
Sadržaj

B. Labar	
Uvodnik-----	3
A. Duletić-Načinović	
IRIS klinička studija: prikaz rezultata nakon 6 godina-----	4
V. Pejša	
Inhibitori tirozin kinaze druge generacije-----	5
D. Sertić	
ESSENCE - prikaz liječenih bolesnika-----	6
R. Zadro	
Molekularna dijagnostika-----	7
M. Mikulić	
Registar akutnih leukemija-----	8
V. Pejša	
Terapija AML u bolesnika starijih od 60 godina-----	9
R. Kušec	
O novoj klasifikaciji kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi-----	10
R. Kušec	
Prijedlog terapijskog protokola za primarnu mijelofibrozu-KROHEM-PMF01-----	12
J. Batinić	
Registar oboljelih od multiplog mijeloma-----	14
T. Valković	
Uporaba zoledronične kiseline u liječenju bolesnika s multiplim mijelomom-----	15
S. Zupančić Šalek	
Retrospektivno istraživanje uzroka smrti u bolesnika s hemofilijom i drugim nasljednim koagulopatijama u Republici Hrvatskoj-----	16
D. Pulanić	
Prijedlog prospektivnog ispitivanja učestalosti genetskih i okolišnih čimbenika trombofilije u novodijagnosticiranih bolesnika s tromboembolijskim incidentima u Republici Hrvatskoj-KROHEM-VTE01-----	17
M. Mrsić, K. Fumić, R. Štern Padovan, K. Potočki, N. Duraković, M. Prutki, B. Labar	
Iskustva u otkrivanju i uspješnom liječenju Gaucherove bolesti u Hrvatskoj-----	18
S. Bašić-Kinda i I. Aurer	
Trebamo li promjene u hrvatskom konsenzusu dijagnostike i liječenja limfoma?-----	25
M. Dominis	
Epidemiološka studija malignih limfoma u Republici Hrvatskoj-----	29

S. Bašić-Kinda Upitnik o biopsijama kosti-----	29
I. Radman, S. Bašić-Kinda, M. Vodanović, I. Aurer, R. Ajduković –Stojisavljević, B. Labar CCEP – u liječenju bolesnika s uznapredovalim limfomom-----	30
M. Mrsić Zaklada “Ana Rukavina” i Registar davatelja krvotvornih matičnih stanica-----	31
M. Dominis Sjećanje na prof. dr. sc. Marina Nolu-----	35
S. Štifter, K. Lučin, B. Grahovac, I. Hadžisejdić, T. Valković, I. Seili-Bekafigo, A. Načinović-Duletić, D. Petranović, I. Host, B. Marijić, M. Aralica, Š. Dvornik, N. Jonjić Angiogeneza u multiplom mijelomu-----	36
I. Ilić Međunarodni projekt non-Hodgkinovih limfoma – suradnja s non-Hodgkin lymphoma study group-----	37
I. Ilić Novi prognostički biljezi u difuznom velikostaničnom limfomu-----	37
M. Sučić, I. Kardum-Skelin, M. Nakić, M. Marković-Glamočak, S. Ries, K. Gjadrov Kuveždić Prijedlog dijagnostičkog algoritma za akutne leukemije-----	38
I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, B. Jelić-Puškarić, I. Fabijanić, M. Milas, Z. Šiftar, M. M. Kardum Paro, R. Kušec, R. Lasan-Trčić, H. Minigo, S. Ostojić-Kolonić, A. Planinc-Peraica, R. Vrhovac, D. Radić- Krišto, B. Jakšić Citomorfologija i dodatne tehnologije iz citološkog uzorka u dijagnostičkom algoritmu povećanog limfnog čvora-----	40
K. Gjadrov Kuveždić i S. Ries Usporedba morfoloških i citogenetskih promjena stanica kod bolesnika s AML sa znacima mijelodisplazije-----	44
J. Roganović Klofarabin u liječenju pedijatrijskih bolesnika s akutnom leukemijom u relapsu ili s refraktornom leukemijom-----	46
S. Čulić Primjena citokina u pedijatrijskoj onkologiji - antiangiogena terapija-----	47

Uvodnik

KROHEM sve više postaje dio naše hematologije. Unatoč svim poteškoćama, prepoznajemo ne samo viziju nego i put kako do nje.... No još uvijek prisutna sumnja, različita gledišta, pa i potpuno oprečni stavovi otvaraju nam tako potrebnu kritičku snagu da znanstveni rad u kliničkoj hematologiji bude na potreboj kvalitetnoj razini. Nakon Umaga treba istaći da se naše različitosti sve više prepoznaju kao pozitivna stručna i znanstvena interakcija ove naše kooperativne grupe.

KROHEM treba u svojoj biti omogućiti što brži razvoj i primjenu dijagnostičkih i terapijskih programa u hematologiji u svim krajevima Hrvatske. Već sada se može utvrditi da smo na dobrom putu da ga učinimo prepoznatljivim unutar zemlje. Kako? Odabrali smo nekoliko načina. KROHEM je pravo mjesto gdje treba raspraviti, predložiti, prihvati i provoditi dijagnostičko - terapijske postupnike. Zato su nam važne prospективne, opservacijske studije kliničke faze IV. Te bi studije trebale ukazivati na dosegnutu razinu kliničkog rada i na sposobnost implementacije dijagnostičko - terapijskih postupnika u klinički rad. Izrada registara pojedinih hematoloških bolesti preduvjet je racionalnog pristupa u provedbi bilo kojeg kliničkog prospективnog ispitivanja. Stoga naša nastojanja da zajednički postavimo registre iz godine u godinu pokazuje znatan napredak i već sada možemo zaključiti da smo izradili elektronske verzije registara u limfoma, multiplog mijeloma i akutnih leukemija. U pripremi je i registar bolesti hemostaze i tromboze. I na kraju su kliničke prospективne istraživačke studije koje se već uvelike raspravljavaju na našim sastancima. Tu još uvijek ima lutanja, nedoumica, osjećaja da je gotovo nemoguće u nas organizirati pravo kliničko ispitivanje... Međutim, i puno veće kooperativne grupe raspravljaju o predloženim kliničkim ispitivanjima u prosjeku 1-2 godine, i što je važnije nisu svi prijedlozi ni prihvaćeni niti se objektivno mogu provesti. To će tako biti i u nas. Treba vjerovati da možemo osmislići klinička ispitivanja koja će biti provediva u našoj sredini a koja će istodobno moći polučiti kvalitetnu informaciju medicine koja se temelji na dokazima.

KROHEM treba što prije biti prepozнат u našoj sredini. Stoga su publikacije u stručnim i znanstvenim časopisima iznimno važne, gotovo jednako važne kao i klinička ispitivanja. U sadašnjem trenutku nameće se nekoliko mogućnosti, npr. prikaz incidencije pojavnosti zločudnih tumora krvotvornog sustava (podaci Registra), liječenje kronične mijeloične leukemije imatinibom, te rezultati retrospektivnih studija KROHEM-a. Ispitivanje uzroka smrti bolesnika s hemofilijom i drugim naslijednim koagulopatijama samo je jedna takva studija raspravljena i prihvaćena na sastanku u Umagu. Neizmjerno je važno da svaki naš Centar sudjeluje i dostavi pokazatelje kako u

registre tako i za odgovarajuće kliničke studije. To će u svakom slučaju osigurati kvalitetu budućih publikacija.

KROHEM je optimalan način organizacije i suradnje na području kliničkih ispitivanja na međunarodnoj razini. Treba istaknuti da će se KROHEM uključiti kao prepoznatljiva kooperativna grupa u mrežu European Leukemia Net za Registar kronične mijeloične leukemije. Istodobno treba poticati suradnju KROHEM-a s međunarodnim kooperativnim grupama kao što su EORTC, GIMEMA, PETHEMA, nacionalne kooperativne grupe Njemačke i drugih zemalja, te udruge naslijednih bolesti hemostaze. Ovu suradnju je moguće podijeliti u nekoliko faza. Prva faza već je uveliko „odrađena“, jer gotovo dva desetljeća postoji aktivna suradnja naših vodećih hematoloških centara s prestižnim međunarodnim kooperativnim grupama (EORTC leukemijska i limfomska grupa, BFM pedijatrijska grupa za akutne leukemije). Sljedeći je korak uključivanje KROHEM-a kao aktivnog sudionika međunarodnih kooperativnih grupa, po modelu suradnje npr. EORTC grupe i talijanske GIMEMA grupe. To je proces i nije moguće u ovaj mah predvidjeti brzinu kojom će se ostvarivati. Što nosi ovakva suradnja hrvatskoj hematologiji odnosno našoj kooperativnoj grupi? Navedimo samo jednu od mogućnosti. To je provedba kliničkih ispitivanja koje nije moguće provesti u Hrvatskoj jednostavno zbog malog broja bolesnika. Suradnja s međunarodnim kooperativnim grupama omogućuje potencijalno daleko veći broj bolesnika koji će biti uključeni u studiju i koji će moći dati odgovor na postavljene ciljeve kliničkog ispitivanja u razumnom vremenskom razdoblju.

I na kraju, činjenica da mnogi žele vidjeti KROHEM u svojoj sredini samo nas ispunjava zadovoljstvom da radimo koristan posao za našu kliničku medicinu i hematologiju.

Uz srdačne pozdrave, vidimo se u Koprivnici, odnosno Đurđevcu u svibnju 2009. godine.

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

Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinički bolnički centar Zagreb
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: boris.labar@inet.hr

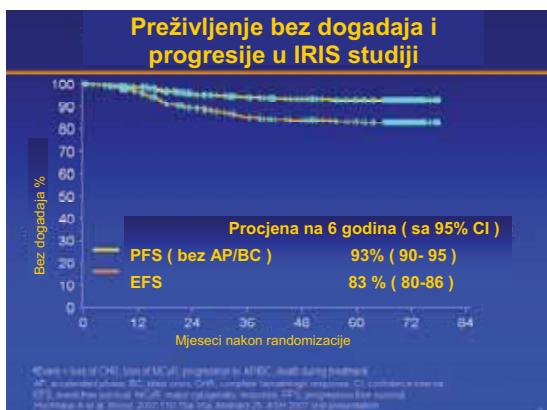
IRIS klinička studija: prikaz rezultata nakon 6 godina

Doc. dr. sc. Antica Duletić-Načinović, dr. med.
Zavod za hematologiju, reumatologiju
i kliničku imunologiju,
Klinički bolnički centar Rijeka
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
E-pošta: antica.duletic-nacinovic@ri.t-com.hr

Uvođenje imatinib-a u terapiju kronične mijeloične leukemije (KML) promijenilo je tijek i ishod bolesti rezultirajući boljim odgovorom bolesnika na liječenje. Imatinib je danas preporučen za prvu liniju terapije u novodijagnosticiranih bolesnika s KML u kroničnoj fazi i u pacijenata s KML u akceleriranoj fazi.

International Randomized Study of Interferon and ST1571 (IRIS) je dizajnirana tako da su u jednu skupinu uključeni bolesnici liječeni imatinibom, a u drugu bolesnici liječeni u to vrijeme standardnom terapijom (interferon-alfa (INF-alfa) + citarabin (Ara-C)). U studiju je uključeno 1106 novodijagnosticiranih bolesnika s KML u kroničnoj fazi bolesti. Bolesnici liječeni imatinibom primali su lijek u dozi od 400 mg na dan. Nakon 6 godina praćenja 66% bolesnika koji su započeli terapiju imatinibom je i dalje na toj terapiji, a 67% bolesnika koji su iz terapije INF-alfa+Ara-C prešli na terapiju imatinibom nastavlja i dalje ovu terapiju druge linije. Od 34% pacijenata koji više ne primaju imatinib kao prvu liniju terapije skoro je polovica prekinula terapiju zbog razloga nevezanih uz KML.

„Preživljivanje bez događaja“ (engl. „event-free survival“ - EFS) je za skupinu liječenu imatinibom 83%, što je znatno više u odnosu na skupinu bolesnika liječenih INF-alfa+Ara-C gdje EFS iznosi 63% ($p<0.001$). „Preživljivanje bez progresije“ (engl. „progression-free survival“ - PFS) je 93% za bolesnike liječene imatinibom, a 86% za one liječene INF-alfa + ARA-C ($p<0.001$).



Slika 1. Preživljivanje bez događaja i progresije u IRIS studiji

„Sveukupno preživljivanje“ (engl. „overall survival“ - OS) nakon praćenja od 6 godina za skupinu liječenu imatinibom iznosi 88%, a ako se izostave smrti nepovezane s KML-om, onda iznosi 95%. Imatinib se dokazao kao siguran lijek za dugotrajnu primjenu jer se većina nuspojava III i IV stupnja pojavljivala tijekom prve i druge godine liječenja, a kasnije vrlo rijetko, tako daje samo 5% bolesnika prekinulo studiju radi nuspojava. Izrazita je razlika u postizanju kompletног citogenetskog odgovora (CCyR) koji za skupinu liječenu imatinibom iznosi 82%, a za drugu skupinu samo 12%. CCyR je postiglo 81% bolesnika koji su inicijalno liječeni INF-alfa+Ara-C a potom su prešli na drugu liniju liječenja imatinibom. Većina bolesnika (78%) je postigla CCyR u manje od 18 mjeseci, a 52% je postiglo CCyR unutar prvih 6 mjeseci. OS i stabilnost postignutog CCyR su neovisni od vremena postizanja CCyR ali je OS značajno duži kod bolesnika koji su postigli CCyR od onih koji nisu postigli CCyR primajući imatinib ($p<0.001$). U IRIS studiji 19% bolesnika je primalo povećane doze imatinib-a. Retrospektivna analiza razloga za povećanje doze u IRIS studiji i rezultati liječenja prikazani su u tablicama 1. i 2.

Retrospektivna analiza razloga za povećanje doze u IRIS studiji (n=106)

Razlozi po protokolu IRIS studije (n=39)	n (%)
Nema CHR na 3 mjeseca	7 (18)
Bez malog CyR na 12 mjeseci	8 (21)
Gubitak MCyR	18 (44)
Progresija bolesti	6 (15)
Razlozi po ELN kriterijima (N=48)	n (%)
3 mjeseca: neuspjeh (nema HR) ili suboptimalan odgovor (<CHR)	7 (15)
6 mjeseci: neuspjeh (nema CHR, nema CyR)	1 (2)
12 mjeseci: suboptimalni odgovor (nema CCyR)	4 (8)
12 mjeseci: neuspjeh (nema MCyR)	11 (23)
18 mjeseci: neuspjeh (nema CCyR)	10 (21)
Neuspjeh u bilo koje vrijeme; gubitak odgovora	15 (31)

CHR=complete response; HR=partial response; CyR=cytogenetic response; MCyR=minor cytogenetic response; CCyR=complex cytogenetic response; CI=confidence interval; PFS=progression-free survival; HR=histological response; Kataljpski H. Hematol. Blood 2007; 11(2):217s. Abstract 1047. ASH 2007 poster presentation.

Povećanje doze u IRIS studiji: Zaključak rezultata

Na 36 mjeseci

Podaci za preživljivanje	Povećanje doze prema		
	IRIS (n=39)	ELN (n=48)	Cijela kohorta N = (106)
PFS	81 %	90 %	89 %
OS	81 %	89 %	84 %

Na 12 mjeseci: POVEĆANJE DOZE PO IRIS STUDIJI

- 86% je postiglo HR koji nisu imali do tada ili su ga izgubili
- 38% je postiglo CyR kojega nisu imali do tada ili su ga izgubili

Na 18 mjeseci: POVEĆANJE DOZE PO ELN SMJERNICAMA

- 67% je postiglo HR koji nisu imali do tada ili su ga izgubili
- 36% je postiglo CyR kojega nisu imali do tada ili su ga izgubili

OS, overall survival
Kataljpski H. Hematol. Blood 2007; 11(2):217s. Abstract 1047. ASH 2007 poster presentation.

Tablica 1. i 2.

Povećanjem doze imatiniba 86% bolesnika je postiglo hematološku remisiju (koju nisu do tada imali ili su je izgubili), a 38% bolesnika je postiglo citogenetsku remisiju (koju također do tada nisu imali ili su je izgubili). Subanaliza studije potvrđuje da su vrijeme do CCyR i procijenjeni ukupni kumulativni CCyR različiti ovisno o razini imatiniba u plazmi, i da je razina imatiniba u plazmi neovisni prognostički pokazatelj za postizanje CCyR u bolesnika s KML-om u kroničnoj fazi.

Zaključak: Imatinib je potvrđen kao standardna prva linija liječenja svih novodijagnosticiranih bolesnika s KML u kroničnoj fazi. Rezultati IRIS studije potvrđuju 88% ukupno preživljenje bolesnika liječenih imatinibom, što nadilazi uspjehe svih ranijih oblika liječenja KML-a. 93% bolesnika ima preživljenje bez progresije bolesti u akceleraciju ili blastičnu krizu. Postizanje CCyR u bilo koje vrijeme je povezano s odličnom prognozom. Imatinib se pokazao sigurnim lijekom. U 106 bolesnika (19%) je povećana doza imatiniba, a rezultati praćenja od 3 godine pokazuju da 89% bolesnika nije progrediralo u akceleraciju ili blastičnu krizu, dok je 84% živo. Navedeno dokazuje da povećanje doze treba biti primarna terapijska opcija u bolesnika s KML koji nisu postigli očekivani odgovor na standardnu dozu imatiniba. Potrebno je pratiti koncentraciju imatiniba u plazmi u pacijenata s nezadovoljavajućim odgovorom kako bi se terapija mogla optimalizirati.

Inhibitori tirozin kinaze druge generacije

Prof. dr. sc. Vlatko Pejša, dr. med.

Odjel hematologije

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Dubrava i Medicinski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: vpejsa@kbd.hr

Otkriće prvog inhibitora tirozin kinaze (TKI) imatinib-mesilata (Glivec, ST1571) donijelo je revoluciju u terapiji kronične mijeloične leukemije (KML). Imatinib-mesilat (Glivec) danas je standardna prva linija terapije kod tih pacijenata i kod velike većine je učinkoviti. U malog broja pacijenata javlja se intolerancija ili rezistencija na imatinib (17% kroz 5 godina), a razlozi su najčešće prejaka ekspresija bcr-abl, točkaste mutacije u bcr-abl genu, kromosomske anomalije. Rezistenciju na imatinib dijelimo na primarnu (terapija je neučinkovita – nema citogenetskog ili hematološkog odgovora) i stečenu (progresija bolesti nakon citogenetskog ili hematološkog odgovora). Pod intolerancijom podrazumijevamo prekid terapije zbog toksičnosti imatiniba u terapijskim dozama, te nepodnošenje ≥ 400 mg/dan. Stoga su novi važan korak u liječenju takvih bolesnika noviji lijekovi,

tj. inhibitori tirozin kinaze druge generacije. Iako je više njih već u kliničkim ispitivanjima, danas dostupni i registrirani lijekovi za 2. liniju u liječenju KML-a su nilotinib (Tasigna) i dasatinib (Sprycel).

