaba. Nakon operativnih zahvata dolazi prolazno poboljšanje, no krajnje dovodi do fatalnog ishoda jer je prisutna hiperkoagulabilnost krvi kao sklonost razvoju recidivnih tromboza.

Literatura

1. Luzzatto L, Gianfaldoni G, Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view. Br J Haematol. 2011;153(6):709-720.
2. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Screening for inherited thrombophilia; implications and therapeutic implications. Haematologica. 2002;87:1095-1108.
3. Naifa K, Bessler M, Mason P, Vulliamy T, Hillmen P, Castro-Malaspina H, Luzzatto L. Factor V Leiden mutation investigated by amplification created restriction enzyme site (ACRES) in PNH patients with and without thrombosis. Haematologica. 1996;81:540-542.
4. Dragoni F, Iori AP, Pignoloni P, Minotti C, Chiarotti F, Mazzucconi MG, Mengarelli A, Arcese W, Foa R, Avvisati G. Thrombophilic screening in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a pilot study. Br J Haematol. 2010;150:492-494.
5. Hall C, Richards S, Hillman P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH). Blood. 2003;102:3587-3591.
6. Araten DJ, Thaler HT, Luzzatto L. High incidence of thrombosis in African-American and Latin-American patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Thromb Haemost. 2005;93:88-91.
7. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru S, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rose WF. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in the United States and Japan. Medicine (Baltimore). 2004;83:193-207.
8. Hoekstra J, Leeback FW, Plessier A, European Network for Vascular Disorders of the Liver. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in Budd-Chiari syndrome: findings from a cohort study. J Hepatol. 2009;51(4):696-706.
9. Ziakas PD, Polou LS, Rokas GI, Bartzoudiss D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview. J Thromb Haemost. 2007;5:642-645.
10. Hill A, Kelly RJ and Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Blood. 2013;121(25):4985-4996.
11. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal haemoglobinuria? Blood. 2009;113: 6522-6527.
12. Van Bijnen STA, Heerde WL, Muus P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. J Thromb Haemost. 2012;10:1-10.
13. Brodsky A, Mazzocchi O, Sanchez F, Khursigara G, Malhotra D, Volpacchino M. Eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with Budd-Chiari syndrome progresssing despite anticoagulation. Experiment. 2013;1:26.
14. Haughton J et al. Improved outcomes of Budd-Chiari Syndrome in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria with Eculizumab therapy. Abstract, 3478, ASH 2012.

Određivanje inverzije introna 22 i introna 1 u genu za faktor zgrušavanja VIII kod pacijenata s teškim oblikom hemofilije A

**Kristina Crkvenac Gornik¹, Morana Mikloš¹,
Sanda Huljev Frković¹, Ivana Tonković Đurišević¹,
Ernest Bilić², Silva Zupančić Šalek³**

¹Kabinet za prenatalnu dijagnostiku, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb

²Klinika za pedijatriju KBC Zagreb

³Odjel za hemostazu i trombozu te benigne bolesti krvotvornog sustava, Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Dr. sc. Kristina Crkvenac Gornik

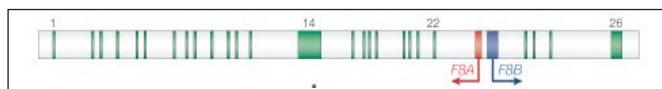
Kabinet za prenatalnu dijagnostiku

Klinika za pedijatriju

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: kcrkven@kbc-zagreb.hr

Hemofilija A (HA) je spolno vezana recessivna bolest s učestalošću pojavljivanja od otprilike 1 na 10 000 rodene muške djece (1). Nastaje zbog mutacije u genu za koagulacijski faktor VIII (F8), koja uzrokuje nedostatnu ili sniženu razinu plazmatskog faktora VIII. Na temelju intenziteta aktivnosti faktora VIII hemofilije A razlikuje se lagani, srednje težak i težak oblik (2). Gen F8 (smješten na kromosomu X u regiji Xq28) dug je 186 kb i sastoji se od 26 egzona koji kodiraju za protein FVIII (3). Veći broj egzona sastoji se od 3' netranslatirane regije. Intron 22 sadrži dva dodatna gena, F8A i F8B (Slika 1a.).



Slika 1a. Shematski prikaz gena F8 - plavom i crvenom strelicom prikazan je smjer transkripcije gena F8A i F8B.

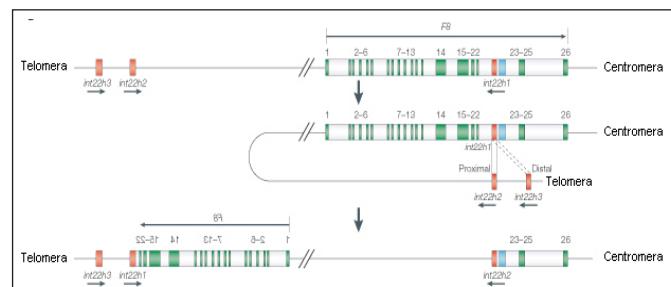
Inverzija introna 22 je najučestalija mutacija kod bolesnika s teškim oblikom hemofilije A s udjelom od 40-50% (3). Kod 1-5% bolesnika teški oblik hemofilije A može nastati zbog inverzije introna 1 (4,5). Obje inverzije posljedica su intrakromosomske rekombinacije sekvence introna 1 ili introna 22 s homolognim izvengenskim kopijama (6).