Nilotinib odlikuje *in vitro* jače vezivanje za bcr-abl od imatiniba, postiže višu intracelularnu koncentraciju od imatiniba te je aktiviran protiv 32 od 33 bcr-abl mutacija koje se najčešće vezuju uz rezistenciju na imatinib. Nakon liječenja nilotinibom 77% pacijenata kod kojih nije uspjela terapija imatinibom postiglo je kompletну hematološku remisiju, a njih 42% i kompletну citogenetsku remisiju (Tablica 1.) (Mauro et al. J. Clin. Onc 26:2008 (May 20 suppl; abstr 7009). Oral Presentation; Kantarjian et al. J. Clin. Onc 26:2008 (May 20 suppl; abstr 7010). Oral Presentation; Brummendorf et al. J. Clin. Onc 26:2008 (May 20 suppl; abstr 7001). Oral Presentation).

Kontraindikacije za primjenu nilotiniba su nekorigirana hipokalemija i hipomagnezemija te produženi QT interval. Lijek je mijelotoksičan, a zabilježeni su i slučajevi nagle smrti.

Dasatinib ima različitu kemijsku strukturu od imatiniba i nilotiniba, manje je selektivan, inhibira najmanje 15 kinaza (bcr/src) uz dodatak brojnih ne-kinaznih struktura te se također veže za bcr-abl većim afinitetom od imatiniba. Nakon liječenja dasatinibom 91% pacijenata kod kojih nije uspjela terapija imatinibom postiglo je kompletну hematološku remisiju, a njih 53% i kompletну citogenetsku remisiju (Tablica 1.) (Mauro et al. J. Clin. Onc 26:2008 (May 20 suppl; abstr 7009). Oral Presentation; Kantarjian et al. J. Clin. Onc 26:2008 (May 20 suppl; abstr 7010). Oral Presentation; Brummendorf et al. J. Clin. Onc 26:2008 (May 20 suppl; abstr 7001). Oral Presentation).

Dasatinib pokazuje više nuspojava nego nilotinib, a posebno treba istaknuti pleuralne izljeve te krvarenja koja se javljaju kod oko 1/3 bolesnika (11% su gr. 3-5).

Tablica 1.

	Dasatinib	Nilotinib	Bosutinib (još nije registriran)
CHR	91%	77%	89%
McyR	62%	58%	41%
CCyR	53%	42%	30%

Zaključak: Druga generacija TKI ima dokazanu uspješnost kod pacijenata rezistentnih ili intolerantnih na imatinib. Svim tim bolesnicima trebaju biti ponuđeni TKI 2. generacije prije alotransplantacije. Obzirom na učinkovitost i nuspojave lijek izbora kod tirozin kinaza 2. generacije je nilotinib.

Alotransplantacija je indicirana samo kod:

- Detekcije T315I
- Zatajenja u AF/BF (bilo koji TKI)
- Zatajenja 2. generacije TKI

ESSENCE – prikaz liječenih bolesnika

Dr. Dubravka Sertić
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinički bolnički centar Zagreb
E-pošta: dsertic@net.hr

Od veljače 2007. godine provodi se klinička studija ESSENCE - procjena djelotvornosti i sigurnosti imatinib mesilata (Glivec®) u bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom (KML) u kroničnoj fazi bolesti. Radi se o otvorenom, nerandomiziranom, multicentričnom neinterventnom ispitivanju. Prvotno je bilo planirano uključivanje 15 centara iz Hrvatske ali se do sada aktivno uključilo 7 centara: KB Osijek, KBC Rijeka, KBC Split, OB Varaždin, OB Zadar, KB Dubrava i KBC Zagreb. Ispitanici su oboljeli od Philadelphia pozitivne KML u kroničnoj fazi bolesti, stariji od 20 godina a koji nisu ranije primali imatinib (najduže 2 tjedna prije uključivanja u studiju). Ispitivanje traje 24 mjeseca, a bolesnici se kontroliraju svaka 3 mjeseca (ukupno 9 pregleda). Uključivanje bolesnika traje od veljače 2007. godine do kraja veljače 2009. Završetak ispitivanja se planira u veljači 2011. godine. Ciljevi studije su procijeniti incidenciju KML u Hrvatskoj, kojom dozom imatiniba se bolesnici liječe, utvrditi suradnju bolesnika, nuspojave, toksičnost, te hematološki, citogenetski i molekularni odgovor na liječenje. Na Slici 1. su prikazani kriteriji terapijskog odgovora, a na Slici 2. preporuke za procjenu terapijskog odgovora. U studiju je do sastanka KORHEM-a u Umagu bilo uključeno 47 bolesnika, 6 bolesnika je prijevremeno prekinulo liječenje, a 41 nastavlja studiju. 8 bolesnika je na terapiji manje od 3 mjeseca, a od preostalih 33 bolesnika svi su postigli kompletan hematološki odgovor, 24 bolesnika je postiglo kompletan citogenetski odgovor, 4 bolesnika veliki molekularni odgovor, a 3 bolesnika kompletan molekularni odgovor. Za 6 bolesnika nedostaju podaci za citogenetski i molekularni

odgovor. Za sada se može zaključiti da je provođenje studije dovelo do poboljšanja standarda liječenja bolesnika s KML, preciznijeg praćenje bolesnika, osobito uzimanja lijeka i terapijskog odgovora, te do primjenjivanja adekvatne doze imatinib-a. Do idućeg sastanka KROHEM-a će uključivanje bolesnika u studiju biti završeno, uz duži period praćenja bolesnika. U budućnosti bi bilo potrebno osmislitи novu studiju za bolesnike s KML u kojoj bi se inzistiralo na redovitom molekularnom praćenju terapijskog učinka, kao i praćenje bolesnika s KML liječenih drugom generacijom inhibitora tirozin kinaze.

Slika 1. Kriteriji terapijskog odgovora

Definicija terapijskog odgovora

Kompletan hematološki odgovor (hematološka remisija)	CHR	Normalna KKS i dif leukogram, nema ekstramedularne bolesti
Minimalni citogenetski odgovor		66–95% Ph+
Mali citogenetski odgovor		36–65% Ph+
Djelomični citogenetski odgovor	PCR	1–35% Ph+
Kompletan citogenetski odgovor (kompletna citogenetska remisija)	CCR	0% Ph+
Veliki citogenetski odgovor	MCR (PCR+CCR)	0–35% Ph+
Veliki molekularni odgovor	MMR	>3 log redukcija bcr/abl mRNA
Potpun molekularni odgovor (kompletna molekularna remisija)	CMR	Negativni RT-PCR

Slika 2. Preporuke za procjenu terapijskog odgovora

ELN-Preporuke za procjenu terapijskog odgovora-2006

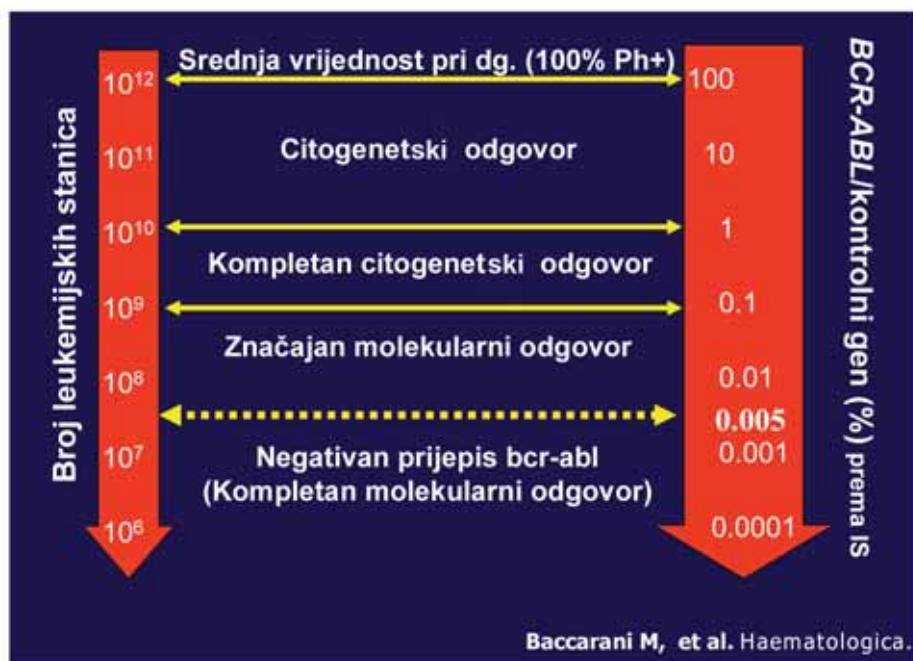
vrijeme	neuspjeh	suboptimalni odgovor	Upozorenje
pri dijagnozi	—	—	visoki rizik del 9q+ DKA u Ph+ st
3 mj.	nema HR	<CHR	
6 mj.	<CHR nema CR	<PCR	
12 mj.	<PCR	<CCR	<MMolR
18 mj.	<CCR	<MMoR	
bilo kada	gubitak CHR gubitak CCR Mutacije na IM	DKA u Ph+st gubitak MMoR Mutacije na IM	svaki ↑ razine bcr/abl OKA u Ph- st

Molekularna dijagnostika

Prof. dr. sc. Renata Zadro

Zavod za hematologiju i koagulaciju
Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC
Zagreb
E-pošta: rzadro@mef.hr

Molekularne metode kvantitativnog mjerjenja fuzijskog prijepisa bcr-abl u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji (KML) razvijene su 1999. godine za praćenje kinetike ostatnog fuzijskog prijepisa tijekom vremena. U terapiji imatinibom ili bilo kojim drugim inhibitorom tirozin kinaze praćenje kvantitativnom polimeraznom lančanom reakcijom sastavni je dio obrade bolesnika. Kada se postigne kompletan citogenetski odgovor (CCgR), broj ostatnih Ph+ stanica može se izmjeriti jedino kvantitativnim molekularnim metodama jer razina fuzijskog prijepisa bcr-abl u perifernoj krvi dobro korelira s brojem leukemijskih stanica (Slika 1.).



Slika 1. Odnos broja leukemijskih stanica, minimalne ostatne bolesti i citogenetskog odgovora, Baccarani M, et al. Haematologica. 2008.

Značajan molekularni odgovor (MMoR) definira se kao 0,1% omjera bcr-abl/kontrolni gen prema međunarodnoj ljestvici (engl. *International Scale*, IS). Nepostizanje MMoR u 18 mjeseci terapije smatra se suboptimalnim odgovorom te je potrebna re-evaluacija i promjena terapije.

Različitost molekularnih pristupa čini usporedbu rezultata kvantitativne polimerazne lančane reakcije između različitih laboratorija i u različitim studijama problematičnim. Potreba za harmonizacijom postupaka i načina izražavanja rezultata potaknula je međunarodno nastojanje u uspostavi preporuka za generaciju i interpretaciju molekularnih nalaza u KML. Preporuke uključuju:

- uporabu EDTA periferne krvi (10 mL) kao izvora stanica za analizu minimalne ostatne bolesti;
- izražavanje rezultata prema međunarodnoj ljestvici (IS);
- standardizaciju uporabom referentnog pripravka (koji još nije dostupan);
- definiciju kompletognog molekularnog odgovora koji je zbog različite osjetljivosti kvantitativnih metoda zamijenjen "negativnim (nemjerljivim) prijepisom bcr-abl" jer bolje opisuje biološko stanje.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb proglašen je referentnim laboratorijem za područje Hrvatske, Makedonije, Srbije, Bosne i Hercegovine, te Albanije u harmonizaciji izražavanja rezultata prema međunarodnoj ljestvici za dodjelu faktora pretvorbe laboratorijima koji vrše kvantifikaciju fuzijskog prijepisa bcr-abl.

Kvantitativni PCR u uzorku periferne krvi provodi se svaka 3 mjeseca kod bolesnika koji su postigli MMoR, odnosno za identifikaciju bolesnika sa zakašnjelim odgovorom uz stalan pad % bcr-abl te bolesnika s konstantim povećanjem razine bcr-abl koji se ili ne pridržavaju terapije ili su razvili mutacije. Otkriveno je više od 90 mutacija u kinaznoj domeni gena ABL te su donešene preporuke za:

- probiranje na mutacije kod bolesnika sa suboptimalnim odgovorom na terapiju, kada odgovora na terapiju uopće nema ili prije terapije kod bolesnika u blastičnoj krizi;
- analizu mutacija nakon povećanja fuzijskog prijepisa za 1 log progresivno tijekom vremena.

Registar akutnih leukemija

Mr. sc. Mirta Mikulić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: mpisk@mef.hr

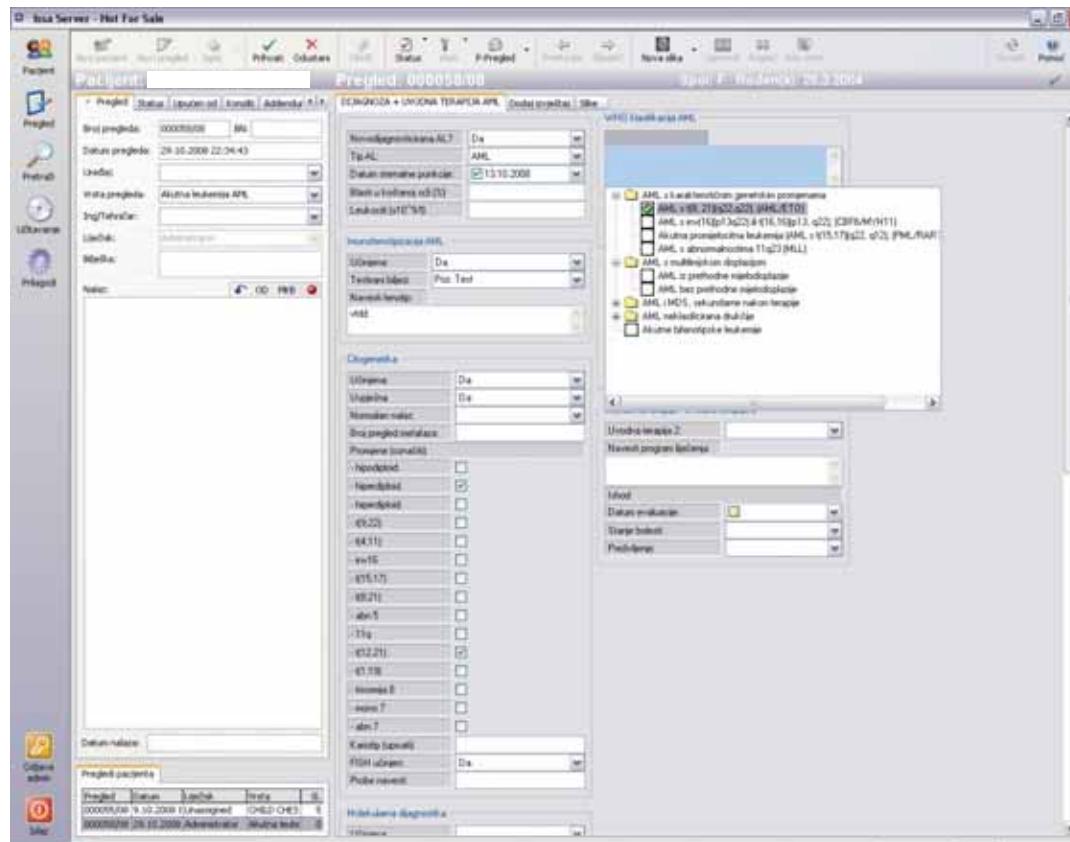
Na sastanku KROHEM-a u Zadru u svibnju 2008. g. dogovoreno je osnivanje Registra bolesnika s akutnim leukemijama. Svrha regista je uvid u incidenciju akutnih leukemija u našoj zemlji, a isto tako i načina i uspješnosti liječenja. Za sastanak u Umagu većina je centara ispunila upitnik s osnovnim podacima bolesnika s novodijagnosticiranom bolesti u 2007. i prvoj polovici 2008. godine. Upitnik je sadržavao uistinu samo najosnovnije: inicijale i datum rođenja bolesnika, spol, datum dijagnoze, tip akutne leukemije (AML, ALL, AL), način liječenja (intenzivna i palijativna kemoterapija te suportivno liječenje) i podatak je li bolesnik ostao na liječenju u centru gdje je dijagnoza postavljena ili je premješten u drugi centar.

Za 2007. godinu u registar je prijavljeno 177 bolesnika – 150 odraslih i trinaestero djece, a za svega četrnaest bolesnika su postojale dvostrukе prijave. Iz prikupljenih

podataka može se vidjeti da je među odraslim bolesnicima bilo 78 muškaraca i 72 žene, a otprilike 60% su činili bolesnici stariji od 60 godina. Većina bolesnika mlađih od 60 godina i tek oko 30% starijih liječena je intenzivnom kemoterapijom.

Na sastanak u Umagu prikazali smo prijedlog elektronske baze podataka o bolesnicima s akutnim leukemijama koji bi bio formiran u programu Issa 3.1 tvrtke VamsTec iz Zagreba (Slika 1.). Registru bi se pristupalo putem interneta, što bi bilo omogućeno svim članovima KROHEM-a. Predviđen je osnovni i detaljan izvještaj o bolesniku. Osnovni izvještaj bi sadržavao podatke o inicijalima, datumu rođenja i spolu bolesnika, zatim o datumu dijagnoze i dijagnozi prema klasifikaciji SZO, načinu liječenja te matični broj u registru, ime nadležnog liječnika i ustanovu. Detaljni bi izvještaj sadržavao pojedinosti o dijagnozi i uvodnoj terapiji, ovisno o tipu akutne leukemije, zatim podatke o postremisijskoj terapiji uključujući i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica te podatke o praćenju bolesnika. Kao i kod svake elektronske baze, postojala bi mogućnost pretraživanja po brojnim poljima te prijenos podataka u druge programe u svrhu statističke analize.