Inverzija introna 22

Posebnost gena za faktor VIII je postojanje slijede-

da za dodatni manji gen, koji se zove gen A (F8A, int22h-1), unutar introna 22. Dodatne kopije tog gena (F8A, int22h-2 i int22h-3) nalaze se na telomernom kraju kromosoma X, a od gena za faktor VIII udaljene su 500 kb. Regije int22h duge su oko 9.5 kb i međusobno su homologne 99%. Inverzija introna 22 nastaje zbog intrakromosomske rekombinacije između regije u intronu 22 (int22) unutar gena F8 (int22h-1) i jedne od dviju skoro identičnih izvengenskih kopija int22h-2 i int22h-3 (Slika 1b.). Izvengensi homolozi (int22h-2 i int22h-3) su u suprotnoj orientaciji u odnosu na int22h-1 pa kao posljedica rekombinacije nastaje inverzija. Zbog inverzije dolazi do udaljavanja egzona 1-22 od egzona 23-26, što ima za posljedicu narušavanje funkcije proteina faktora VIII.

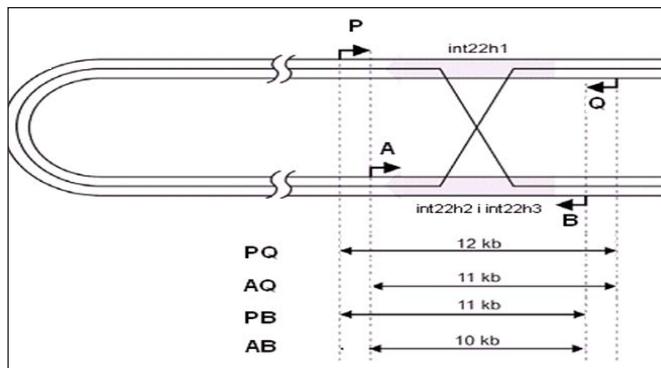
Otkrivanje inverzije mutacije u obiteljima s teškim oblikom bolesti i mogućnost njezinog direktnog otkrivanja najvažnije je poboljšanje u dijagnostici hemofilije A. U tu svrhu koristi se lančana reakcija polimerazom (eng. *Polimerase Chain Reaction – PCR*), koja je s vremenom potisnula *Southern blot* analizu i omogućila bržu i jednostavniju dijagnostiku.



Slika 1b. Shematski prikaz inverzije introna 22..

Određivanje inverzije introna 22

Kod 10 bolesnika s teškim oblikom hemofilije A genomska DNA izolirana je iz 5ml periferne krvi. Inverzija introna 22 određivana je primjenom metode umnažanja dugih odsječaka DNA - LD-PCR (eng. *Long Distance - Polymerase Chain Reaction*). Navedenom metodom umnaža se neoamplikon, koji nastane kada se intronski homolog int22h-1 rekombinira s jednim od unutargenskih homologa (int22h-2 ili int22h-3). Umnožena regija duga je 10 kb. Koriste se četiri različite početnice P, Q, A i B, čije sekvene su komplementarne bočnim sekvenama int22h-1, int22h-2 ili int22h-3 (Slika 2.) (7).



Slika 2. Shematski prikaz mesta vezivanja početnica i dužine LD-PCR produkata.

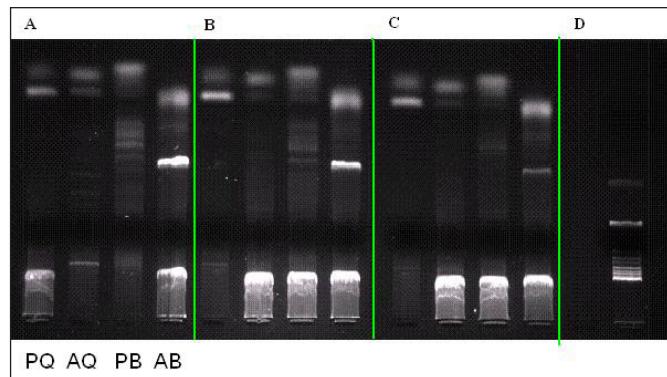
Uspješno umnažanje različitih kombinacija četiri oligonukleotidne početnice ovisi o tri modifikacije LD-PCR protokola: visokoj koncentraciji dimetilsulfoksida, dodavanju 7-deaznog-dGTPa pored uobičajenih nukleotida i visokoj koncentraciji mješavine dvaju enzima, Taq i Pwo DNA polimeraze (8). PCR reakcija odvija se u 30 ciklusa pri sljedećim uvjetima: 30 sek 92 °C, 1 min 65 °C i 15 min 68 °C. Analizom PCR produkata dobivenih umnažanjem različitih kombinacija oligonukleotidnih početnica moguće je razlikovati pacijenta s inverzijom introna 22, nositeljicu inverzije kao i pacijenta kod kojeg inverzija nije prisutna (Tablica 1., Slika 3.).

Tablica 1. Analiza PCR produkata dobivenih umnažanjem različitih kombinacija oligonukleotidnih početnica P, Q, A i B.

	PQ	AQ	PB	AB
Bolesnik s inverzijom introna 22	-	+	+	+
Prenositeljica inverzije introna 22	+	+	+	+
Muškarac ili žena bez inverzije introna 22	+	-	-	+

+ : prisutan PCR produkt nastao umnažanjem parova početnica
- : nije prisutan PCR produkt

Umnažanjem početnica AB uvijek nastaje PCR produkt, jer tijekom rekombinacije jedna kopija int22h-2 ili int22h-3 ostaje nepromijenjena te služi kao pozitivna kontrola PCR reakcije. Kod četiri pacijenta utvrđena je inverzija introna 22 (Slika 3.).



Slika 3. Određivanje inverzije introna 22 - analiza LD-PCR produkata standardnom agarozom gel elektroforezom.