Baza je još u izradi i svi su pozvani dati svoje prijedloge kako bi bila što bolja. Molimo sve koji se žele podrobnije informirati ili dati mišljenje da se jave dr. Mirti Mikulić na mpisk@mef.hr.



Terapija AML u bolesnika starijih od 60 godina

Prof. dr. sc. Vlatko Pejša, dr. med.

Odjel hematologije

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Dubrava i Medicinski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: vpejsa@kbd.hr

Uvod

Akutna mijeloična leukemija (AML) ima veću prevalenciju kod starijih (SAD 17,6/ 100.000 kod >65 godina) u usporedbi s mlađima od 65 godina (1,8/100.000).

U usporedbi s mlađim bolesnicima s AML, stariji bolesnici imaju: lošiji PS, povećanu incidenciju MDR, manji % povoljne citogenetike, veći % nepovoljne citogenetike, veću smrtnost poveznu s terapijom, veću incidenciju primarno rezistentnih AML, niži stupanj CR, PFS i OS.

Rizični faktori u AML su: nepovoljna citogenetika (+8,-5,-7, t(6;9)...), ekspresija MDR1, prethodna/popratna hematološka bolest (MDS, MPS), CD34+ imunofenotip, genske mutacije (Flt3).

Terapija AML-a u starijoj dobi

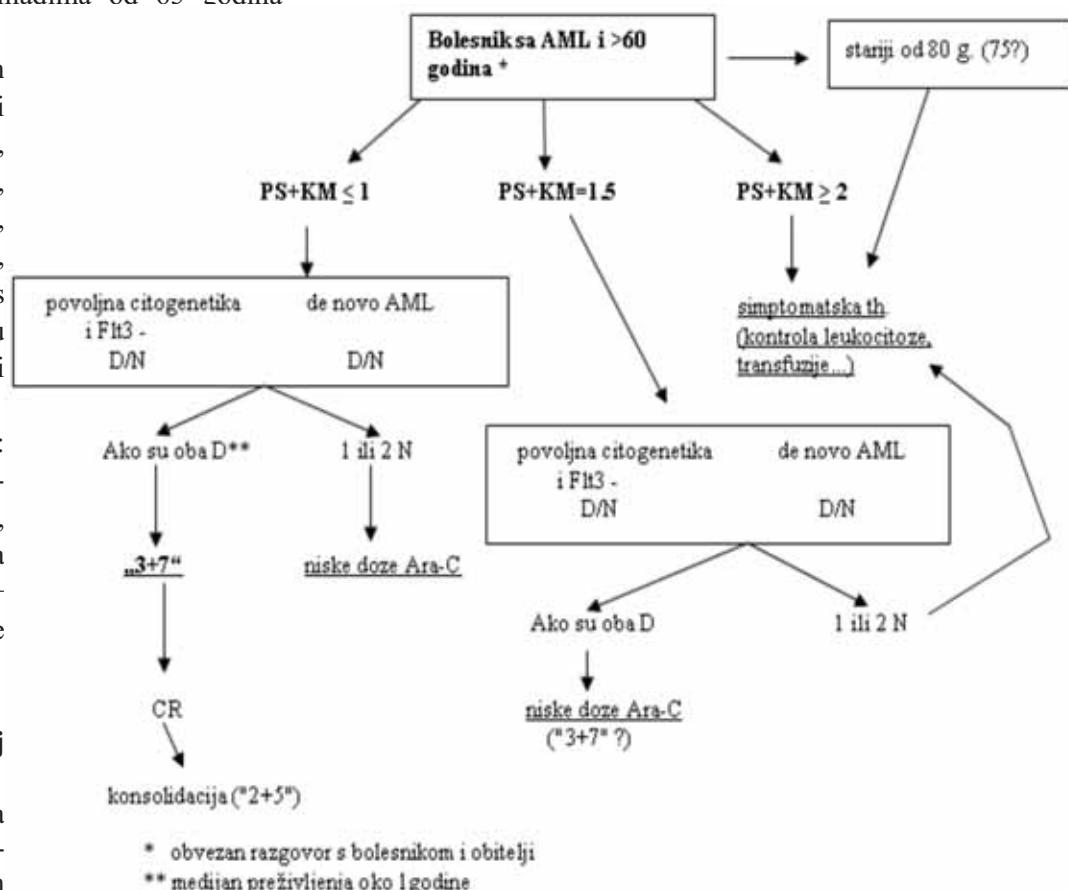
U većini serija starijih pacijenata s *de novo* AML, CR je bio 40-60%, sa srednjim preživljjenjem od 7-12 mjeseci. Pokušano je s brojnim terapijskim opcijama no niti jedna se nije pokazala posebno uspješnom tako da su rezultati liječenja u ovoj skupini bolesnika slabi i nezadovoljavajući. Također se pokazalo da kombinacije koje modifiraju "3+7" (modaliteti sa IDA, VP-16, mitoksantron) nisu poboljšali rezultate liječenja te da je rutinska uporaba činitelja rasta (G-CSF, GM-CSF) kao dio terapijskog protokola – **neučinkovita**.

Naš je prijedlog da u algoritmu terapije AML u starijoj životnoj dobi postoje dvije razine probira. Primarni probir zasnivaće se na općem stanju bolesnika (performance status, PS) po ECOG-u i komorbiditetu (KM) na način da bi se ti parametri bodovali i zbrajali. Sustav bodovanja prikazan je na Tablici 1.

Tablica 1. Sustav bodovanja

Performance status (PS)	<2	0 bodova
	≥2	1 bod
Komorbiditet (KM)	1 organ ili org. sustav	0.5 bodova
	>1 org ili org. sustava	1 bod

Citogenetika i eventualne prethodne hematološke bolesti (MDS, MPS) služe nam kao sekundarni probir između aktivne i poštendije terapije. Zato je naš prijedlog da se citogenetske pretrage rade samo kod bolesnika PS+KM ≤1.5. Alternativa je molekularnim pretragama probrati samo "good risk" promjene (t (8;21), t (15;17), inv 16) i Flt3-.



Slika 1. Prijedlog postupaka liječenja AML u starijoj životnoj dobi

Zaključak: "3+7" kao uvodna (potom "2+5" kao terapija održavanja) samo kod bolesnika s *de novo* AML, u dobrom općem stanju, bez komorbiditeta, te s povoljnom citogenetikom. Stariji od 80 g. (75?) te oni s PS+KM ≥ 2 samo simptomatska terapija, a svi ostali bili bi za za niske doze Ara-C.

Za palijativnu terapiju preporuka su **niske doze Ara-C (10mg/m² sc. svakih 12h, 21 dan)** jer je često upotrebljavana kombinacija Purinethola i MTX-a pokazala vrlo slabe rezultate.

O novoj klasifikaciji kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi

prof. dr. sc. Rajko Kušec, dr. med.

Odjel hematologije

Klinika za unutarnje bolesti

Odjel molekularne dijagnostike i genetike

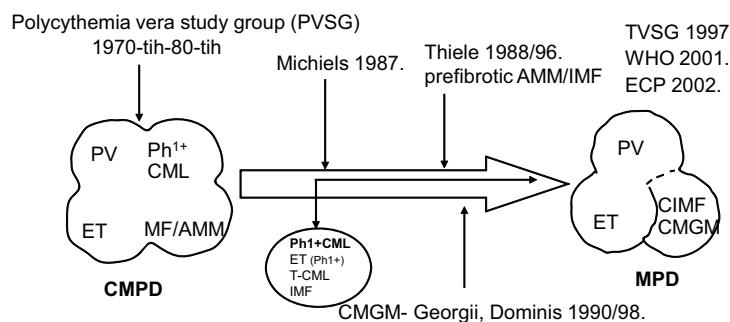
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

Klinička bolnica Dubrava i Medicinski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: rkusec@mef.hr

Kronične mijeloproliferativne bolesti su skupina klonalnih proliferacija mijeloidnih loza (granulocitne, megakario-trombocitne te eritrocitne loze). Postoji više kliničkih, hematoloških te bioloških odlika ovih proliferacija koje su opravdavale korištenje skupnog naziva MPS (*kronični mijeloproliferativni sindrom*) za ovu skupinu kroničnih bolesti mijelopoeze. Osnovna je karakteristika MPS-a dominantna proliferacija jedne, vodeće loze mijelopoeze prema čemu i definiramo bolesti kao **policitemija (rubra) vera (PV)**, **esencijalna trombocitemija (ET)**, **primarna mijelofibroza (PMF)**, **kronična granulocitna ili mijeloična leukemija (KML)** te **klonalne proliferacije eozinofila te mastocita**. Ipak, uz osnovnu vodeću proliferirajuću lozu nerijetko je vidljiv i proliferacijski rast još jedne ili više loza, što je osim teškoće u razumijevanju biološke osnove ovih bolesti predstavljalo i problem u donošenju kriterija za dijagnozu te klasificiranju kroničnih mijeloproliferacija. Već se vrlo rano naslućivalo da vjerojatno postoji neki zajednički (biološki) "nazivnik" svim ovim proliferacijama (W. Dameshek, 1951.), no trebalo je proći pola stoljeća da se on identificira i to u obliku mutacije *JAK2* gena. U skladu s napredovanjem medicinske znanosti i kliničke prakse kroz desetljeća su i sustavi dijagnosticiranja/klasificiranja ovih bolesti mijenjali svoj oblik (Slika 1.).



kratice: CMPD (chronic myeloproliferative disorders), CMGM (chronic megakaryocytic granulocytic myeloproliferation), AMM/IMF (agnogenic myeloid metaplasia and idiopathic myelofibrosis) CIMF (chronic idiopathic myelofibrosis), TVSG (thrombocythemia vera study group), ECP (european clinical and pathological criteria) T-CML (thrombocythemia associated with Ph1+CML)

Slika 1. Kronologija klasifikacije kroničnih mijeloproliferativnih bolesti (70-tih do 2001. godine) (modificirano prema: JJ Michiels. Semin. Thromb. Hemost. 2006;32)

Vjerojatno je najznačajniji događaj bio prepoznavanje specifičnog kromosomskog pa onda i genskog mutacijskog događaja u kroničnoj mijeloičnoj leukemiji (KML) koji je time postao paradigma shvaćanja da je bolest raka (neoplazma) bolest izazvana mutacijom u genomu stanice. Ova je spoznaja vrlo brzo izdvojila kao poseban entitet KML-a koji nosi kromosomal biljež Philadelphia kromosoma (der(22)), Ph1, iz grupe ostalih kroničnih proliferacija. Ova bolest osim u precizno razrađenoj molekularnoj (genskoj) dijagnostici, i terapijskom primjenom specifičnog tirozin-kinaznog inhibitora, imatiniba, ponovno postaje primjer budućnosti napretka onkologije i suvremene medicine općenito. Ostali entiteti grupe CMPD - MPS dugo iza KML ostajali su dijagnosticirani i klasificirani kako se postupno razvijala medicinska znanost, ali bez "nove Philadelphije" tj. razumijevanja genske, mutacijske podloge za proliferaciju mijelopoeze ovih stanja. U desetljećima razvitaka dijagnostičkih kriterija za PV, ET, PMF brojne su radne grupe iznosile različite dijagnostičke kriterije i klasifikacijske sheme, a prva veća promjena u klasifikacijama dogodila se kasnih 90-tih godina kada je prepoznata važnost pregleda histologije koštane srži i kosti koja daje uvid u stanje morfologije i međusobnih odnosa staničnih elemenata hematopoeze, potpornih tkiva i drugih stanica mikrookoliša košane srži. Vrlo aktivni u tom smislu su bili stručnjaci europske hematopatološko/kliničke grupe (ECP) što je i rezultiralo klasifikacijom Svjetske zdravstvene organizacije SZO/WHO za kronične mijeloproliferacije 2001. godine (1). No, 2005. godine dogodio se značajan znanstveni probor u genetici MPS-a otkrićem točkaste mutacije (V617F) u eksonu 14 gena za tirozin kinazu *JAK2*. Ubrzo je prepoznato da praktički sve primarne policitemije nose ovu mutaciju (ili mutaciju u eksonu 12 istog gena) te da oko 50% ET-a i oko 50% PMF također pokazuju ovu mutaciju, ali u različitoj količini mutiranih alela (ET<PV<PMF). Isto tako, uspoređujući s drugim paralelnim mutacijama u hematopoetskim stanicama nekih pacijenata postalo je jasno da iako svakako ključna za proliferacijsko obilježe hematopoeze ovaj genski događaj nije primarna (početna) mutacija matične stanice (2). Visoka učestalost *JAK2V617F* mutacije u ovim primarnim proliferacijama potakla je pak struku da od 2007. predloži promjene parametara dijagnostičkih kriterija MPS-a (3,4) te da 2008. dijelom reklassificira cijelokupnu grupu kroničnih mijeloproliferativnih neoplazmi (Tablica 1.) (5).

Tablica 1. SZO (WHO) 2008 klasifikacijska shema za MPN

1. Akutna mijeloična leukemija
2. Mijelodisplastični sindrom (MDS)
3. Mijeloproliferativne neoplazme (MPN)
3.1 Kronična mijeloična leukemija
3.2 Policitemija vera
3.3 Esencijalna trombocitemija
3.4 Primarna mijelofibroza
3.5 Kronična neutrofilna leukemija
3.6 Kronična eozinofilna leukemija, nekategorizirana drukčije
3.7 Hipereozinofilni sindrom
3.8 Mastocitoza
3.9 MPN, neklasificirani
4. MDS/MPN
4.1 Kronična mijelomonocitna leukemija
4.2 Juvenilna mijelomonocitna leukemija
4.3 Atipična kronična mijeloična leukemija
4.4 MDS/MPN, neklasificirani
5. Mijeloidne neoplazme povezane s eozinofilijom i abnormalnostima PDGFRα, PDGFRβ, ili FGFR1
5.1 Mijeloidne neoplazme povezane s promjenama PDGFRα
5.2 Mijeloidne neoplazme povezane s promjenama PDGFRβ
5.3 Mijeloidne neoplazme povezane s promjenama FGFR1 (8p11 mijeloproliferativni sindrom)

U nazivu skupine bolesti, **mijeloproliferativne neoplazme - MPN** umjesto naziva *bolest* ili *sindrom* koristi se riječ *neoplazma* jer se želi naglastiti tumorsku, neoplastičnu prirodu ovih bolesti.

Druge su osnovne novosti nove podjele MPN-a koja se nalazi u izadnju klasifikaciju hematoloških tumora WHO-a 2008. godine: **1.** Mastocitoza je uvrštena u kategoriju MPN-a. **2.** Neki slučajevi koji su imali kriterije za kroničnu eozinofilnu leukemiju (KEL) sada mogu biti karakterizirani kao mijeloidne ili limfoidne neoplazme s promjenama (mutacijama) *PDGRA*, *PDGFRB* ili *FGFR1* gena. Ako ovih mutacija nema (kao niti Ph1) ta stanja treba zvati *KEL bez pobliže klasifikacije (CEL NOS)*. **3.** Dijagnostički algoritmi za PV, ET i PMF su značajno promijenjeni zahvaljujući uvođenju u dijagnostiku testa za mutaciju *JAK2* kao i prihvaćanjem velikog značaja histoloških osobina u biopsiji koštane srži. **4.** Granica visine trombocitoze za dijagnozu ET je spuštena na $450 \times 10^9/L$. **5.** Preporučeni su kriteriji za definiciju ubrzane (akcelerirane) faze KML-a uz upozorenje da još nedostaje ocjena ovih kriterija temeljem terapijskih iskustava u eri inhibitora tirozin kinaza. U Tablici 2. prikazani su dijagnostički kriteriji za osnovne grupe MPN kako ih definira nova klasifikacija SZO/WHO 2008. godine

Tablica 2 Dijagnostički kriteriji za MPN (SZO (WHO) 2008)

	<i>Policitemija vera</i>	<i>Esencijalna trombocitemija</i>	<i>Primarna mijelofibroza</i>
Veliki kriteriji			
1	Hgb >18.5 g dl ⁻¹ (muški) ili Hgb ili Hct >99 percentile referentnog raspona za dob, spol ili nadmorske visine stanovanja ili Hgb >17 g dl ⁻¹ (muški), ili >15 g dl ⁻¹ (žene) ako je povezan s ustrajnim porastom od ≥ 2 g dl ⁻¹ od bazne vrijednosti što se ne može prispisati korekciji nedostatka željeza ili povećana masa eritrocita >25% iznad srednje normalne prediktivne vrijednosti	1 Broj trombocita $\geq 450 \times 10^9 l^{-1}$	1 Proliferacija megakariocita i atipija povezana s ili retikulinskom ili kolagenskom fibrozom, ili u odsutnosti retikulinske fibrose, promjene megakariocita moraju biti praćene porastom celularnosti koštane srži, proliferacijom granulocita i često smanjenom eritropoezom (tj. prefibrotična PMF).
2	Prisutnost <i>JAK2V617F</i> ili slične mutacije	2 Proliferacija megakariocita s velikom i zrelo morfolojijom. Bez proliferacije ili svega oskudna proliferacija granulocita ili eritrocita.	2 Bez kriterija SZO za KML, PV, PMF, MDS ili druge mijeloidne neoplazme
		3 Bez kriterija SZO za KML, PV, PMF, MDS ili druge mijeloidne neoplazme	3 Dokaz <i>JAK2V617F</i> ili drugog klonalnog pokazatelja ili bez dokaza reaktivne fibroze koštane srži
		4 Dokaz <i>JAK2V617F</i> ili drugog klonalnog pokazatelja ili bez dokaza reaktivne trombocitoze	
Mali kriteriji	1 Trilinearna mijeloproliferacija koštane srži 2 Subnormalna razina serumskog Epo 3 Rast EEC	1 Leukoeritroblastoza 2 Porast serumskog LDH 3 Palpatorna splenomegalija 4 Anemija	

za dijagnozu: **1+2 M +1 m ili 1. M +2 m**

SVA 4

3 M + 1 m

Literatura:

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphatic tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
- Tefferi A. JAK2 mutations in polycythemia vera- molecular mechanisms and clinical applications. N Engl J Med 2007; 356: 459-68.
- Tefferi A et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an *ad hoc* international expert panel. Blood 2007; 110: 1092-1097.
- Tefferi A, Wardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia 2008; 22: 14-22.
- Swerdlow SA, Campo E, Harris NL, Jaffe ES et al. eds. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphatic tissues. Lyon: IARC Press; 2008.

Prijedlog terapijskog protokola za primarnu mijelofibrozu-KROHEM-PMF01

prof. dr. sc. Rajko Kušec, dr. med.

Odjel hematologije

Klinika za unutarnje bolesti

Odjel molekularne dijagnostike i genetike

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

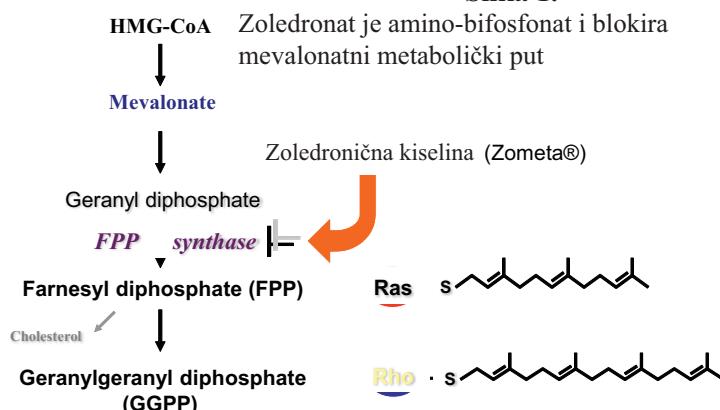
Klinička bolnica Dubrava i Medicinski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: rkusec@mef.hr

Primarna mijelofibroza (PMF) je klonalna bolest hematopoetske matične stanice koja zahvaća sve tri loze, uz normalno sazrijevanje, napredujući fibrozu koštane srži te ekstramedularnu hematopoezu sa značajnom organomegalijom. Biološki, u oko 50% bolesnika moguće je dokazati gensku mutaciju *JAK2V617F* koja čini se donosi i nešto lošiju prognozu bolesti. Za sada ne postoje standardizirani terapijski protokoli i lijekovi koji bi pokazivali značajniju učinkovitost u ovoj bolesti. Pokušani su derivati talidomida, inhibitori tirozinkinaza, inhibitori farnezil-transferaze, steroidi, anabolici, biomodulatori (IFNa) (1). Interesantne prve rezultate u kliničkim ispitivanjima iskazuju kompetitivni blokator ATP-JAK2-NCB18424-Incyte, koji međutim prema prvim rezultatima kliničkih istraživanja iskazuje izvjesnu mijelotoksičnost iako se bilježi i vrlo značajan učinak na redukciju veličine slezene u bolesnika, te brisanje općih simptoma bolesti obilježenih citokinskim ekscesima. **Zoledronična kiselina (ZK)** je amino-bifosfonat koji se koristi u liječenju osteolitičih bolesti u onkologiji i hematologiji, ili kao blokator osteoklastičke aktivnosti u osteoporozu. Međutim, ZK ima i antiproliferativni, proapoptozički te antiangiogeni učinak (2,3), a njezina adjuvantna primjena uz imatinib u KML pokazala je pozitivan sinergistički učinak (4,5). Bifosfonati inhibiraju farnezil difosfat (FPP)-sintetazu, te blokiraju prenilaciju malih signalnih proteina potrebnih za funkciju i preživljavanje stanica. Zoledronat djeluje u mevalonatnom metaboličkom putu (Slika 1.).

Slika 1.



Ciljevi studije

- Ocijeniti hematološki klinički i laboratorijski odgovor na primjenu zoledronata u standardnim terapijskim dozama u PMF.
- Ocijeniti sigurnost primjene i bilježiti eventualne medicinske nuspojave.

Uključni kriteriji:

- Novo dijagnosticirani kao i bolesnici s PMF u praćenju ili liječenju*
- *Standardni oblici liječenja su potporna terapija derivatima krvi, anabolici i kortikosteroidi, hidroksikarbamid, IFNa, analgetici.

Isključni kriteriji:

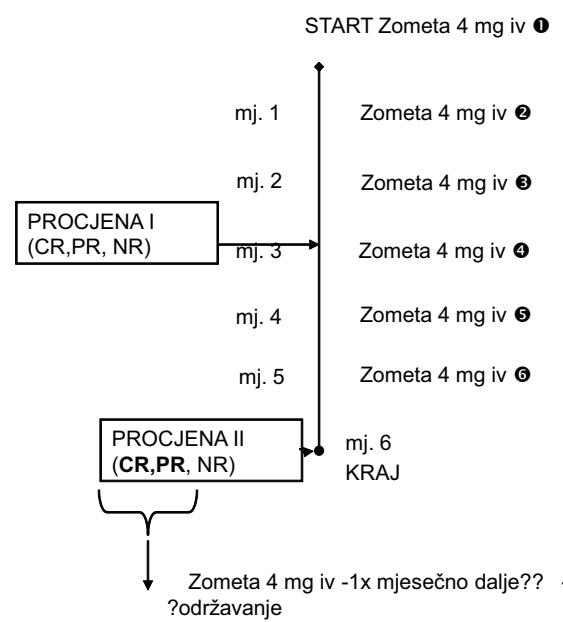
- NE uključivati bolesnike koji primaju bilo koji derivat bifosfonatne grupe lijekova.

Protokol liječenja ZK (Zometa®)

Tvrtka "Novartis Healthcare" će biti zamoljena da suportira svoj preparat Zometa® za ovu studiju Krohema. Bolesnici će primati Zometu® 4 mg iv. kroz 15 minuta jednom svaka 4 tjedna. Predviđeno je da bolesnik primi 6 ciklusa zoledronata. Liječenje zoledroničnom kiselinom bit će suplementirano oralnim kalcijem (2 x 500 mg kalcij karbonata dnevno). Shema tijeka liječenja prikazana je u Slici 2. Radna grupa za pripremu protokola treba još dogovoriti eventualni prijedlog produljenja liječenja zoledronatom u vidu održavanja kod bolesnika koji postignu hematološki odgovor.

Slika 2.

Shema provođenja studije



Mjere opreza i isključivanje iz studije

- Kontrola buburežne funkcije te prevencija osteonekroze čeljusti saniranjem i provjerom stomatološkog statusa.
- Iz studije je moguće izaći u svakom momentu odlukom pacijenta ili ordinarijusa.

Medicinski kriterij za prekid studije je pogoršanje tijeka osnovne bolesti (npr. transformacija bolesti ili pojava/pogoršanje drugog postojećeg medicinskog stanja

Definicija i kriteriji za dijagnozu PMF
prema WHO 2008 (vidi u ovom broju
Biltena o klasifikaciji MPN u 2008.)

Ocjena terapijskog odgovora
hematološki odgovor: CR (kompletna remisija), PR (parcijalna remisija), SD (stabilna bolest), PD (bolest u progresiji) (6,7)

protokolu, kako još sada sugestijama za izradu finalnog oblika samog protokola tako i kasnije uključivanjem svojih pacijenata s PMF-om.

Slika 3.

Shema kliničko-laboratorijskog praćenja

parametar	start	nakon 3 zoledr.	nakon 6 zoledr.- (kraj studije)
krvna slika	x	x	x
veličina slezene/jetre-klinički	x	x	x
LDH (serm)	x	x	x
JAK2 mutacija	x		x opcija_ ako je mogući Q-PCR
opći simptomi	x	x	x
biopsija KS	x		x
CD34+ u PK (opcija)	x		x

Shema laboratorijskog i hematološkog praćenja odgovora u studiji (Slika 3.)

: hematološki laboratorij, veličina organomegalije, ocjena potrebe potporne terapije (transfuzije), morfološke promjene KS (histologija) (u finalnoj procjeni 6 mj.), opći simptomi.

Translacijsko istraživanje uz kliničku studiju Zomete u PMF

Zoledronat inhibira ključni enzim u mevalonatnom putu (**FDPS**) (Slika 1.). Aktivnost FDPSa može ovisiti o polimorfizmima u *FDPS* genu. Za jedan od njih, rs2297480, je opisano da A alel (aleli su AA, AC, CC) može stvoriti vezno mjesto za važan transkripcijski faktor hematopoeze - Runx1 (AML1/Cbfα1). Cilj translacijskog istraživanja bio bi odgovoriti na pitanja: 1) koja je učestalost pojedinih alela ovog polimorfizma u PMFu, 2) utječe li koji oblik genotipa na ishod lječenja?

Sadašnje stanje protokola Krohem PMF-01 (prosinac 2008.). Na sastancima Krohema u 2008. godini (Zadar, svibanj i Umag, studeni) nakon što je prijedlog protokola dobio pozitivnu ocjenu i podršku članova, imenovana je radna skupina (Rajko Kušec za koordinatora, Damir Nemet, Ljubica Škare-Librenjak, Dubravka Čaržavec, predstavnik KB Merkur (naknadno) te Duška Petranović) za izradu finalnog protokola koji će biti odaslan ustanovama prije proljetnog sastanka Krohema 2009. Svi su kliničari hrvatskih bolničkih ustanova s hematološkom djelatnošću pozvani da sudjeluju u

Literatura:

- Cervantes F. Modern management of myelofibrosis. Br J Haematol 2005;128:583-592.
- Santani D, Gentilucci UV, Vincenzi B, Picardi A, Vasaturo F, La Cesa A, Onori N, Scarpa S, Tonini G. The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence. Ann Oncol 2003;14:1468-1476.
- Wood J, Bonjean K, Ruetz S, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. J Pharmacol Exp Ther 2002;302:1055-1061.
- Kuroda J, Kimura S, Segawa H, Kobayashi Y, Yoshikawa T, Urasaki Y, et al. The third-generation bisphosphonate zoledronate synergistically augments the anti-Ph⁺ leukemia activity of imatinib mesylate Blood 2003; 102: 2229 - 2235.
- Santinini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. Clinical Cancer Research 2003;9:2893-7.
- Barosi G, et al. Response criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of an initiative of the European myelofibrosis network (EUMET). Blood 2005;106:2849.
- Tefferi A, et al. International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia: On behalf of the IWG for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). Blood 2006;108:1497.

Registar oboljelih od multiplog mijeloma

Josip Batinić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: batinic.josip@gmail.com

Početkom listopada 2008. godine, kao rezultat duže suradnje Zavoda za hematologiju KBC-a Zagreb, u prvom redu profesora Damira Nemeta, i tvrtke Janssen-Cilag, u funkciju je stavljen registar oboljelih od multiplog mijeloma. Registar se može pronaći na internetskim stranicama mijelom.hr ili registar.mijelom.hr i pristupiti se može samo uz odgovarajuće korisničko ime i lozinku. Registar je zamišljen kao baza podataka svih oboljelih od multiplog mijeloma koja će u budućnosti služiti za potrebe epidemioloških i kliničkih znanstvenih istraživanja i evaluacije trenutne prakse u dijagnostici i liječenju multiplog mijeloma. Registar je već u nekoliko navrata predstavljen dok je još bio u izradi s ciljem da se budući korisnici upoznaju s idejom samog regista i eventualno iznesu svoje primjedbe i prijedloge.

U izradi regista najviše pozornosti se pridavalo jednostavnosti unosa i preglednosti podataka kako bi i suradljivost korisnika tj. onih koji unose podatke, bila što veća o čemu ovise i uspjeh cijelog projekta. Nakon pristupa registru korisničkim imenom i lozinkom, otvara se početna stranica na kojoj se nalazi popis svih dosada upisanih bolesnika s osnovnim, identifikacijskim podacima (inicijali, datum rođenja, centar u kojem se liječi, jedinstveni broj bolesnika, datum unosa). Podaci se mogu razvrstavati po nekoliko kriterija npr. po centrima, po jedinstvenom broju bolesnika (kojeg dodjeljuje program kod unosa novog bolesnika), po datumu unosa itd. Odabirom jednog bolesnika otvara se mogućnost pristupa detaljnijim podacima, izmjeni (ažuriranju) istih ili brisanju bolesnika iz regista. Odabirom opcije unosa novog bolesnika otvara se nova stranica na kojoj se nalaze prazna polja za unos novih podataka. Prva stranica, tzv. stranica A, sadrži osnovne podatke o bolesniku, bolesti i liječenju. Unos podataka je olakšan i izbornicima koji omogućavaju brz odabir točne dijagnoze, početne terapije, stupnja bolesti prema ISS ili Durie-Salmon klasifikaciji, kalendar i slično. Stranica A je temelj regista i njezinim ispunjavanjem možemo završiti unos novog bolesnika i spremiti podatke. Odabirom opcije „stranica B”, otvaraju se nova polja za unos dodatnih podataka kao što su vrijednost hemoglobina, kreatinina, kalcija i drugih relevantnih laboratorijskih parametara kod postavljanja dijagnoze. Stranica B nije, barem u početku, obvezna za ispunjavanje, ali je svakako poželjno

da se ispluni jer se time dobiva detaljniji i točniji uvid u svakog bolesnika, a i obradom ovih podataka mogu se polučiti relevantni stručni i znanstveni rezultati. Rad u registru završava se spremanjem novih podataka i odjavljivanjem iz regista.

Kao što je rečeno na početku, registar je u potpunosti postao operativan u listopadu 2008. godine, a prvi rezultati tj. rad regista predstavljen je na posljednjem sastanku KROHEM-a koji je održan od 6. do 8. studenog 2008. u Umagu. Donosimo kratak pregled tih rezultata: u radu regista sudjeluje ukupno devetnaest centara, a u prvih mjesec dana (od listopada do studenog) podatke je unijelo sedam centara (broj unosa): KBC Zagreb (35); OB Šibenik (15); OB Varaždin (12); KBC Rijeka (4); OB Slavonski Brod (3); KBC Split (1); KB „Sestre Milosrdnice“ (1). Kako je registar zapravo tek počeo funkcionirati neki nedostaci će zasigurno biti otkriveni tijekom rada u registru i unosom sve većeg broja podataka. Neki od njih se već ispravljaju i dodaju u suradnji s tehničkom podrškom kao na primjer dodavanje opcije „nepoznato“ ili „nije rađeno“, uz sva polja za laboratorijske parametre (u slučajevima kada je dijagnoza postavljena u vrijeme kada se navedena pretraga nije primjenjivala u praksi ili nije još niti postojala). Na kraju zahvalili bismo se tvrtki Janssen-Cilag na tehničkoj podršci regista. Svoje prijedloge, kritike i komentare možete uputiti na adresu elektroničke pošte podrska@mijelom.hr ili u Zavod za hematologiju KBC Rebro (dnemet@mef.hr). Podsjećamo Vas da vrijednost i uspjeh regista ovisi u prvom redu o nama samima tj. našoj volji i spremnosti da unosimo podatke o bolesnicima.

Uporaba zoledronične kiseline u liječenju bolesnika s multiplim mijelomom

Doc. dr. sc. Toni Valković, dr. med.
Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju
Klinički bolnički centar Rijeka i Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
E-pošta: toni.valkovic@ri.t-com.hr

Zoledronična kiselina (Zometa^R, Novartis) pripada u skupinu bifosfonata-ljekova koji se vežu za kristale hidroksiapatita u koštanom tkivu te značajno i na više načina remete funkciju i preživljavanje osteoklasta, sprječavajući time i razgradnju kosti. Indikacija za primjenu ovog lijeka je osteoliza uzrokovanu zločudnim novotvorinama s ili bez hiperkalcemičkog sindroma. Koštane lezije, poglavito one osteolitičke, najčešće su kliničko obilježje multiplog mijeloma, a njihove posljedice mogu biti patološke frakture s mogućim pritiskom kralježnične moždine te hiperkalcemički sindrom. Zoledronična kiselina je novogeneracijski, visokotentni bifosfonat koji u svojoj strukturi sadrži dušik te, uz pamidronat i kladronat, dokazano smanjuje učestalost tj. odgađa nastup spomenutih komplikacija. Također je prvi bifosfonat koji je svoju učinkovitost, osim u raku dojke, pokazao i u bolesnika s koštanim metastazama drugih vrsta solidnih zločudnih novotvorina.

Ponajvažnija klinička studija koja je potvrdila učinkovitost zoledronične kiseline u liječenju koštanih komplikacija bolesnika s multiplim mijelomom je multicentrična, randomizirana, dvostruko slijepa klinička studija faze III Rosena i suradnika u kojoj je, između ostalog, neposredno uspoređen učinak 4 mg zoledronične kiseline s 90 mg pamidronata primjenjivanih svaka 3-4 tjedna (Rosen LS et al. Cancer 2003; 98:1735-44). Nakon 25 mjeseci praćenja bolesnika s multiplim mijelomom zoledronična kiselina je smanjila ukupnu učestalost neželjenih koštanih događaja (patološke frakture, pritisak na kralježničnu moždinu, potreba za radioterapijom kosti tj. kirurškim zahvatom) i koštanog morbiditeta (broj neželjenih koštanih događaja na godinu) podjednako kao i pamidronat. Time je jasno dokazana neinferiornost zoledronične kiseline u odnosu na pamidronat. Zanimljivo je da su u ovoj studiji sudjelovale i bolesnice s koštanim metastazama raka dojke te se u ovoj ispitivanoj skupini zoledronična kiselina pokazala značajno učinkovitijom nego li pamidronat (dodatno smanjenje rizika od neželjenih koštanih događaja za 20%). Ova je studija, također, pokazala da se 4 mg zoledronične kiseline podnosi jednako dobro kao pamidronat, a najčešći neželjeni učinci oba lijeka bili su bol u kostima, mučnina te opća slabost.

Iako u ovom istraživanju nije bilo značajne razlike u vremenu do pojave prvog relevantnog povišenja vrijednosti kreatinina u serumu u bolesnika liječenih s 4 mg zoledronične kiseline tijekom 15 minuta u odnosu na one tretirane s 90 mg pamidronata tijekom 2 sata, poznato je da navedeni bifosfonati koji u svojoj kemijskoj strukturi sadrže dušik mogu dovesti do pogoršanja

bubrežne funkcije. Ovaj rizik posebno je značajan u bolesnika s već postojećim bubrežnim oštećenjem prije započinjanja liječenja bifosfonatima. Upravo iz ovih razloga proizvođač ne preporuča davati zoledroničnu kiselinu bolesnicima u kojih je prije započinjanja primjene lijeka bilo prisutno teško popuštanje bubrega (klirens kreatinina manji od 30 ml/minuti, tj. vrijednost serumskog kreatinina viša od 265 umol/L). U bolesnika s blagim do umjerenim oštećenjem bubrežne funkcije (klirens kreatinina od 30-60 umol/L) preporuča se smanjivanje doze. Zbog toga, pri uporabi bifosfonata kao što su zoledronična kiselina ili pamidronat, treba redovito pratiti vrijednosti kreatinina u serumu te u slučaju njihova porasta ili pak pojave albumina u mokraći (više od 500 mg/24 sata) treba prekinuti liječenje do oporavka nalaza.