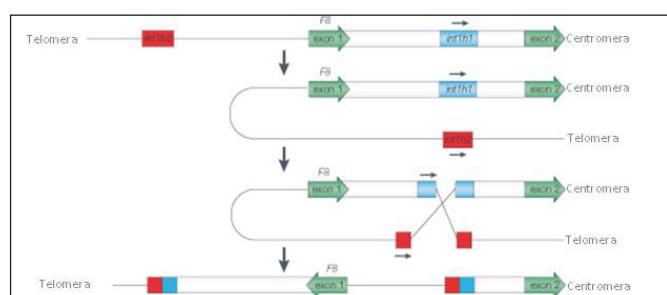
A - nije prisutna inverzija introna 22

B i C - prisutna je inverzija introna 22

D - marker poznate duljine

Inverzija introna 1

Inverzija introna 1 (inv1) nastaje zbog homologne rekombinacije između 1041 pb regije introna 1 (int1h-1) gena F8 i njegove suprotno orijentirane izvangerske kopije (int1h-2) smještene približno 140 kb telomerno u odnosu na gen F8 (Slika 4.) (3,4). Inv1 uzrokuje odvajanje i suprotnu orijentaciju egzona 1 u odnosu na ostatak gena, što ima za posljedicu promjenu strukture gena F8 i odsutnost funkcionalnog faktora VIII.

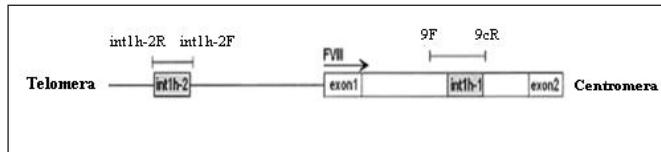


Slika 4. Shematski prikaz inverzije introna 1..

Određivanje inverzije introna 1

Kod 6 bolesnika s teškim oblikom hemofilije A, kojima nije nadena inverzija introna 22, određivana je inverzija introna 1. Zbog inverzije introna 1 dolazi do preraspodjile bočnih sekvenci int1h-1 i int1h-2. Iz tog se razloga bočne sekvence koriste za dizajniranje četiri početnice, koje različitim kombinacijama u dvije PCR reakcije omogućuju otkrivanje inverzije u bolesnika i nositelja. U PCR reakciji 1 umnažaju se dvije početnice specifične za int1h-1 (9F i 9cR) uz početnicu koja se specifično veže za bočnu sekvencu int1h-2 na njegovoj centromernoj strani (int1h-2F) (Slika 5.).

Slika 5. Shematski prikaz mesta vezivanja početnica int1h-2F, int1h-2R, 9F i 9cR.

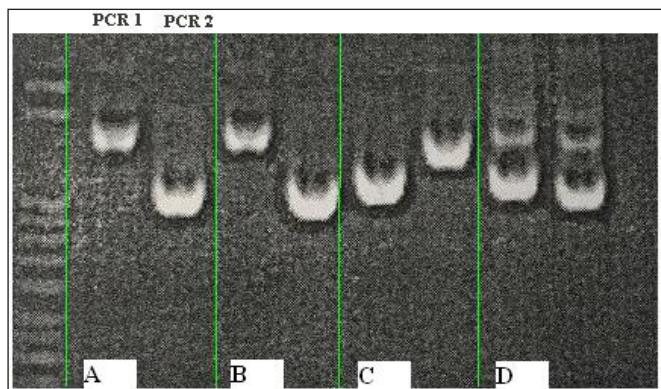


U PCR reakciji 2 umnažaju se početnice specifične za int1h-2 (int1h-2F i int1h-2R) zajedno s početnicom koja se specifično veže za bočnu sekvencu int1h-1 na njegovoj telomernoj strani (9F) (Slika 4). Veličina PCR produkata u prvoj (kombinacija početnica 9F, 9cR, int1h-2F) i drugoj PCR reakciji (kombinacija početnica int1h-2F, int1h-2R, 9F) razlikuje se kod zdravih osoba u odnosu na bolesnike s inverzijom introna 1 (Tablica 2.).

Tablica 2. Veličina PCR produkata kod zdravih osoba i osoba s inverzijom introna 1.

	PCR1	PCR2
prisutna inverzija introna 1	1.3 kb	1.8 kb
inverzija introna 1 nije prisutna	1.9 kb	1.2 kb

Na Slici 6 prikazani su PCR produkti zdravih osoba, bolesnika s inverzijom int 1 i nositelja inverzije 1. Od ukupno 6 bolesnika s teškim oblikom hemofilije A niti kod jednog nije nađena inverzija introna 1.



Slika 6. Određivanje inverzije introna 1 - analiza PCR produkata standardnom agaroza gel elektroforezom.
PCR 1 - umnažanje int1h-1; PCR 2 - umnažanje int1h-2.

- A i B – nije prisutna inverzija introna 1
- C – prisutna inverzija introna 1
- D – nositeljica inverzije introna 1

Inverzije introna 22 i introna 1 gena F8 uzrok su oko 50 % teškog oblika hemofilije A. Stoga je određivanje inv22 i inv1 prvi korak u analizi mutacija kod bolesnika s teškim oblikom hemofilije A.

Inverzija introna 22 u trećini slučajeva povezana je s prolaznom ili trajnom pojavom inhibitora. Genetsko testiranje bolesnika s hemofilijom nužno je radi projene rizika za stvaranje inhibitora tijekom zamjenske terapije, otkrivanja nositeljica te radi prenatalne dijagnostike kod nositeljica poznate mutacije.

Literatura

1. Gitscher J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterisation of the human factor VIII gene. *Nature*. 1984;312:326-330.
2. White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild Cand J, Ingerslev J. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(3):560.
3. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, et al. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Hemophilia A. *Nature Genetics*. 1993;5:236-241.
4. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002;99: 168-174.
5. Schröder J, El-Maarri O, Schwaab R et al. Factor VIII intron-1 inversion: frequency and inhibitor prevalence. *J Thromb Haemost*. 2006;4:1141-1143.
6. Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. *Int J Hematol*. 2006;83:96-102.
7. Liu Q, Sommer SS. Subcycling-PCR for multiplex long-distance amplification of regions with high and low GC content: application to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *Biotechniques*. 1998;25(6):1022-8.
8. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in haemophilia A. *Blood*. 1998;92:1458-1459.

Uloga medicinske sestre u sveobuhvatnoj skrbi bolesnika s hemofilijom

Josipa Belev, bacc. med. techn.

Odjel za hemostazu i trombozu, te benigne bolesti krvotvornog sustava

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: jsafarik@gmail.com

Hemofilija je nasljedni poremećaj u sustavu zgrušavanja krvi. Prepoznaje se kao nedostatak ili smanjenje aktivnosti faktora zgrušavanja krvi. Postoje dvije vodeće vrste bolesti - hemofilija A i hemofilija B. Kod hemofilije A nedostatni čimbenik zgrušavanja je VIII ili je smanjena njegova aktivnost, dok kod hemofilije B nedostaje ili je smanjena aktivnost čimbenika zgrušavanja IX. Obje vrste bolesti pojavljuju se u tri oblika: blagi, umjereni i teški oblik. U Tablici 1. navedene su karakteristike svakog oblika.

Tablica 1. Karakteristike hemofilije

Težina Hemofilije	Razina faktora	Epizode krvarenja	Broj krvarenja	Vrijeme postavljanja dijagnoze
Teška	<1 % (<0,001)	Spontana krvarenja pretežno u mišiće i zglobove	24- 48 krvarenja godišnje	Oko prve godine života
Umjerena	1-5 % (0,01-0,05)	Rijetko spontana krvarenja, jaka krvarenja nakon manje traume ili kirurškog zahvata	4 – 6 krvarenja godišnje	Oko 5 -7 godine života
Blaga	5 -40 % (0,05-0,40)	krvarenja nakon veće traume ili kirurškog zahvata	Nema pravila	U odrasloj dobi, kod prometnih nesreća ili kirurškog

Bolest se klinički manifestira pojavom krvarenja najčešće u zglobove i mišiće.

Učestalost i način nastanka krvarenja uveliko ovise o obliku bolesti (Tablica 1.).

Kao posljedica teških krvarenja mogu ostati trajna oštećenja mišića i zglobova koji mogu rezultirati invaliditetom.

Liječenje se provodi nadomjesnom terapijom nedostatnog čimbenika zgrušavanja.

Nadomjesna terapija može biti primijenjena u obliku profilakse ili kao terapija liječenja krvarenja (eng. *on demand*). Profilaktička terapija primjenjuje se redovito kod hemofilije A tri puta tjedno ili kod hemofilije B dva puta tjedno. Profilaksom se smatra i terapija nadomeštanja čimbenika zgrušavanja prije neke teže fizičke aktivnosti. Liječenje hemofilije otežava pojava komplikacija u vidu inhibitora na nedostatni čimbenik zgrušavanja. Ovisno o primjenjivanoj vrsti pripravka u literaturi se navodi vrlo različita učestalost pojave inhibitora.

Doza lijeka koji se primjenjuje u profilaksi ili kao liječenje krvarenja određuje liječnik prema tjelesnoj težini bolesnika zatim težini i izvoru krvarenja, a medicinska sestra primjenjuje lijek i educira oboljele i članove njihovih obitelji za samostalnu primjenu.

Uloga medicinske sestre je višestruka i vrlo važna. Svojim radom i pravodobnom intervencijom sestra može smanjiti mogućnost nastanka trajnih posljedica kod bolesnika koji se javi s krvarenjem. Kod pojave krvarenja najviše se postiže kada se s intervencijama započne odmah, a najkasnije dva sata od nastanka krvarenja.

Najčešća mjesta krvarenja kod osoba s hemofilijom su zglobovi i mišići. Prije pojave jasnih simptoma akutnog krvarenja u zglob ili mišić bolesnik ima predosjećaj da će na tom mjestu krvarenje nastati. Vodeći simptomi kod akutnog krvarenja u zglob i mišić su: bol, otok, toplina i ispad funkcije. U prva dva sata simptomi se postupno pojačavaju.

Dužnost medicinske sestre je uzeti dobru sestrinsku anamnezu od bolesnika koja mora uključivati podatke o trenutnom krvarenju. Važan podatak je da li je krvarenje nastalo spontano ili nakon traume, te kada je primjenjena zadnja doza čimbenika zgrušavanja ako je bolesnik na kućnom liječenju. Kada sestra procijeni da se radi o akutnom krvarenju potrebno je pristupiti intervencijama.

Bolesnika je potrebno staviti u položaj mirovanja s mjestom krvarenja podignutim iznad razine srca. Na mjesto krvarenja potrebno je staviti hladni oblog, točnije led, i to tako da je cijelo područje krvarenja obavijeno ledom (npr. kod krvarenja u koljeni zglob led se stavlja oko cijelog zgoba). Led ne bi smio stajati duže od pola sata kako bi se izbjegla pojava ozebljina. Nakon pauze od pola sata ponovno je potrebno staviti led. Tako se vazokonstrikcijom

smanjuje dotok krvi u područje krvarenja. Za kompresiju koristi se elastični zavoj, elastična čarapa ili elastični rukav.