Još jedan od rijetkih, ali važnih neželjenih učinaka liječenja bifosfonatima je osteonekroza čeljusti. Podaci govore o tome da je ona značajno češća pri uporabi zoledronične kiseline, kao potentnijeg bifosfonata, nego li pamidronata (Zervas K et al. Br J Haematol 2006;134:620-23.), iako se ova komplikacija opisuje i pri uporabi drugih (pa i peroralnih) bifosfonata. Ipak, valja imati na umu da je riječ o rijetkoj komplikaciji, a njezina se učestalost može značajno smanjiti ukoliko se pridržavamo preporuka o duljini uporabe bifosfonata te prevenciji osteonekroze čeljusti (saniranje patologije zubi i usne šupljine prije započinjanja liječenja bifosfonatima, održavanje higijene usne šupljine te izbjegavanje invazivnih stomatoloških zahvata tijekom liječenja ovim lijekovima).

U kliničkoj studiji Majora i suradnika utvrđena je bolja učinkovitost 4 mg zoledronične kiseline u odnosu na 90 mg pamidronata u liječenju hiperkalcemičkog sindroma bolesnika s koštanim metastazama zločudnih tumora (Major PP et al. Semin Oncol 2001; 28:17-24.). Tako su bolesnici liječeni zoledroničnom kiselinom brže postizali terapijski odgovor tj. normalizaciju koncentracije kalcija u serumu te je ona duže trajala u odnosu na bolesnike liječene pamidronatom.

Vrlo je intrigantno pitanje protutumorskog učinka bifosfonata. Iako je ovaj učinak dokazan "in vitro" (sprječavanje proliferacije tumorskih stanica, angiogeneze, adhezije, poticanje apoptoze), za sada postoji tek nekoliko manjih kliničkih istraživanja koja pokazuju protutumorski efekt i produljeno preživljavanje nekih skupina bolesnika s koštanim metastazama solidnih tumora i multiplim mijelomom koji su liječeni upravo zoledroničnom kiselinom (Hirsh V et al. Thorac Oncol 2008;3:228-66.; Berenson J et al. ASCO, 2007.).

Može se reći da je zoledronična kiselina primjenjena u dozi od 4 mg tijekom 15 minuta svaka 4 tjedna učinkovit lijek za liječenje i prevenciju koštane bolesti (osteolize, osteoporoza s kompresivnim frakturama kralježaka) u bolesnika s multiplim mijelomom, a uz to ima i prihvatljiv sigurnosni profil. Također je veoma učinkovita u liječenju hiperkalcemičkog sindroma. Značajna prednost ovog bifosfonata je kratkoča njegove aplikacije (15 minuta) što je važan boljšak za naše bolesnike, ali i čitav zdravstveni sustav, posebno u uvjetima naših preopterećenih dnevnih bolnica.

Retrospektivno istraživanje uzroka smrti u bolesnika s hemofilijom i drugim nasljednim koagulopatijama u Republici Hrvatskoj

Doc. dr. sc. Silva Zupančić Šalek, dr. med.
 Centar za hemofiliju RH
 Zavod za hematologiju
 Klinika za unutarnje bolesti
 Klinički bolnički centar Zagreb
 Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku
 E-pošta: silva.zupancic-salek@zg.t-com.hr

Uvod

S obzirom na sve bolje mogućnosti liječenja hemofilije i drugih nasljednih koagulopatija, u svjetskoj literaturi se bilježi produženi životni vijek tih bolesnika. Osim toga, značajno se mijenjaju uzroci smrti bolesnika s hemofilijom i ostalim nasljednim koagulopatijama. Primjerice, prema podacima Njemačkog registra bolesnika s hemofilijom najčešći uzrok smrti osoba s hemofilijom u razdoblju od 1978. do 1983. godine bilo je krvarenje (51%), zatim bolesti jetre (15%), maligni tumori (10%), druge internističke bolesti (12%), te nesreće, suicid, ubojstva ili konzumiranje droge (12%), dok u razdoblju od 2002. do 2007. najčešći uzroci smrti u hemofiličara postaju bolesti jetre (28%) i druge internističke bolesti (25%), dok su krvarenja uzrok smrti u samo 17% slučajeva.

Prijedlog istraživanja

Na sastanku Krohema u Umagu izložen je prijedlog retrospektivnog istraživanja uzroka smrti u bolesnika s hemofilijom i drugim nasljednim koagulopatijama u RH.

Ciljevi predloženog istraživanja su:

- utvrditi uzroke smrti bolesnika s hemofilijom A i B, te von Willebrandovom bolesti;
- utvrditi distribuciju uzroka smrti prema dijagnozama, težini koagulopatije i dobi;
- rezultate istraživanja usporediti s drugim registrima i objavljenim studijama.

Metode

Svi hematološki centri koji liječe ili su liječili bolesnike s hemofilijom i drugim nasljednim koagulopatijama pozivaju se na sudjelovanje u ovom istraživanju. Potrebno je samo ispuniti kratki upitnik o uzroku smrti i poslati ga na adresu: Doc. dr. Silva Zupančić Šalek, Centar za hemofiliju RH, Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb,

Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb. Upitnik se također može poslati faksom na broj +385-1-2421-892, ili e-poštom na adresu: silva.zupancic-salek@zg.t-com.hr

Upitnik o uzroku smrti bolesnika s hemofilijom i drugim nasljednim koagulopatijama

- ime i prezime, godina rođenja
- dijagnoza
- inhibitori Da ili Ne
- datum smrti
- uzrok smrti
- komorbiditet (navesti najvažnije): hipertenzija, DM, ciroza...
- HCV Da ili Ne Liječen DA ili NE
- HBV Da ili Ne Liječen DA ili NE
- HIV Da ili Ne Liječen DA ili NE
- Maligni tumor Da ili Ne Ako da, koji?
- Aterosklerotske komplikacije Da ili Ne Ako da, koji?
- Tromboze Da ili Ne Ako da, koja lokalizacija?
- Ostalo (nesreće, suicid, ubojstvo, droga...)

S obzirom da Centar za hemofiliju Republike Hrvatske (RH) dugi niz godina vodi Registar osoba s hemofilijom i drugim nasljednim koagulopatijama u RH, podatke je potrebno ponajviše nadopuniti i obnoviti. Želja je prikupiti sve potrebne podatke, prezentirati rezultate na idućem sastanku Krohema, te publicirati rezultate u relevantnom časopisu, s koautorstvom svih centara koji će sudjelovati u ovom istraživanju.

Na sastanku Krohema u Umagu u drugom dijelu izlaganja ukratko su predstavljene i tri studije iz područja hemostaze koje su u tijeku u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb. Tako je spomenuta studija „Magellan“ (koja se provodi i u nekoliko drugih bolnica u Hrvatskoj) u kojoj se uspoređuju rivaroksaban i enoksaparin kao tromboprofilaksa u nekirurškim hospitaliziranim bolesnikama, ispitivanje analoga FVII u akutnom krvarenju u velike zglobove te ispitivanje rekombinantnog FIX (BeneFIX studija) u osoba s hemofilijom B.

Prijedlog prospektivnog ispitivanja učestalosti genetskih i okolišnih čimbenika trombofilije u novodijagnosticiranih bolesnika s tromboembolijskim incidentima u Republici Hrvatskoj-KROHEM-VTE01

Dr. sc. Dražen Pulanić, dr. med.
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinički bolnički centar Zagreb
E-pošta: dpulanic@yahoo.com

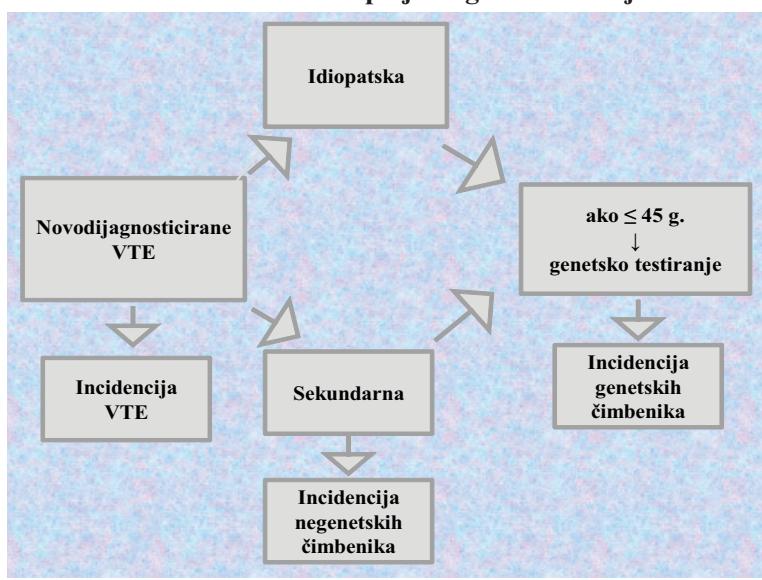
Venske tromboembolije (VTE) su među najvećim medicinskim i javnozdravstvenim problemima današnjice. Incidencija VTE, koje uključuju duboku vensku trombozu (DVT) i plućnu emboliju (PE), se prema većini recentnih studija u svijetu kreće oko 1 na 1000 stanovnika.

Brojni podaci vezani uz idiopatsku i sekundarnu VTE, te nasljednu i stečenu trombofiliju u Hrvatskoj nisu poznati. Stoga je na sastanku KROHEM-a u Umagu predloženo stvaranje Hrvatskog registra tromboembolijskih bolesti, praćenje incidencije VTE u Republici Hrvatskoj, te ispitivanje učestalosti genetskih i okolišnih čimbenika rizika u novodijagnosticiranih bolesnika s VTE.

Prijedlog istraživanja

Na sastanku Krohema u Umagu izložen je prijedlog prospektivnog ispitivanja učestalosti genetskih i okolišnih čimbenika trombofilije u novodijagnosticiranih bolesnika s tromboembolijskim incidentima (Slika1.).

Slika 1. Shema prijedloga istraživanja



Ciljevi predloženog istraživanja su odrediti učestalost:

1. VTE u RH
2. idiopatskih VTE
3. sekundarnih VTE
4. okolišnih (negenetskih) čimbenika koji dovode do VTE
5. genetske (nasljedne) trombofilije u idiopatskih VTE

6. genetske (nasljedne) trombofilije u sekundarnih VTE

Metode

Svi hematološki centri se pozivaju na sudjelovanje u ovom istraživanju. Potrebno je ispuniti kratki upitnik o bolesnicima s VTE i poslati ga na adresu: Dr. sc. Dražen Pulanić / Doc. dr. Silva Zupančić Šalek, Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatičeva 12, 10 000 Zagreb. Upitnik se također može poslati faksom na broj +385-1-2421-892, ili e-poštom na adresu: dpulanic@yahoo.com i silva.zupancic-salek@zg.t-com.hr

Upitnik o novodijagnosticiranoj VTE

- 1) Inicijali, spol, godina rođenja
- 2) Dijagnoza DVT ili PE ili DVT i PE
- 3) "Rijetke" VTE cerebralne, portalne, hepatalne, lijenalne, mezenterijske ili renalne vene
- 4) 1. ili recidiv VTE
- 5) Cigarete –da/ne/ako da, koliko?
- 6) VTE prvih srodnika -da/ne?
- 7) Je li VTE idiopatska ili sekundarna?
- 8) Sekundarne VTE (zaokružiti): a) aktivna zločudna bolest ≤ 6 mjeseci, b) trauma, imobilizacija, operacija, sepsa, CVK c) trudnoća i puerperij d) let avionom > 6 sati e) lijekovi (POC, HNT, talidomid, l-asparaginaza, tamoxifen, raloxifen...), f) druge bolesti (APS, MPD, PNH, DIK, TTP, SLE, IBD, NRL s paralizom...)
- 9) Ishod liječenja – izliječen, umro
- 10) Uzrok smrti
- 11) Komorbiditet (navesti najvažnije)

Koga testirati na genetsku (nasljednu) trombofiliju?

≤ 45 godina, a posebno ako: a) idiopatska b) prvi srodnik imao VTE ≤ 45 godina c) " rijetke" VTE cerebralne, portalne, hepatalne, lijenalne, mezenterijske ili renalne vene, d) Varfarinom-inducirana nekroza kože.

Što testirati za utvrđivanje genetske (nasljedne) trombofilije u referentnim laboratorijima koji mogu učiniti te pretrage:

1. Mutacija protrombina (F II 20210)
2. FV Leiden
3. MTHFR + koncentracija homocisteina
4. PAI-1 mutacija + koncentracija
5. Nedostatak proteina C i proteina S
6. Nedostatak AT

Zaključak: Realizacija predloženog ispitivanja će svakako biti zahtjevna, ponajviše zbog velike učestalosti VTE i stoga što se nerijetko VTE liječe i kod liječnika drugih specijalnosti, a ne samo hematologa. No, pokretanje registra i prikupljanje barem aproksimativnih podataka moglo bi dovesti do bolje spoznaje o učestalosti i etiologiji VTE u našoj populaciji.

Iskustva u otkrivanju i uspješnom liječenju Gaucherove bolesti u Hrvatskoj

Mirando Mrsić¹, Ksenija Fumić², Ranka Štern Padovan³, Kristina Potočki³, Nadira Duraković¹, Maja Prutki³, Boris Labar¹

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

² Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³ Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Adresa autora za kontaktiranje:

Doc. dr. sc. Mirando Mrsić, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: mmrsic@inet.hr

1. Uvod

Rijetke bolesti su definirane kao bolesti koje imaju učestalost manju od 5 na 10.000 stanovnika (1). Gaucherova bolest je najčešća bolest nakupljanja lipida u lizosomima (2). Učestalost bolesti iznosi 1 na 40.-60.000 stanovnika (3). Sama dijagnostika bolesti je komplikirana zbog različite kliničke slike. Bolest se dijeli na tri tipa. U Europi je akutni i neuropatski oblik bolesti (tip II i III) izrazito rijedak (5-10% slučajeva) dok je češći ne-neuropatski oblik (tip I) (4). Najveću učestalost bolesti imaju Aškenazi Židovi (5). Uzrok bolesti je autosomno recesivni nasljedni defekt u sintezi enzima glukocerebrozidaze što uzrokuje smanjenje ili nedostatak aktivnosti enzima u razgradnji sfingolipida (6).

Enzimatski defekt uzrokuje nakupljanje lipida što dovodi do pojave hepatosplenomegalije, adinamije, promjena na kostima te promjena u laboratorijskim nalazima i krvnoj slici (6). Enzimska zamjenska terapija za Gaucherovu bolest u terapijskoj je primjeni već desetak godina (7). Terapija je doživotna, a primjenjuje se lijek imigluceraza kao intravenska infuzija. Primjena imigluceraze dovodi do normalizacije laboratorijskih nalaza i krvne slike, smanjenja volumene jetre i slezene te poboljšanja koštano-zglobnog statusa (7).

2. Epidemiologija

Gaucherova bolest je najčešća lizosomska bolest nakupljanja. Najveća prevalencija je u Aškenazi Židova i iznosi 1 na 855 poroda, dok je u ostalim etničkim skupinama učestalost 1 na 100.000 poroda (8).

3. Patogeneza

U bolesnika s Gaucherovom bolešću nedostaje enzim glukocerebrozidaza koji hidrolizira glukozilceramid u glukozi i ceramid što dovodi do nakupljanja glukozilceramida u lizosomima stanica retikulo-endoteljnog sustava (9). Stanice bujaju te imaju karakteristični izgled, pa se nazivaju Gaucherove stanice. To su u stvari makrofazi koji su prepuni lipida i lako se dijagnosticiraju u razmazu sternalnog punktata. Gaucherove stanice nastaju od histiocita u slezeni, Kupfferovih stanica u jetri, makrofaga u koštanoj srži i periadventskih stanica u Virchow-Robinovom prostoru mozga. Te stanice nekontrolirano zauzimaju prostor u koštanoj srži i crvenoj pulpi slezene, sinusoidama jetre i medularnom dijelu i sinusoidama limfnih čvorova. Gaucherova bolest je uzrokovana mutacijom u genskom kodiranju sinteze enzima glukocerebrozidaze (10). Do sada je identificirano preko 200 mutacija gena za Gaucherovu bolest. Najčešća genetska mutacija u tipu I je zamjena jednog para baza na kodonu 370 (11). Ta mutacija nalazi se u oko 70% Aškenazi Židova koji boluju od Gaucherove bolesti (12). U bolesnika s Gaucherovom bolešću kod kojih je

Tablica 1. Oblici Gaucherove bolesti.

	Tip I	Tip II	Tip III
Bolesnici	Odrasli i djeca	Dojenčad	Djeca i adolescenti
Dob bolesnika	Varijabilna od adolescentne do odrasle dobi	Unutar 4-5 mjeseci života	Varijabilna, ali najčešće predškolsko doba
Zahvaćeni organi	Slezena, jetra, kosti	Mozak, slezena, jetra	Mozak, slezena, jetra, kosti
Neurološki simptomi	Odsutni	Teški opetovani epileptički napadi, hipertonija	Mioklonus, epilepsija, demencija, promjene u okolomotronim živcima
Brzina progresije bolesti	Izrazito varijabilna, od slabe do brze progresije bolesti	Brzo progresivna bolest	Srednje progresivna bolest
Životni vijek	Manji nego zdrava populacija	Smrt unutar 2 godine života	20-30 godina
Etnička učestalost	100 puta češća u Aškenazi Židova	Nema	Nema

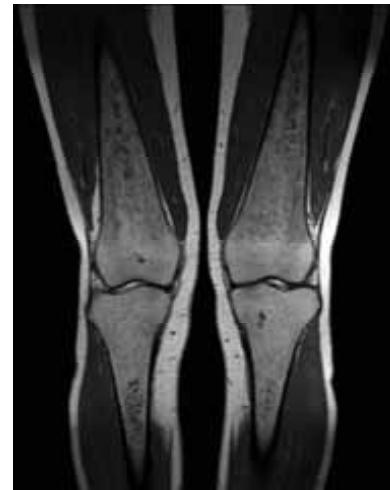
nađena mutacija na kodonu 370 zadržana je, iako vrlo mala, aktivnost enzima u lizosomima, tj. u bolesnika postoji manja endogena produkcija enzima glukocerebrozidaze. Većina bolesnika s teškim oblikom bolesti (tip II i III) ima barem jedan alel u kojem je došlo do zamjene baza na kodonu 444. U tih bolesnika praktički ne postoji endogena produkcija enzima. Gen za glukocerebrozidazu se nalazi na prvom kromosomu u regiji 1q21. Najčešće mutacije su N370S (c.1226 A > G), 84GG, L444P (c.1448 T > C) i IVS2 (+1). U Internacionalnom registru bolesnika s Gaucherovom bolešću oko 84% bolesnika ima N370S mutaciju na najmanje jednom alelu a oko 23% na oba alela, 30% ima L444P mutaciju na najmanje jednom a oko 8% na oba alela (13). Gaucherova bolest se dijeli u tri tipa. Tip I Gaucherove bolesti čini 99% svih bolesnika s ovom bolešću. U Tablici 1. prikazane su osnovne karakteristike sva tri tipa bolesti.