Sestra primjenjuje propisanu terapiju od strane hematologa. Liječnik hematolog određuje vrstu i dozu nedostatnog čimbenika zgrušavanja. Sestra priprema i primjenjuje lijek. Lijek se primjenjuje isključivo intravenskim putem. Na tržištu postoje koncentrati čimbenika zgrušavanja dobiveni iz ljudske krvi tzv. plazmatski čimbenici i dobiveni rekombinantnom tehnologijom. Kompleksnost davanja tako značajne terapije dodatno komplicira i način otapanja koncentrata čimbenika zgrušavanja. Već u pakiranju s lijekom dolazi i sistem za otapanje. Svaki pripravak ima različiti sustav otapanja. Sustavi za otapanje u grubo se dijela na otvorene i zatvorene tipove. Prednosti otvorenih sistema su da se lako s njim rukuje, no brojne su mane kao npr. lakša mogućnost ozljede, proljevanja lijeka, kontaminacije lijeka i nakon uporabe ostaje oštri otpad koji je potrebno adekvatno zbrinuti. Zatvoreni tipovi sustava za otapanje koncentrata čimbenika zgrušavanja imaju brojne prednosti kao npr. nemogućnost kontaminacije i proljevanja lijeka, nema oštih dijelova pa je i mogućnost ozljede manja, dok su im mane teže rukovanje, potrebna je velika preciznost kod upotrebe. Na tržištu postoje preparati koji se mogu čuvati na sobnoj temperaturi, no većina ih se čuva na temperaturi od 2 do 8 °C. Lijek prije primjene potrebno je zgrijati na temperaturu tijela. Lijek se ne grije na izvoru topline niti se drži na direktnoj sunčevoj svjetlosti. Lijek primjenjuje sestra pritom birajući vene koje bolesnik ne koristi za kućnu terapiju. Uglavnom su to vene na dominantnoj ruci. Prilikom odabira vene potrebna je dodatna preciznost jer je svaki ubod igle za oboljelog od hemofilije moguće mjesto novog krvarenja. Brzina davanja lijeka je 2-3 ml u minuti. Nakon primjena lijeka potrebno je adekvatno skladištiti otpad.

Osim koncentrata čimbenika zgrušavanja lijekovi koji se primjenjuju kod akutnog krvarenja su i analgetici. Bol u početku nije jaka, ali ako krvarenje perzistira bol se pojačava i potrebna je značajna analgetska terapija.

Prvi lijek odabira analgezije kod oboljelih od hemofilije je paracetamol, zatim tramadol. Ne preporučuje se primjena nesteroidnih antireumatika. Ako su bolovi jaki liječnik procjenjuje postoji li potreba za primjenom psihotropnih lijekova u svrhu analgezije.

Važan je i način primjene lijeka. Uvijek se bira put unosa lijeka koji će izazvati najmanju traumu, a to je peroralni put primjene lijeka.

Supkutani put davanja također je dozvoljen, ali tek kada pacijent dobije nadomjesnu terapiju nedostatnog čimbenika zgrušavanja.

Intravenski put primjene analgetika moguć je, ali potrebno je koristiti tanke igle koje prilikom insercije ostavljaju minimalnu traumu. Idealno je analgetik intravenskim putem primijeniti u istom aktu kada se primjenjuje i sam nedostatni čimbenika zgrušavanja krvi. Nakon primjene lijekova iglu treba obvezno izvaditi kako ne bi trajno oštetila venu. Kod oboljelih od hemofilije nije preporučljivo postavljati intravenske kanile jer one dodatno oštećuju vene. Čimbenici zgrušavanja kod krvarenja u zglob ili mišić najčešće se primjenjuju jedan do dva puta dnevno i za njihovu aplikaciju potrebno je koristiti tzv. "baby sisteme". Ako je potrebna višekratna nadoknada nedostatnog čimbenika i dodatni lijekovi kao i infuzija postavlja se intravenska kanila čuvajući vene koje pacijent koristi za primjenu kućne terapije.

Intramuskularna primjena analgetika i lijekova općenito je kontraindicirana u osoba s hemofilijom. Ovim načinom primjene lijeka oštećuje se mišić i nastaju velika krvarenja koja za posljedicu mogu imati trajno oštećenje funkcije mišića u koji je lijek dan. Za liječenje hematoma nastalog primjenom lijeka intramuskularno potrebna je hospitalizacija bolesnika što poskupljuje i produžava liječenje te znatno narušava kvalitetu života.



Slika 1. Komplikacija intramuskularne injekcije.

Nezaobilazna uloga medicinske sestre je u edukaciji bolesnika za samostalnu intravensku primjenu lijeka. Od 1996. godine oboljeli od hemofilije imaju službeno odobrenje za primjenu lijeka u kućnim uvjetima. Prema procjeni hematologa svaki oboljeli

od hemofilije koji je u programu kućne terapije dobiva preporuku za mjesecnu dozu lijeka, odobrava liječničko povjerenstvo ustanove, kao i HZZO. Isporuka lijeka se vrši u najbližu ljekarnu po mjestu stanovanja, a prema izboru bolesnika. Pacijent samostalno aplicira lijek u kućnim uvjetima. Veliku pozornost treba posvetiti edukaciji bolesnika i njihovih obitelji. Osim same aplikacije lijeka bolesnika mora znati kada je trenutak za primjenu lijeka, kako se čuva lijek, priprema lijeka poštjući aseptične uvjete u kući i pravilno zbrinjava otpad.

Edukacija bolesnika i obitelji vrši se u centrima za hemofiliju gdje se oboljeli od hemofilije liječi. Društvo hemofiličara Hrvatske svake godine organizira ljetni kamp koji za cilj ima edukaciju bolesnika i njihovih obitelji. U četiri dana koliko traje kamp provode se brojne edukacije, radionice za intravensku primjenu čimbenika zgrušavanja, predavanja koja drže različiti stručnjaci, npr hematolozi, psiholozi, stomatolozi, internisti i drugi.