Ne-neuropatska forma (Tip I) karakterizirana je kroničnim tijekom, a klinički se prezentira hepatosplenomegalijom, zahvaćenošću koštano-zglobnog sustava i hematološkim promjenama, ali bez zahvaćenosti središnjeg živčanog sustava. Vrijeme kliničke manifestacije bolesti varira od ranog djetinjstva do kasne životne dobi. Najčešće se nalazi u Europi, SAD i Izraelu. Akutna neuropatska forma Gaucherove bolesti (Tip II) karakterizirana je teškim oštećenjima središnjeg živčanog sustava što dovodi do rane smrti bolesnika. Učestalost je manja od 1% od svih slučajeva Gaucherove bolesti. Konična neuropatska forma Gaucherove bolesti (Tip III) karakterizirana je blažim neurološkim promjenama te je manje progresivna nego tip II. Nekoliko obitelji s Gaucherovom bolešću tipa III živi u Norbotten regiji u Švedskoj. Prisustvo N370S mutacije na jednom i oba alela udruženo je s tipom I Gaucherove bolesti i obično se dijagnosticira nakon 10. godine života (13). Ta mutacija izgleda da štiti bolesnika od razvoja neuroloških simptoma osim simptoma sličnih parkinsonizmu (14). Prisutnost L444P/L444P ili D409H/D409H (c.1342 G > C) mutacije je udružena s neurološkim promjenama. Bolesnici koji su homozigoti za mutaciju L444P najčešće imaju tip III Gaucherove bolesti (75% svih bolesnika) (13).

4. Klinički simptomi i prognoza bolesti

Bezbolna splenomegalija najčešći je prvi znak postojanja Gaucherove bolesti u sva tri oblika. Veličina i povećanje slezene kroz određeni vremenski period dobro su mjerilo za ocjenu same progresije bolesti. Većina bolesnika razvije hipsplenizam s pancitopenijom i sklonosću spontanom krvarenju. Infiltracija crvene pulpe Gaucherovim stanicama uzrokuje infarkte slezene i nastajanje ožiljaka. Infarkt slezene može uzrokovati bolove u lijevom hemiabdomenu. Iako je hepatosplenomegalija česti klinički nalaz u bolesnika s Gaucherovom bolešću vrlo rijetko se u tih bolesnika razvije ciroza i zatajenje jetre. Koštane promjene su najozbiljnija komplikacija u bolesnika s tipom I i III Gaucherove bolesti. To je ujedno

i najčešći uzrok invalidnosti u bolesnika s Gaucherovom bolešću. Najčešća rana koštana deformacija je nemogućnost remodeliranja distalnog dijela femura, tzv. Erlenmeyerov deformitet (Slika 1.).



Slika 1.

M a g e t s k a rezonancija koljena –infiltracija koštane srži dijafiza femura i tibia kod Gaucherove bolesti.

Skoro sve kosti su zahvaćene bolešću te se dijagnosticira osteopenija, osteonekroza, stanjenje korteksa kosti, demineralizacija kosti te degenerativne promjene na kostima. Više od 2/3 bolesnika s Gaucherovom bolešću tip I i III ima koštano-zglobne promjene. Za ove bolesnike karakteristične su tzv. bolno koštane krize uzrokovane mikroskopskim infarktim u kostima. U nekih bolesnika razviju se opsežne promjene na kostima. U mlađih bolesnika najčešća je avaskularna nekroza glave femora (Slika 2.).



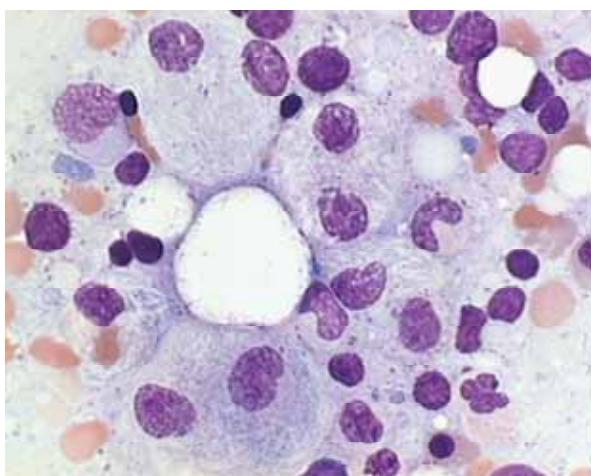
Slika 2. Osteonekroza glave obje natkoljenične kosti kod Gaucherove bolesti na MR prikazu oba kokfemoralna zgloba.

Splenomegalija i hipsplenizam s anemijom, leukopenijom i trombocitopenijom najčešći su rani simptomi Gaucherove bolesti (15). Splenomegalija u uznapredovaloj fazi bolesti može biti toliko velika da slezena praktički ispunjava cijeli abdomen (Slika 3.).



Slika 3. MSCT – vidi se hepatosplenomegalija i žarišta infiltracije slezene.

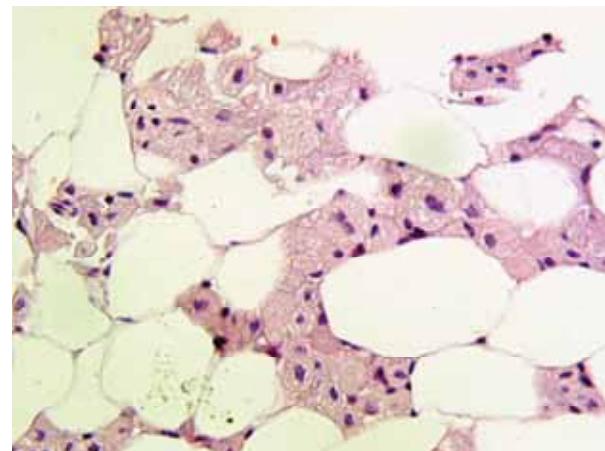
Leukopenija, anemija i trombocitopenija uzrokovane su hipersplenizmom ali i infiltracijom koštane srži Gaucherovim stanicama (slika 4a i 4b).



Slika 4a. Infiltracija koštane srži Gaucherovim stanicama – razmaz koštane srži, MGG 10x100, Zavod za citologiju, Klinički zavod za patologiju KBC Zagreb.

Kako se ne radi o životno ugrožavajućim simptomima oni godinama ostaju neprepoznati jer se obično ne vezuju uz Gaucherovu bolest. Stoga je u bolesnika u kojih postoje gore navedeni simptomi, a ne mogu se objasniti drugim kliničkim stanjima potrebno posumnjati na Gaucherovu bolest. Bolesnici s Gaucherovom bolešću imaju u serumu povećanu razinu angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE) i imunoglobulina (16). Neki bolesnici mogu imati žučkasto-smeđe pigmentacije na licu i donjem dijelu nogu. Većina bolesnika s Gaucherovom bolešću nema kliničkih simptoma zahvaćenosti srca i pluća (17,18). Bubrežna funkcija u tih bolesnika je normalna. U bolesnika s Gaucherovom bolešću opisani su slučajevi monoklonalne ili poliklonalne gammopathije, multiplog mijeloma, leukemije, Hodgkinove bolesti,

karcinoma bronha i cerebralnog astrocitoma. Jedna od prepostavki je da zbog disfunkcije makrofaga izostaje nadzor imunološkog sustava (19).



Slika 4b. Infiltracija kosti Gaucherovim stanicama, MGG 10x50, Klinički zavod za patologiju KBC Zagreb.

5. Dijagnostika Gaucherove bolesti

Na Gaucherovu bolest potrebno je sumnjati u svim slučajevima neobjašnjive splenomegalije ili zahvaćenosti drugih organa, posebice koštano-zglobnog sustava. U djece je potrebno isključiti Gaucherovu bolest u svim slučajevima hepatosplenomegalije ili neurodegenerativnih promjena (20). Za definitivnu dijagnozu Gaucherove bolesti potrebno je utvrditi aktivnost glukocerebrozidaze u leukocitima i kulturi kožnih fibroblasta. Razina serumske hitotriozidaze dobar je parametar za ocjenu učinkovitosti liječenja odnosno progresije bolesti (21). Za prenatalnu dijagnostiku upotrebljavaju se amniociti i horionske resice (22). Zbog ograničenja metode enzymski esej nije moguće primjeniti u probiranju nosilaca gena niti u prenatalnoj dijagnostici. U tim slučajevima kao i u objektivizaciju mutacija koriste se metode molekularne genetike (23). Normalizacija ili poboljšanje hematoloških parametara prvi su klinički znak učinkovitosti enzymatske zamjenske terapije. U tablici 2. prikazani su laboratorijski parametri praćenja bolesnika s Gaucherovom bolešću.

Tablica 2. Laboratorijsko praćenje bolesnika s Gaucherovom bolešću.

	Kod dijagnoze	Bolesnici koji PRIMAJU enzimsku zamjensku terapiju		
		Svaka 3 mjeseca	Svakih 12 mjeseci	U vrijeme prilagodbe doze
Hemoglobin	X	X	-	X
Trombociti	X	X	-	X
Kisela fosfataza (ukupna i ne-prostatična)	X	X	-	X
AST/ALT	X	X	-	X
Alkalna fosfataza	X	X	-	X
Kreatinin	X	-	X	-
Kreatinin klirens	X	-	X	-
Kalcij (serum/ 24h urin)	X	X	-	X
Kalij	X	X	-	X
Natrij	X	X	-	X
Fosfor	X	X	-	X
Antitijela na imiglucerazu	-	X ^a	-	-
Volumen slezene (MR ili MSCT)	X	-	X	X
Volumen jetre (MR ili MSCT)	X	-	X	X
Cijeli femur (MR)	X	-	X	X
Cijeli femur AP projekcija (MR)	X	-	X	X
Kralježnica (klasični Rtg)	X	-	X	X
Ocjena kvalitete života	X	-	X (svakih 6 mjeseci)	X

a. Svakih 3, 6, 9, 12 i 18 mjeseci nakon početka terapije

Za praćenje učinkovitosti terapije najčešće se koriste hitotriozidaza i kemokin CCL 18. Hitotriozidaza je povišena u bolesnika s Gaucherovom bolešću 100 do 5000 puta iznad normalne vrijednosti i obično korelira s težinom bolesti. Primjenom enzimske zamjenske terapije dolazi do pada vrijednosti hitotriozidaze u serumu. Oko 6% populacije je homozigot za mutirani gen odgovoran za odsustvo aktivnosti hitotriozidaze, a u oko 30-40% osoba su heterozigoti za taj gen. U tih osoba aktivnost hitotriozidaze je smanjena za 2-3 puta. U osoba s Gaucherovom bolešću koji su homo ili heterozigoti za mutirane gene hitotriozidaze uspješnost terapije može se mjeriti određivanjem razine kemokina CCL18. Vrijednost kemokina CCL18 povećana je 30 puta u bolesnika s Gaucherovom bolešću. Kemokin CCL18 je dobar marker za određivanje aktivnosti bolesti i uspješnosti terapije u bolesnika u kojih nema aktivnosti hitotriozidaze (24,25).

6. Terapija Gaucherove bolesti

Za razliku od drugih genetskih bolesti za Gaucherovu bolest postoji učinkovita terapija rekombiniranom imiglucerazom. Do sada je preko 3500 bolesnika širom svijeta liječeno ovim lijekom (26). Terapija imiglucerazom izrazito je učinkovita u bolesnika s tipom I Gaucherove bolesti, dok za tip II i III rezultati pokazuju odsustvo učinka lijeka u središnjem živčanom sustavu zbog nemogućnosti prolaza imigluceraze kroz krvnomždanu barijeru (27). Prije ere enzimske zamjenske terapije, anemija i trombocitopenija u tipu I Gaucherove bolesti liječene su splenektomijom (28). Prema sadašnjim rezultatima splenektomija ima kratkotrajan učinak i na duži vremenski period dovodi do ubrzane progresije bolesti na koštano-zglobnom sustavu (29). Stoga se danas bez obzira na veličinu slezene splenektomija ne preporučuje kao terapijski pristup u liječenju Gaucherove bolesti.

Tablica 3. Ocjena težine bolesti u djece (< 18 godina) s Gaucherovom bolešću.

Visoki rizik	Nizak rizik
Potrebno je zadovoljiti jedan ili više kriterija	Potrebno je zadovoljiti sve kriterije
Simptomatska bolest <ul style="list-style-type: none"> - bol u trbuhi - bol u kostima - malaksalost - slabost - kaheksija 	Uredne funkcije jetre, srca, pluća i bubrega
Zastoj u rastu	Normalna kvaliteta života
Bilo koji znak koštane bolesti uključujući i Erlenmeyerov deformitet distalnog dijela femura	Bez znakova progresije bolesti
Broj trombocita $\leq 60 \times 10^9/L$ ili dokazana hemoraška dijateza	
Simptomatska anemija $\leq 100 \text{ g/L}$	
Smanjena kvaliteta života	

Tablica 4. Ocjena težine bolesti u odraslih bolesnika s Gaucherovom bolešću.

Visoki rizik	Nizak rizik
Potrebno je zadovoljiti jedan ili više kriterija	Potrebno je zadovoljiti sve kriterije
Simptomatska koštana bolest <ul style="list-style-type: none"> - srednja do teška osteopenija - kronična koštana bol - koštane krize - avaskularna nekroza - patološke frakture - ugrađena zglobova proteza 	Uredne funkcije jetre, srca, pluća i bubrega
Smanjenje kvalitete života zbog Gaucherove bolesti	Normalna ili minimalno smanjena kvaliteta života
Kardiopulmonalna bolest uključujući i plućnu hipertenziju	Bez znakova progresije bolesti
Broj trombocita $\leq 60 \times 10^9/L$ ili dokazana hemoraška dijateza	Koštana bolest ograničena ili znaci blage osteopenije s Erlen-Mayerovim deformitetom
Simptomatska anemija $\leq 80 \text{ g/L}$	Hemoglobin $\geq 105 \text{ g/L}$ za djecu i žene Hemoglobin $\geq 115 \text{ g/L}$ za muškarce
Ovisnost o transfuzijama	Trombociti $\geq 60 \times 10^9/L$ u tri mjerena u periodu od tri mjeseca
Značajna bolest jetre <ul style="list-style-type: none"> - hepatomegalija $\geq 2.5 \times$ normalna vrijednost - infarkt(i) jetre - portalna hipertenzija - hepatitis 	Veličina jetre $\leq 2.5 \times$ normalna vrijednost
Značajna bolest slezene <ul style="list-style-type: none"> - splenomegalija $\geq 15 \times$ normalna vrijednost - infarkt(i) slezene 	Veličina slezene $\leq 15 \times$ normalna vrijednost
Značajna bolest bubrega	
Bilo koje stanje koje može dovesti do ubrzanja ili nastanka komplikacija Gaucherove bolesti	

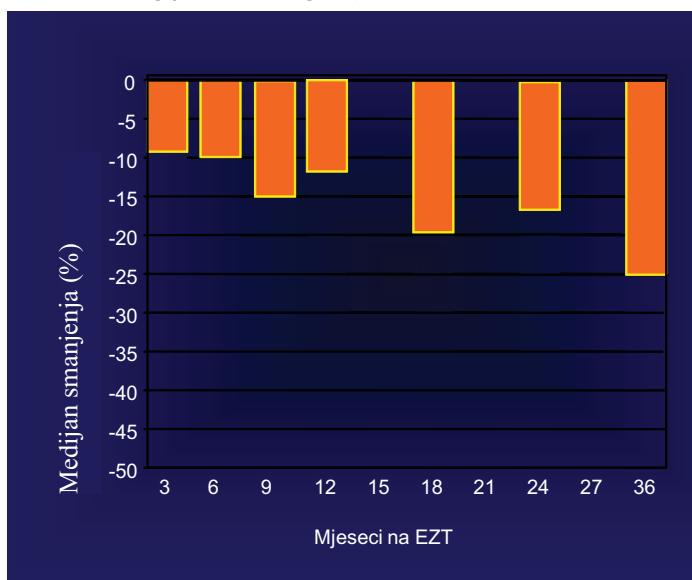
6a. Enzimska zamjenska terapija

Od 1992. godine do danas preko 5000 bolesnika liječeno je primjenom enzima imigluceraze (Cerezyme®, Genzyme corp. SAD) (30). Prema dosadašnjim iskustvima liječenje tipa I Gaucherove bolesti primjenom placentarne imigluceraze ili rekombinirane imigluceraze jednako je učinkovito, te omogućava bolesnicima normalan život (31). Prema pilot studijama te farmakokinetskim studijama doza od 60 i.j./kg tjelesne težine pokazala se najučinkovitija u poboljšanju hematoloških parametara i smanjenju volumena jetre i slezene (32). Hematološki odgovor vidi se u roku od 12 tjedana nakon početka terapije. Veličina jetre i slezene normalizira se nakon 1-2 godine od početka terapije. Masivna splenomegalija reagira sporije na terapiju te je u tih bolesnika potrebno 4-5 godina do normalizacije veličine slezene. U nekim

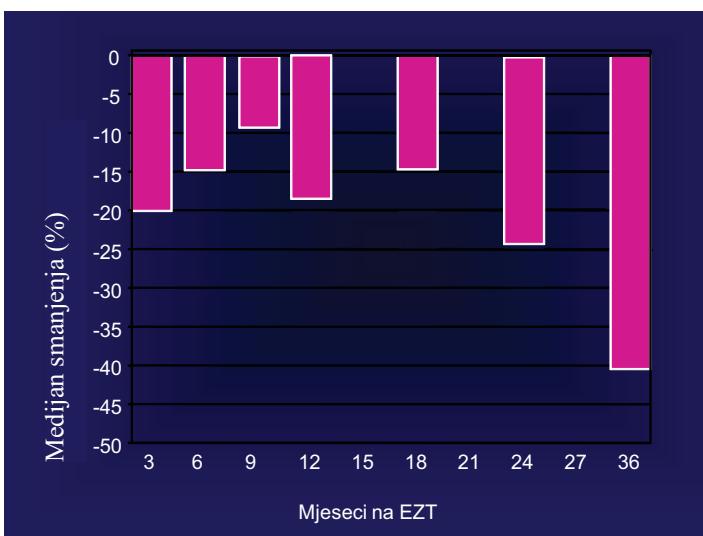
bolešnika s izrazitim splenomegalijom nikada se ne postigne potpuno smanjenje slezene do fizioloških granica. Prema tim rezultatima danas je stav da se djeca i odrasli dijele u dvije rizične skupine u kojih se primjenjuje imigluceraza u dozi od 60 ili 30 i.j./kg tjelesne težine svakih 14 dana (Tablica 3 i 4).

Od lipnja 2001. godine do danas u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb dijagnosticirano je 13 odraslih bolesnika sa Gaucherovom bolešću. Do sada je u program enzimske zamjenske terapije uključeno 11 bolesnika. U svih bolesnika dok su primali enzimsku zamjensku terapiju utvrđeno je smanjenje slezene i jetre (slika 5 i 6) te poboljšanje hematoloških parametara.

Slika 5. Medijan smanjenja volumena jetre u bolesnika liječenih imiglucerazom (iskustva Zavoda za hematologiju KBC Zagreb)



Slika 6. Medijan smanjenja volumena slezene u bolesnika liječenih imiglucerazom (iskustva Zavoda za hematologiju Interne klinike KBC Zagreb).



Tijekom primjene rekombinirane imigluceraze (Cerezyme®) niti u jednog bolesnika nije bilo značajnijih nuspojava koje bi zahtijevale medicinsku intervenciju. U jedne bolesnice lijek je primjenjivan tijekom trudnoće bez ikakvih nuspojava ili posljedica za dijete (33).

6.b Inhibicija sinteze supstrata

U posljednje vrijeme u tijeku su istraživanja na području razvoja lijekova koji bi inhibirali sintezu supstrata tj. peroralni inhibitor glukosiltransferaze (Zavesca®, OGS, Engleska). Cilj tog lijeka je smanjiti biosintezu te na taj način smanjiti akumulaciju glukocerebrozida (34). Nakon 12 mjeseci primjene lijeka došlo je do značajnog smanjenja razine hitotriozidaze u serumu te volumena slezene dok su se hematološki parametri statistički neznačajno poboljšali (35). Najčešća nuspojava primjene ovog lijeka su učestale proljevaste stolice koje su se

javile u 79% bolesnika ubrzo nakon početka liječenja. Prema prvim rezultatima istraživanja potrebno je još dodatno evaluirati učinkovitost liječenja posebno u svjetlu efikasnosti i sigurnosti (36). Za sada enzimska zamjenska terapija ostaje kao zlatni terapijski standard u liječenju bolesnika s Gaucherovom bolešću.

6c. Transplantacija krvotvornih matičnih stanica

Transplantacija koštane srži široko je primjenjivana u liječenju bolesnika s Gaucherovom bolešću. Primjena ovog načina liječenja dovodi do nestanka ili smanjenja simptoma bolesti, a Gaucherove stanice nestaju iz koštane srži. Značajno je naglasiti da za razliku od enzimske zamjenske terapije, transplantacija krvotvornih matičnih stanica ima povoljan učinak na neuropatski oblik bolesti. Kako transplantacija krvotvornih matičnih stanica ima svoje rizike i smrtnost posebice od reakcije transplantata protiv primatelja danas je ova metoda ograničena na liječenje bolesnika s tipom III bolesti u kombinaciji s enzimskom zamjenskom terapijom, kao i u liječenju tipa I bolesti u slučajevima kada je došlo do razvoja po život opasnih neželjenih učinaka.

6d. Terapija malim molekulama (chaperoni)

Chaperoni su male molekule niske molekularne težine koje se mogu primjeniti peroralno, a aktivnost pokazuju u svim stanicama, posebice u mozgu (37). Te molekule stabiliziraju rezidualni enzim glukocerebrozidazu i omogućuju njegov transfer iz endoplazmatskog retikulum u Golgijski aparat, a zatim u lizosome. Imino šećeri povećavaju aktivnost rezidualne glukocerebrozidaze kada se dodaju u kulturu fibroblasta bolesnika s Gaucherovom bolešću (38). Na žalost taj učinak je viđen samo u bolesnika koji su imali N370S mutaciju, a nikada u bolesnika s L444P mutacijom (38).

6e. Genska terapija

Retro i lenta virusi mogu biti upotrebljeni kao nositelji gena za glukocerebrozidazu (39). Nakon obećavajućih laboratorijskih rezultata nije se uspjelo isti takav učinak postići u čovjeka (40).

7. Zaključak

Gaucherova bolest je nasljedna metabolička bolest koja se danas uspješno liječi enzimskom zamjenskom terapijom. Primjena rekombinirane imigluceraze učinkovito sprječava progresiju bolesti te poboljšava kvalitetu života bolesnika. Primjena imigluceraze dovodi do normalizacije veličine jetre i slezene te hematoloških parametara. Na žalost lijek ne može ukloniti promjene koje su se tijekom vremena dogodile na koštano-zglobnom sustavu (primjerice kolaps kralješka ili avaskularnu nekrozu glave femura), ali može uspješno prevenirati nastanak progresije bolesti. Enzimska zamjenska terapija danas je zlatni standard u liječenju bolesnika s Gaucherovom bolešću. Terapija redukcijom supstrata

pokazala je učinkovitost u liječenju Gaucherove bolesti ali je zbog izrazitih nuspojava ograničena na slučajeve nepodnošenja imigluceraze odnosno u kombinaciji s imiglucerazom u liječenju tipa 3 Gaucherove bolesti. U bliskoj budućnosti za očekivati je napredak u liječenju malim molekulama – chaperonima, dok genska terapija nosi u sebi nadu za definitivno izlječenje Gaucherove bolesti.

Literatura

1. Hillcoat BL. Rare diseases and “orphan” drugs. *Med J Aust.* 1998;169(2):69-70.
2. Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Gaucher’s disease. *Lancet.* 2001;358(9278):324-7.
3. Charrow J, Esplin JA, Gribble TJ, Kaplan P, Kolodny EH, Pastores GM, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ, Wisch JS. Gaucher disease: recommendations on diagnosis, evaluation, and monitoring. *Arch Intern Med.* 1998;158(16):1754-60.
4. Chen M and Wang J. Gaucher disease. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:851-3.
5. Gzggenbuhl P, Grosbois B and Chales G. Gaucher disease. *Joint Bone Spine.* 2008;75:116-24.
6. NIH Technology Assessment Panel on Gaucher Disease. Gaucher disease: current issues in diagnosis and treatment. *J Am Med Assoc.* 1996;275:548-53.
7. Schiffmann R, Brady RO. New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. *Drugs.* 2002;62(5):733-42.
8. Meikle PJ, Fuller M and Hopwood JJ. Epidemiology and screening policy. In: A.H. Futerman and A. Zimran, Editors, *Gaucher disease*, Taylor and Francis Group, LLC ed. Boca Raton (2007), pp. 321–340.
9. Dweck A, Blickstein D, Elstein D, Zimran A. Thrombocytosis associated with enzyme replacement therapy in Gaucher disease. *Acta Haematol.* 2002;108(2):94-6.
10. Brady RO, Kanfer JN, Bradley RM, Shapiro D. Demonstration of a deficiency of glucocerebroside-cleaving enzyme in Gaucher’s disease. *J Clin Invest.* 1966;45(7):1112-5.
11. Zhao H, Grabowski GA. Gaucher disease: Perspectives on a prototype lysosomal disease. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(4):694-707.
12. Zimran A, Elstein D, Levy-Lahad E, Zevin S, Hadas-Halpern I, Bar-Ziv Y, Foldes J, Schwartz AJ, Abrahamov A. Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher’s disease. *Lancet.* 1995;345(8963):1479-80.
13. Charrow J, Andersson HC and Kaplan P, et al. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med.* 2000;60:2835-2843.
14. Cherin P, Sedel F, Mignot C, et al. Neurological manifestations of type 1 Gaucher’s disease: is a revision of disease classification needed? *Rev Neurol.* 2006;162:1076-1083.
15. Zimran A, Elstein D, Levy-Lahad E, Zevin S, Hadas-Halpern I, Bar-Ziv Y, Foldes J, Schwartz AJ, Abrahamov A. Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher’s disease. *Lancet.* 1995;345(8963):1479-80.
16. Elstein D, Hadas-Halpern I, Azuri Y, Abrahamov A, Bar-Ziv Y, Zimran A. Accuracy of ultrasonography in assessing spleen and liver size in patients with Gaucher disease: comparison to computed tomographic measurements. *J Ultrasound Med.* 1997;16(3):209-11.
17. Poll LW, Koch JA, Willers R, Aerts H, Scherer A, Haussinger D, Modder U, vom Dahl S. Correlation of bone marrow response with hematological, biochemical, and visceral responses to enzyme replacement therapy of nonneuronopathic (type 1) Gaucher disease in 30 adult patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28(2):209-20.
18. Belmatoug N, Launay O, Carbon C. Pulmonary hypertension in type 1 Gaucher’s disease. Comite d’Evaluation du Traitement de la Maladie de Gaucher. *Lancet.* 1998;352(9123):240.
19. Beutler E. Gaucher’s disease. *N Engl J Med.* 1991;325:1354-60.
20. Casal JA, Lacerda L, Perez LF, Pinto RA, Clara Sa Miranda M, Carlos Tutor J. Relationships between serum markers of monocyte/macrophage activation in type 1 Gaucher’s disease. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(1):52-5.
21. Elstein D, Abrahamov A, Dweck A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Gaucher disease: pediatric concerns. *Paediatr Drugs.* 2002;4(7):417-26.
22. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994;93(3):1288-92.
23. Wraith JE. Lysosomal disorders. *Semin Neonatol.* 2002;7(1):75-83.
24. Malaguarnera L. Chitotriosidase: the yin and yang. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:3018-3029.
25. Aerts JM, Hollak CE, van Breemen M, et al. Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr.* 2005;Suppl 94:43-6.
26. Grabowski GA, Leslie N, Wenstrup R. Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years. *Blood Rev.* 1998;12(2):115-33.
27. Schiffmann R, Mankin H, Dambrosia JM, Xavier RJ, Kreps C, Hill SC, Barton NW, Rosenthal DI. Decreased bone density in splenectomized Gaucher patients receiving enzyme replacement therapy. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28(2):288-96.
28. Poll LW, Maas M, Terk MR, et al. Response of Gaucher bone disease to enzyme replacement therapy. *Br J Radiol.* 2002;75 (Suppl 1):A25-A36.
29. Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Weinreb NJ, Zimran A. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med.* 2000;160(18):2835-43.
30. Starzyk K, Richards S, Yee J, et al. The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for Gaucher disease. *Mol Genet Metab.* 2007;90:157-63.
31. Andersson HC, Charrow J, Kaplan P, et al. Individualization of long-term enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Genet Med.* 2005;7:105-10.
32. Weinreb NJ, Charrow J, Andersson HC, Kaplan P, Kolodny EH, Mistry P, Pastores G, Rosenbloom BE, Scott CR, Wappner RS, Zimran A. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *Am J Med.* 2002;113(2):112-9.
33. Mrsic M, Fumić K, Vrčić H, et al. Successful pregnancy on enzyme replacement therapy with Cerezyme. *Clin Ther.* 2007;29 (suppl C):S84-83.
34. Wenstrup RJ, Kacena KA, Kaplan P, et al. Effect of enzyme replacement therapy with imiglucerase on BMD in type 1 Gaucher disease. *J Bone Miner Res.* 2007;22:119-26.
35. Elstein D, Hollak C, Aerts JM, et al. Sustained therapeutic effects of oral miglustat (Zavesca, N-butyldeoxynojirimycin, OGT 918) in type I Gaucher disease. *J Inher Metab Dis.* 2004;27:757-66.
36. Weinreb NJ, Barranger JA, Charrow J, et al. Guidance on the use of miglustat for treating patients with type 1 Gaucher disease. *Am J Hematol.* 2005;80:223-9.
37. Kolter T and Wendeler M. Chemical chaperones-a new concept in drug research. *Chembiochem.* 2003;4:260-4.
38. Sawkar AR, Adamski-Werner SI, Cheng WC, et al. Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol.* 2005;12:1235-44.
39. Kim, EY, Hong YB, Lai Z, et al. Long-term expression of the human glucocerebrosidase gene in vivo after transplantation of bone-marrow-derived cells transformed with a lentivirus vector. *J Gene Med.* 2005;7:878-87.
40. Barranger JM, Novelli EA, Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1:857-67.

Trebamo li promjene u hrvatskom konsenzusu dijagnostike i liječenja limfoma?

Dr. Sandra Bašić-Kinda

Prof. dr. sc. Igor Aurer, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: emil.kind@zg.t-com.hr, aurer@mef.hr

UVOD

U rujnu 2006. održan je u Zagrebu interdisciplinarni skup koji je donio preporuke za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnika s limfomima u Hrvatskoj, što je i objavljeno u Liječničkom Vjesniku (Aurer I, Dominis M, Stern-Padovan R, Huić D, Šantek F. Dijagnostika i liječenje limfoma – hrvatski konsenzus. Liječ Vjesn 2007;129:111-117.). U veljači 2008. su na sastanku održanom u Zagrebu preporuke razmotrene i dopunjene podacima vezanim uz PET-CT i Mb. Hodgkin, da bi na posljednjem sastanku Krohema u Umagu u studenom 2008. ponovo bile razmotrene navedene preporuke. Zaključeno je da se konsenzus za sada ne mijenja, a s obzirom da je izazvao veliku pažnju nazočnih hematologa, objavljujemo ga u skraćenom obliku.

DIJAGNOSTIKA

Dijagnostičku obradu povećanog limfnog čvora ili tkiva sumnjivog na limfom treba provesti na slijedeći način:

- Povećani limfni čvor ili drugo tkivo sumnjivo na limfom se citološki punktira i postavlja preliminarna dijagnoza. Materijal se eventualno može uzeti i za protočnu citometriju (PC) i citogenetiku (klasičnu i/ili FISH).

- Bolesnike kod kojih citologija govori za limfom, nalaz je sumnjiv ili citološki nije moguće doći do uzorka treba uputiti na biopsiju radi dobivanja uzorka za histološku dijagnostiku. Dijagnoza limfoma postavlja se na temelju patohistološkog nalaza.

Tijekom pregleda i obrade bolesnika s limfomom kojeg se planira liječiti sa ciljem izlječenja, osim uobičajenih postupaka, treba prije početka liječenja učiniti slijedeće:

- Odrediti opće stanje bolesnika prema ECOG-u (Eastern Cooperative Oncology Group) radi izračunavanja vrijednosti međunarodnog prognostičkog indeksa (IPI).

- Zabilježiti u kojim regijama su povećani limfni čvorovi i izmjeriti dvije međusobno okomite dimenzije najvećeg čvora u svakoj regiji.

- Provesti radiološko određivanje proširenosti bolesti.

- Radi procjene zahvaćenosti koštane srži učiniti biopsiju kosti i uzeti materijal za histološku i citološku analizu. Puncija koštane srži je dovoljna samo ako je pozitivna!

- Učiniti rutinsku hematološku i biokemijsku obradu uključujući LDH i elektroforezu proteina

seruma.

- U osoba starijih od 65 godina i onih s anamnezom srčane bolesti, potrebno je ultrazvučno ili scintigrafski odrediti ejekcijsku frakciju lijeve klijetke (EF). Ako je EF ispod 50% ne preporuča se primjena antraciklina i agresivna terapija.

Morfološka dijagnostika

Dijagnoza i klasifikacija limfoma provodi se na histološki obrađenom materijalu prema kriterijima SZO. Uz rutinska bojenja nužna je imunohistokemija (IMH). U pojedinim slučajevima za postavljanje dijagnoze može biti potrebno učiniti i citogenetsku dijagnostiku (FISH) te molekularne analize (PCR). Za dijagnozu recidiva limfoma može biti dovoljna citološka dijagnoza pod uvjetom da citološki nalaz odgovara ranije postavljenom histološkom. U slučaju dvojbe preporuča se ponoviti biopsiju i histološku obradu.

Histološki preparat treba analizirati nakon bojenja hemalaun-eozinom. Ako nalaz govori za limfom, preporuča se preparat uputiti na IMH u jedan od pet centara specijaliziranih za hematopatologiju: KB Merkur, KB Osijek, KBC Rijeka, KBC Split ili KBC Zagreb – Rebro.

Radiološka dijagnostika

CT, zbog kratkotrajnosti pregleda i dostupnosti uređaja u zdravstvenim ustanovama, u ovom je trenutku najbolja metoda za određivanje proširenosti i praćenje tijeka bolesti.

Inicijalni pregled kod bolesnika s dokazanim limfomom potrebno je učiniti uz intravensku primjenu kontrastnog sredstva u monofaznom protokolu snimanjem čitavog volumena tijela od baze lubanje do ingvinuma. Želudac treba biti distendiran vodom ili razrjeđenim peroralnim kontrastnim sredstvom (kod MALT limfoma ne treba primjenjivati peroralno kontrastno sredstvo), a mokraćni mjehur distendiran urinom. Prije i nakon pregleda s intravenskim kontrastnim sredstvom potrebna je obilna hidracija bolesnika. U djece je uvijek potrebno primijeniti intravensko kontrastno sredstvo.

Kod reevaluacije i praćenja bolesnika s limfomom, CT pregled također treba izvršiti uz intravensku primjenu kontrastnog sredstva u monofaznom protokolu, a polje snimanja treba uključivati područje između gornje torakalne aperture i ingvinuma. Limfne čvorove vrata može se evaluirati UZV-om. Kako bi se izbjeglo multipliciranje pretraga u obradi bolesnika s limfomom, uz CT pregled nepotreban je i sumacijski rentgenogram torakalnih organa (snimka srca i pluća) kao i UZ pregled abdominalnih organa.