Sveobuhvatna sestrinska skrb bolesnika s hemofilijom je vrlo zahtjevan i dugotrajan proces kroz koji se provode različite intervencije, a sve u svrhu smanjenja komplikacija krvarenja i poboljšanja kvalitete života oboljelih od ove rijetke i još uvijek neizlječive bolesti.

Kroz naš sustav edukacije bolesnika i do sada je prošao velik broj bolesnika i njihovih obitelji. Pravilo je bogatstvo to što danas sve veći broj bolesnika nema trajna oštećenja zglobova i mišića i postaju radno sposobna populacija koji više nisu niti etiketirani kao visokorizična skupina za prijenos zaraznih bolesti.

Literatura

1. Guide for the assessment of clotting factor concentrates for the treatment of hemophilia at www.wfh.org
2. Guidelines for the management of hemophilia at www.wfh.org
3. Zupančić Šalek S. i suradnici. Smjernice za dijagnostiku i liječenje hemofilije, izd: FotoSoft, 2013
4. Belev J. Plan sestrinske skrbi za oboljele od hemofilije, str.280- 285 u : Franković S. i suradnici. Zdravstvena njega odraslih, izd: Medicinska naklada i HUMS, Zagreb, 2010

Koliko je KROHEM utjecao na znanstvenu produkciju u hrvatskoj hematologiji?

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

Centar za ekspertnu medicinu, Voćarska 14, 10000 Zagreb
E-pošta: boris.labar@inet.hr

Jedna od važnih zadaća Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM je znanstvena publikacija. Razlog stvaranja i okupljanja hrvatskih hematologa unutar kooperativne grupe imao je za cilj ne samo podići razinu kvalitete stručnog rada definiranjem kliničkih smjernica, već organizirati klinička istraživanja ponajprije udruživanjem više hrvatskih centara. Rezultate takvih istraživanja trebalo je što prije objaviti u stručnim časopisima i tako pokazati trend dijagnostike i liječenja hematoloških bolesti u Hrvatskoj. Treba naglasiti da hematološki centri ne mogu samostalno provoditi takvu vrst kliničkih studija (nedovoljan broj bolesnika, nedostatna

dijagnostička i klinička logistika itd.), što je nedavna prošlost i te kako potvrdila. Vodeći hrvatski centri i njihovi hematolozi kao dio međunarodnih skupina (skupina za leukemiju i limfome EORTC-a, transplantaciju (EBMT), hemofiliju i kronični GvHD) aktivno su sudjelovali u objavljuvanju niza radova u svjetski priznatim časopisima. Stoga je jedan od prioriteta KROHEM-a bio, kako organizirati i provoditi prospektivne (retrospektivne) kliničke studije i njihove rezultate publicirati u prestižnim časopisima. Ne umanjujući vrijednost kliničkih prikaza, ovakve studije imaju posebnu težinu jer jasno ukazuju na trenutnu razinu kliničke skrbi hrvatske hematologije, pokazuju naše slabosti i/ili dobre strane u usporedbi s hematološkom praksom kako u razvijenim zemljama, tako i u zemljama u tranziciji.

Tablica 1. Broj radova publiciranih u razdoblju 2010-1014.

Autori (N)	CC		Ostali indeksi	Radovi		Ukupno
	IF<2	IF≥2		Hem.*	Nehem&	
15	58	19	34	84	27	111
<hr/>						
	Broj radova/autor		Autori s > 10 radova		Radovi vezani uz KROHEM	
	ukupno	CC	5	1		
15	7	5				

* Hem – hematološki radovi

& Nehem – nehematološki radovi

Za pretpostaviti je da znanstvene publikacije vodećih hrvatskih hematologa, ponajprije voditelja radnih skupina KROHEM-a, mogu ukazati na trend aktivnosti objavljivanja znanstvenih radova u hematologiji, te mogu biti pokazatelj utjecaja kooperativne grupe za hematologiju na znanstvenu publicističku aktivnost u hematologiji. Za ovo vrlo kratko priopćenje odabранo je 15 autora i njihova znanstvena produkcija od 01.01.2010 do 1.06.2014. (Tablica 1.). Temeljem NCBI baze podataka (PUBMED), vidljivo je da su vodeći hrvatski hematolozi objavili ukupno 111 radova, od toga oko 60% u CC časopisima što je više nego zadovoljavajuće. No većina objavljenih radova je u časopisima s IF <2 (npr. Coll Antropol.), a tek njih 19 u časopisima prepoznatljive međunarodne hematološke kvalitete. Oko 25% objavljenih radova navedenih autora nije povezano s hematologijom. U prosjeku vodeći hrvatski hematolozi objavili su oko 7 radova odnosno 5 radova indeksiranih u CC-u, u navedenom razdoblju, tj. nešto više od jednog rada godišnje. Tek njih petorica publiciralo je više od 10 radova.

Treba naglasiti da se u samo jednom radu navodi KROHEM, što jasno pokazuje, ako se izuzme Bilten, da ne postoji publicistička aktivnost KROHEM-a.

Nije moguće podrobnije analizirati trenutnu znanstvenu produkciju hrvatske hematologije, jer prikazani podaci za to nisu dostatni. No trend navedenih pokazatelja jasno ukazuje da znanstvena produkcija ne zadovoljava. Stoga je potrebno s jedne strane načiniti dublju analizu i pokušati predložiti kako i na koji način djelovati. Biltén KROHEM-a je iznimno vrijedna aktivnost, ali ne može zamijeniti publiciranje radova u priznatim hematološkim časopisima. Smatram da KROHEM treba potaknuti konkretne prijedloge kako u narednom razdoblju poboljšati znanstvenu publicističku produkciju. Publikacija samo jednog rada koja se povezuje s Kooperativnom grupom (Lijec Vjesn. 2010; 132(11-12):333-9.), jasno potvrđuje da smo u ovom području još daleko od zadovoljavajućeg pristupa. Objavljanje znanstvenih radova KROHEM-a nameće se kao jedan od neposrednih budućih prioriteta.

Osnivački sastanak Limfomske radne skupine Evropskog hematološkog društva

Dana 7.4.2014. je u Amsterdamu održan osnivački sastanak Limfomske radne skupine Evropskog hematološkog društva (EHA). Na sastanku je sudjelovalo 27 vrhunskih europskih stručnjaka za liječenje limfoma (Slika 1.). Ciljevi novoosnovane posebne radne skupine, koja će biti neovisna o farmaceutskim tvrtkama, su:

1. Unutar EHA-e stvoriti jaku skupinu koja će moći predstavljati i lobirati za interese zdravstvenih djelatnika i bolesnika kako tijela uprave (EMA, EU) tako i farmaceutsku industriju, npr. u pogledu dostupnosti novih lijekova, pravila o kliničkim istraživanjima itd.
2. Stvoriti platformu za istraživanja koja će omogućiti:
 - razmjenu podataka o kliničkim istraživanjima radi bolje koordinacije istraživačkih grupa;
 - provođenje opservacijskih studija u rijetkih vrsta limfoma;
 - metaanalize ili retrospektivne analize na temelju već postojećih podataka, npr. prognostičkih čimbenika, bioloških biljega ili kasnih nuspojava liječenja;

- davanje preporuka, npr. za izvođenje i interpretaciju nalaza pozitronske emisijske tomografije.

3. Identificiranje skupina bolesnika koji su najzanimljiviji u istraživanjima sponzoriranim od farmaceutskih tvrtki (npr. oni s primarno refraktornim limfomima, stari ili bolesnici lošeg općeg stanja) i usredotočavanje napora na te skupine.

Radna skupina planira unutar EHA-ine otvoriti vlastitu mrežu stranicu na kojoj će se nalaziti podaci o aktivnostima različitih skupina za istraživanje limfoma s poveznicama na njihove mrežne stranice te forum za istraživače na kojem će se moći predlagati nova istraživanja i prijavljivati zainteresirani za suradnju kao i razmjenjivati savjeti o neuobičajenim i teškim slučajevima. Struktura skupine će biti neformalna, bez potrebe ispunjavanja posebnih zahtjeva za članstvo. Na sastanku je izabran upravni odbor u koji su ušli Massimo Federico iz Italije, John Radford iz Velike Britanije, Martin Dreyling iz Njemačke, Marie Jose Kersten iz Nizozemske i Igor Aurer iz Hrvatske. Izbor prof. dr. Aurera u ovo tijelo predstavlja veliko priznanje hrvatskoj medicini, posebice hematologiji.



Kalendar predstojećih hematoloških skupova

Priredila: Vlatka Periša, dr. med.

- **Hematološki vikend 2015 - Sastanak Kooperativne skupine za multipli mijelom i Janssen u hematologiji: Novi terapijski pristupi u MM, MCL, CLL**
od 16.04. do 18.04.2015. u Hrvatskoj (Poreč)
- **European Focus on Myeloproliferative Neoplasms and Myelodysplastic Syndromes**
od 24.04. do 26.04.2015. u Hrvatskoj (Zagreb)
- **Proljetni sastanak KROHEMA 2015** od 07.05 do 09.05.2015. u Hrvatskoj (Plitvice)
- **International Conference on The Tumour Microenvironment in the Haematological Malignancies and its Therapeutic Targeting** od 07.05. do 09.05.2015. u Portugalu (Lisabon)
- **EHA-SWG Scientific Meeting Aging and Hematology: the next question...**
od 08.05. do 09.05.2015. u Portugalu (Lisabon)
- **19th Training Course on Haemopoietic Stem Cell Transplantation**
od 21.05 do 23.05.2015. u Španjolskoj (Malaga)
- **2. Simpozij „cGVHD and late complications after stem cell transplantation“**
29.05.2015. u Hrvatskoj (Zagreb)
- **20th Congress of the European Hematology Association EHA**
od 11.06 do 14.06.2015. u Austriji (Beč)
- **International Conference on AML „Molecular and translational“- Advances in the Biology and Treatment** od 10.09 do 12.09.2015. u Mađarskoj (Budimpešta)
- **EHA-SWG Scientific Meeting: Integrated approach to demanding hematological diagnosis, from MDS to leukemias** od 10.09. do 12.09.2015. u Španjolskoj (Barcelona)
- **EHA-SWG Scientific Meeting: Hemostasis imbalance: Critical issues and Therapeutic approaches** od 18.09. do 20.09.2015. u Španjolskoj (Barcelona)
- **17th Annual John Goldman Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy** od 01.10 do 04.10.2015. u Portugalu (Estoril)
- **Lymphoma & Myeloma 2015: An International Congress on Hematologic Malignancies**
od 22.10 do 24.10.2015. u SAD (New York)
- **37th Hematology Tutorial on Anemia of Chronic Disease and Myelodysplastic Syndromes** od 13.11 do 14.11.2015. u Češkoj (Prag)
- **Jesenjski sastanak KROHEMA 2015** u 11. mj. 2015 u Hrvatskoj.

**Povjerenstvo za stručno usavršavanje
članova KROHEM-a**

Predsjednik: Prof. dr. sc. Damir Nemet

Tajnica: Dijana Perčin

Voditelj evidencije edukacije: Robert Kufner

Članovi:

1. Dubravka Čaržavec
2. Dominik Lozić
3. Ozren Jakšić
4. Martina Morić Perić
5. Delfa Radić Krišto
6. Dubravka Sertić
7. Jasminka Sinčić Petričević
8. Toni Valković

Pravilnik o stručnom usavršavanju članova KROHEM-a

Članak 1.