Komplikacije osnovne bolesti i liječenja zahtjevaju posebnu radiološku obradu neovisnu od protokola preporučenog ovim konsenzusom, a koja mora biti prilagođena bolesniku i vrsti komplikacije.

Kod svakog bolesnika prije pregleda

potrebno je znati koncentraciju serumskog kreatinina ili ureje te anamnističke podatke o eventualnim reakcijama preosjetljivosti. Kod bolesnika kod kojih je kontraindicirana primjena jodnog kontrastnog sredstva, pregled parenhimskih organa treba napraviti UZ-om, a limfne čvorove analizirati CT pregledom uz peroralnu primjenu kontrastnog sredstva. Pregled pojedine regije može se nadopuniti MR pregledom, a isto treba učiniti kod trudnih bolesnica.

Kod nepotpuno obrađenih bolesnika i histološki nedokazanog limfoma pregled limfnih čvorova treba napraviti najmanje CT-om uz peroralnu primjenu kontrastnog sredstva, a UZ-om analizirati parenhimske organe.

Kod bolesnika sa "širokom" uputnom dijagnozom kod kojih diferencijalno-dijagnostički u obzir dolazi i limfom dostatan je pregled CT-om nativno ili uz peroralnu primjenu kontrastnog sredstva.

Značajke na CT-u koje upućuju na zahvaćenost limfnog čvora limfomom jesu: promjer veći od 1 cm, okrugao oblik, neoštire granice, inhomogena struktura te periferna ili miješana vaskularizacija. Mjere se dva najdulja, međusobno okomita promjera najvećeg limfnog čvora svake skupine te se opisuje njegova lokalizacija. Potrebno je napomenuti granice protezanja povećanih limfnih čvorova kraniokaudalno, a ukoliko uređaj to omogućuje navesti i duljinu. Kod velikih tumorskih masa kojima je nemoguće točno mjeriti dimenzije, potrebno je u nalazu navesti proširenost tvorbe u odnosu na pojedine fiksne anatomske strukture (npr. krvne žile, polovi bubrega).

Za usporedbu pri kontrolnim pregledima neophodno je priložiti slikovni materijal i nalaze prethodnih pregleda kako bi se mjerena vršila na istim mjestima i time omogućila procjena učinka terapije (potpuna ili djelomična regresija, stacionaran nalaz, progresija, relaps, recidiv). Preslike (fotokopije) slikovnog materijala nisu dostatne kvalitete te ne omogućuju komparaciju nalaza.

MR je alternativna metoda CT-u, međutim zbog dugotrajnosti i skupoće pregleda i slabije dostupnosti uređaja, pregled je indiciran samo kod posebno odabralih bolesnika.

Scintigrafska dijagnostika

Pozitronska emisijska tomografija (PET) koja pokazuje mjesta nakupljanja ^{18}F -fluordeoksiglukoze na istom prikazu s CT-om (PET-CT) omogućuje istovremenu morfološku i funkciju analizu.

Odnedavno i u Hrvatskoj postoji PET-CT uređaj, u Poliklinici Medikol, pa je ovu pretragu moguće brže i lakše napraviti, no to još uvijek nije dovoljno da se PET počne koristiti kao rutinska metoda određivanja proširenosti bolesti u bolesnika s limfomom pri početnoj dijagnostičkoj obradi. Zbog toga je dogovoren da bi PET trebalo koristiti za procjenu odgovora na liječenje bolesnika s B-velikostaničnim NHL i Hodgkinovim

limfomom (limfomima koji praktički uvijek nakupljaju radionuklid FDG) kod kojih nije jasno je li postignuta kompletna remisija. U osnovi su to oni bolesnici koji su prema ranijim kriterijima u nepotvrđenoj kompletnoj ili parcijalnoj remisiji. Kad god je to moguće bez značajnog rizika za bolesnika potrebno je pozitivan nalaz PET-a potvrditi punkcijom ili biopsijom zahvaćenog čvora, odnosno organa. U slučaju da to nije moguće, može se nalaz PET-a s visokim intenzitetom nakupljanja radionuklida (SUV) smatrati kao sigurno pozitivan, dok je bolesnike, kod kojih to nije slučaj, bolje pratiti, nego samo na temelju tog nalaza intenzivno liječiti. Obzirom da nakon provedenog zračenja do negativizacije PET-a može proći i 6 mjeseci, ova metoda nije prikladna za procjenu odgovora na zračenje. PET ne treba koristiti za praćenje bolesnika koji nemaju kliničkih znakova relapsa limfoma.

LIJEČENJE

Načini liječenja opisani u ovom dijelu odnose se na inače zdrave osobe sposobne podnijeti terapiju. Teže kronične bolesti ili smanjena sistolička funkcija srca mogu predstavljati kontraindikacije za navedene terapijske pristupe. Dob, sama po sebi, nije kontraindikacija za primjenu učinkovite kemoterapije. Kemoterapiju, ako nema kontraindikacija, treba davati u punoj dozi i na vrijeme. Smanjenje doze i odgađanje terapije može nepovoljno utjecati na ishod liječenja.

Kemoterapiju po shemi CHOP (ciklofosfamid 750 mg/m^2 , doksorubicin 50 mg/m^2 , vinkristin 2 mg , prednizon (ili ekvivalent) 100 mg dnevno kroz 5 dana) treba davati u razmacima od po tri tjedna.

Rituksimab treba, ako je moguće, dati neposredno prije kemoterapije. Prvu dozu rituksimaba treba dati sporo, u skladu s uputama proizvođača, dok se slijedeće infuzije smiju skratiti. Radi sprječavanja nuspojava preporuča se profilaktička primjena paracetamola, antihistaminika i kalcija.

Non-Hodgkin limfomi:

A. Indolentni B-limfomi

a) 1. linija, mlađi od 65 godina, proširena bolest

Samo postavljanje dijagnoze nije dovoljan razlog za početak liječenja. Indikacije za početak liječenja su tumorska masa $> 5 \text{ cm}$, simptomi uzrokovani bolešću, vrijeme podvostručenja tumorske mase manje od 1 godine, B simptomi, citopenija i stadij 3 ili 4.

Liječenje treba provesti sa 6 ciklusa terapije po shemi R-CHOP (rituksimab + CHOP) i 2 dodatna ciklusa rituksimaba. Povoljnim odgovorom smatra se postizanje najmanje parcijalne remisije (PR) nakon 3 ciklusa kemoterapije i nepotvrđene kompletne remisije (nKR) nakon završetka liječenja. Za sada nema dokaza da je nakon ovakvog liječenja terapija održavanja rituksimabom korisna.

b) 2. linija, mlađi od 65 godina, proširena bolest

Liječenje treba provesti po shemi R-FND (rituksimab, fludarabin, mitoksantron, deksametazon) u razmacima od po 4 tjedna. Prvu reevaluaciju treba učiniti nakon 3 ciklusa. Ako je postignuta najmanje nKR, bolesnike treba uputiti na prikupljanje autolognih matičnih krvotvornih stanica i autotransplantaciju. Tijekom tih postupaka treba im dati još 3 ciklusa rituksimaba (ukupno 6). Ako nakon 3 ciklusa terapije nije postignuta nKR, liječenje treba nastaviti s još 3 ciklusa R-FND-a. Ako je nakon 6 ciklusa postignuta najmanje PR bez infiltracije koštane srži, bolesnika treba uputiti na prikupljanje autolognih matičnih krvotvornih stanica i autotransplantaciju.

c) 1. linija, stariji od 65 godina, proširena bolest

Indikacije za početak liječenja su kao u mlađih osim što stadij nije važan. Obzirom da se bolesnike ne liječi s ciljem izlijеčenja, ne treba inzistirati na potpunom određivanju proširenosti pa se CT može zamijeniti RTG-om srca i pluća odnosno UZV-om trbuha. Bolesnike treba liječiti s 8 ciklusa rituksimaba i 6 ciklusa kemoterapije klorambucilom i glukokortikoidima ili po shemi COP. Prva terapija se primjenjuje svaka 4, a druga svaka 3 tjedna. Procjena učinka liječenja je ista kao u mlađih bolesnika. Nakon postizanja zadovoljavajućeg odgovora, može se nastaviti terapijom održavanja (npr. malim dozama klorambucila).

d) Kasnije linije, stariji od 65 godina, proširena bolest

U bolesnika u kojih je remisija trajala dugo, može se ponoviti ista terapija. U suprotnom treba dati 6 ciklusa intenzivnije kemoterapije u kombinaciji s rituksimabom (npr. COP nakon klorambucila, CHOP ili FND nakon COP-a, FND nakon CHOP-a). Procjena učinka liječenja je ista kao u 1. liniji. Nakon postizanja zadovoljavajućeg učinka, može se nastaviti terapijom održavanja, rituksimabom ili malim dozama klorambucila.

B) Agresivni limfomi**a) 1. linija, lokalizirana bolest**

Bolest je lokalizirana ako je u stadiju I. Svi ostali stadiji smatraju se proširenom bolešću.

Bolesnike s B-NHL, mlađe od 65 godina s tumorom najvećeg promjera preko 5 cm ili povišenim LDH treba liječiti sa 6 ciklusa terapije po shemi R-CHOP i zračenjem zahvaćenog polja tijekom čega im treba dati još 2 ciklusa rituksimaba. Bolesnike mlađe od 65 godina s T-perifernim limfomom bez obzira na čimbenike rizika i one s anaplastičnim velikostaničnim limfomom sa čimbenicima rizika treba liječiti sa 6 ciklusa terapije po shemi CHOP i zračenjem zahvaćenog polja. U oba slučaja treba reevaluaciju učiniti nakon 3 ciklusa. Ako nije postignuta najmanje PR, kemoterapiju treba prekinuti i odmah započeti sa zračenjem.

Bolesnike starije od 65 godina s B limfomom i nekim od navedenih čimbenika rizika treba liječiti s

3 ciklusa kemoterapije po shemi R-CHOP i zračenjem zahvaćenog polja tijekom čega im treba dati još jedan ciklus rituksimaba.

Bolesnike bez čimbenika rizika i one starije od 65 godina s T/NK-NHL treba liječiti s 3 ciklusa kemoterapije po shemi CHOP i zračenjem zahvaćenog polja

b) 1. linija, proširena bolest, B velikostanični limfom

Liječenje treba provesti s 8 ciklusa terapije po shemi R-CHOP. Povoljnim odgovorom smatra se postizanje najmanje PR nakon 3 ciklusa i nKR na kraju liječenja. U slučaju dvojbe o konačnom ishodu liječenja, treba učiniti pozitronsku emisijsku tomografiju (PET) radionuklidom fluorodeoksiglukozom (FDG). Bolesnicima, koji su prije početka liječenja imali čvor promjera većeg od 5 cm koji je na kraju liječenja u nKR, treba ozračiti tu regiju.

c) 1. linija, proširena bolest, limfom plaštene zone (mantle)

Liječenje bolesnika mlađih od 65 godina treba provesti sa 6-8 ciklusa terapije po shemi R-CHOP i autotransplantacijom tijekom koje oni, koji nisu dobili svih 8 ciklusa, trebaju primiti preostale doze rituksimaba. Liječenje bolesnika starijih od 65 godina treba provesti s 8 ciklusa terapije po shemi R-CHOP.

Povoljnim odgovorom smatra se postizanje najmanje PR nakon 3 ciklusa i nKR na kraju liječenja. Pozitivan PET govori za aktivnu bolest. Vrijednost negativnog PET-a je dvojbena ako prije početka liječenja nije pokazano da tumor nakuplja FDG.

d) 1. linija, proširena bolest, T ili NK-limfom

Liječenje bolesnika starijih od 65 godina i mlađih s IPI 0-2 treba provesti po shemi CHOP. Bolesnike mlađe od 65 godina s T perifernim limfom treba nakon 6-8 ciklusa kemoterapije uputiti na prikupljanje matičnih krvotvornih stanica i autotransplantaciju. Ostalima treba dati 8 ciklusa kemoterapije. Povoljnim odgovorom smatra se najmanje PR nakon 3 ciklusa i nKR na kraju liječenja. Pozitivan PET govori za aktivnu bolest. Vrijednost negativnog PET-a je dvojbena ako prije početka liječenja nije pokazano da tumor nakuplja FDG.

Rezultati liječenja bolesnika s IPI > 2 CHOP-om nisu dobri pa dolazi u obzir primjena neke od intenzivnijih kemoterapijskih shema (npr. ACVBP, EPOCH, CHOEP itd). Nema dokaza da je neka od navedenih shema bolja od druge. Bolesnike mlađe od 65 godina, koji dobro odgovore na liječenje, treba uputiti na prikupljanje matičnih krvotvornih stanica i autotransplantaciju.

e) 2. linija, mlađi od 65 godina

Liječenje treba provesti s 2-4 ciklusa neke od uobičajenih kemoterapijskih shema (ICE, DHAP, EPOCH, HDIM, ESHAP itd). Za sada nema dokaza da je neka od njih bolja od drugih.

Obzirom da dodatak rituksimaba u drugoj liniji liječenja B-velikostaničnog limfoma povećava preživljavanje za 15%, preporuča se, za bolesnike kod kojih se planira intenzivna kemoterapija i autotransplantacija, tražiti odobrenje bolničkog Povjerenstva za lijekove i HZZO-a za primjenu rituksimaba izvan odobrenih indikacija, a na teret bolničkog budžeta.

Morbus Hodgkin

Obrada bolesnika s Hodgkinovim limfomom, odnosno Morbus Hodgkin, ne razlikuje se od obrade bolesnika s agresivnim non-Hodgkin limfomom.

Objavljene studije ukazuju da se u bolesnika s Hodgkinovim limfomom kemoterapijom po shemi ABVD (doksorubicin, bleomicin, vinblastin, dakarbazin) postižu bolji rezultati, nego COPP-om (ciklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednizon) ili alternirajućim COPP-ABVD protokolom. Rezultati ABVD-a i hibridnog COPP-ABV protokola su podjednaki, ali je potonji toksičniji. Iako njemački rezultati ukazuju da bi eskalirani BEACOPP (bleomicin, etopozid, dokosorubicin, ciklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednizon) mogao biti još bolji, ovaj protokol je toksičniji, a primjena mu je složena pa nije šire prihvaćen. Zbog toga hrvatski hematolozi smatraju da je ABVD standardna prva linija liječenja bolesnika s Hodgkinovim limfomom koji nemaju kontraindikacija za agresivnu kemoterapiju i primjenu antraciklina. Bolesnike u stadiju III i IV treba liječiti sa 6-8 ciklusa kemoterapije. Procjenu učinka liječenja treba učiniti nakon 4 ciklusa. Ako je postignuta kompletan remisija, treba dati još 2 ciklusa (ukupno 6). Ako je postignuta parcijalna remisija, treba dati 6 pa zračiti polja koja nisu bila u kompletnoj remisiji ili dati 8 ciklusa kemoterapije bez zračenja. U slučaju dvojbe, preporuča se u procjeni odgovora koristiti PET.

Bolesnike u stadiju I i II treba liječiti sa 4 ciklusa ABVD-a i zračenjem zahvaćenih polja ili, ako je sa 4 ciklusa postignuta kompletan remisija, dati još 2 ciklusa (ukupno 6) bez zračenja. Uz potonji način liječenja nešto je veća učestalost relapsa, ali nema razlike u preživljavanju. Kod bolesnika u stadiju I bez čimbenika rizika može se broj ciklusa kemoterapije smanjiti za 1-2. Doza zračenja polja u kompletnoj remisiji ne treba biti veća od 20-30 Gy, a polja u parcijalnoj remisiji 30 Gy + 6 Gy na rezidualni tumor.

Procjena odgovora na liječenje

Procjena odgovora na liječenje, tzv. reevaluacija, sastoji se od kliničkog pregleda, laboratorijskih analiza, radiološke obrade i eventualno ponavljanja biopsije. Potrebno je:

- Zabilježiti u kojim regijama su povećani limfni čvorovi i izmjeriti dvije međusobne okomite dimenzije najvećeg čvora u svakoj regiji.

- Provesti radiološko određivanje proširenosti kako je ranije navedeno.

- Ponoviti biopsije kosti i eventualnih drugih nelimfatičkih organa ako su na prethodnoj evaluaciji bile pozitivne.

- Učiniti rutinsku hematološku i biokemijsku obradu uključujući LDH.

Tumorska masa izračunava se tako da se zbroje umnošci dvaju okomitih promjera najvećih čvorova. Na primjer, ako se na vratu desno nalaze dva čvora, jedan 3x4 cm, a drugi 2x2 cm, a u medijastinumu jedan čvor 4x5 cm, tumorska masa je $3 \times 4 + 2 \times 2 + 4 \times 5 = 12 + 4 + 20 = 36$. U bolesnika s velikim brojem čvorova u velikom broju regija, dovoljno je odabrati šest najvećih iz različitih regija. Procjenu odgovora treba provoditi prema preporukama međunarodne radne skupine kako slijedi:

Kompletan remisija (KR)

- Svi čvorovi koji su bili veći od 1,5 cm su se smanjili na 1,5 cm ili manje u najvećem promjeru, čvorovi zahvaćeni bolešcu koji su na početku liječenja bili između 1 i 1,5 cm su se smanjili na 1 cm ili manje u najvećem promjeru, a infiltrati u drugim organima su nestali. Laboratorijski poremećaji uzrokovani limfomom su se normalizirali. Simptomi uzrokovani tumorom su nestali.

- U B-velikostaničnom, folikularnom i Hodgkinovom limfomu negativan nalaz PET-a bez obzira na veličinu čvorova i infiltrata. U drugih vrsta limfoma također, pod uvjetom da je prije početka liječenja pokazano da limfom nakuplja FDG.

Nepotvrđena kompletan remisija (nKR)

- Smanjenje tumorske mase za > 75%, bioptički dokazani infiltrati su nestali, laboratorijski poremećaji uzrokovani limfomom su se normalizirali, a simptomi nestali.

- Ove kategorije nema ako se procjena odgovora provodi PET-om

Parcijalna remisija (PR)

- Smanjenje tumorske mase za > 50%, bez kriterija za nKR. Laboratorijski poremećaji uzrokovani limfomom su se normalizirali, a simptomi uzrokovani tumorom su nestali.

Stabilna bolest (SB