Svaki član KROHEM-a ima pravo i dužnost kontinuirano obnavljati i dopunjavati svoje medicinsko znanje u skladu s napretkom medicinske struke i znanosti.

Članak 2.

Član KROHEM-a ostvaruje pravo i obvezu iz članka 1. ovog Pravilnika putem svih oblika stručnog usavršavanja kao što su stručni i znanstveni simpoziji, kongresi, predavanja i sastanci u zemlji i inozemstvu, korištenjem stručne literature, primanjem informacija putem interneta i drugih elektronskih medija te komunikacijom s drugim stručnjacima u zemlji i inozemstvu.

Članak 3.

U slučajevima kada se stručno usavršavanje održava na sastancima u zemlji i inozemstvu za što je potrebno pokriće troškova kotizacije, putnih troškova i troškova boravka izvan mjesta stanovanja, član ima pravo zatražiti od Povjerenstva za stručno usavršavanje KROHEM-a (u nastavku teksta: Povjerenstvo) pokriće troškova stručnog usavršavanja iz sredstava Fonda za stručno usavršavanje KROHEM-a.

Članak 4.

Zahtjev za pokriće troškova stručnog usavršavanja, član upućuje Povjerenstvu na propisanom obrascu, navodeći svoje podatke o statusu u KROHEM-u, podatke o stručnom/znanstvenom sastanku na kojem želi sudjelovati navodeći naziv i sadržaj sastanka, vrijeme i mjesto održavanja, broj dana boravka te svoju ulogu u sastanku (slušatelja ili aktivnog sudionika).

Članak 5.

Član mora podnijeti zahtjev Povjerenstvu najkasnije dva mjeseca prije sastanka na koji se zahtjev odnosi.

Članak 6.

Povjerenstvo razmatra zahtjev člana i na temelju priložene dokumentacije i podataka o sadržaju stručnog usavršavanja odobrava ili ne odobrava pokriće troškova stručnog usavršavanja iz Fonda za stručno usavršavanje KROHEM-a.

Članak 7.

Povjerenstvo će obavijestiti člana o svojoj odluci na za to propisanom obrascu.

Članak 8.

Nakon što član KROHEM-a dobije odobrenje pokrića troškova za stručno usavršavanje od Povjerenstva, ugovorit će organizaciju svog stručnog usavršavanja u zemlji ili inozemstvu s ovlaštenom putničkom agencijom.

Članak 9.

Po izvršenom putovanju član mora podnijeti pisano izvješće Povjerenstvu o svom sudjelovanju i stručnom usavršavanju na stručnom/znanstvenom sastanku u roku od 15 (petnaest) dana. Izvješće se podnosi na propisanom obrascu s podacima o imenu i sadržaju sastanka i ulozi koju je član imao na sastanku (slušatelj ili aktivni sudionik). Izvješće se šalje poštom, faksom ili elektronskom poštom na adresu Uprave KROHEM-a.

Članak 10.

Nakon obavljenog putovanja, putnička agencija koja je članu organizirala putovanje podnosi račun KROHEM-u s iznosom kotizacije, putnih troškova i troškova smještaja u mjestu stručnog usavršavanja.

Članak 11.

Po primljenom vjerodostojnom računu putničke agencije, KROHEM će iz Fonda za stručno usavršavanje podmiriti troškove stručnog usavršavanja člana za kotizaciju, putne troškove i troškove smještaja u mjestu održavanja stručnog usavršavanja. KROHEM neće podmirivati članu dnevnice niti druge troškove vezane uz putovanje, osim navedenih.

Članak 12.

Sastavni dio ovog Pravilnika su: Obrazac zahtjeva za podmirenje troškova stručnog usavršavanja, Obrazac odobrenja za podmirenje troškova stručnog usavršavanja i Obrazac izvješća o provedenom stručnom usavršavanju člana KROHEM-a.

Članak 13.

Ovaj Pravilnik je donesen na sjednici Upravnog odbora KROHEM-a dana 14. studenog 2014.

Članak 14.

Pravilnik stupa na snagu danom donošenja.

U Zagrebu, 14. studenog 2014.

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

K R O H E M

ZAHTJEV ZA PODMIRENJE TROŠKOVA STRUČNOG USAVRŠAVANJA ČLANA KROHEM-a

Datum:

PODNOSETELJ ZAHTJEVA:

Ime i prezime:

Ustanova zaposlenja:

Adresa:

Status u ustanovi – specijalist, specijalizant

Status člana:

- a. redoviti
- b. izvanredni
- c. drugo

Povjerenstvu za stručno usavršavanje KROHEM-a

Poštovani,

Molim da mi se iz Fonda za stručno usavršavanje KROHEM-a odobre troškovi sudjelovanja na (naziv sastanka) koji se održava (termin) od do u (navesti mjesto) Troškovi uključuju kotizaciju, putne troškove i troškove smještaja u hotelu za (broj dana).

Na sastanku sudjelujem kao:

- a. slušatelj
- b. aktivno kao pozvani predavač
- c. aktivno s radom/posterom

S poštovanjem,

(potpis)

KROHEM

IZVJEŠĆE ČLANA KROHEM-A O PROVEDENOM STRUČNOM USAVRŠAVANJU

Ime i prezime:

Adresa zaposlenja:

Naziv sastanka, vrijeme održavanja, sadržaj sastanka:

.....
.....

Sudjelovao na sastanku od do

u svojstvu:

- a. slušatelj
- b. aktivno s predavanjem
- c. aktivno s posterom/prezentacijom, sažetkom rada

Putovanje je organizirala putnička agencija

Potpis člana:

.....

U, datum

Bilješke:

Bilješke:

Bilješke:

Bilješke:

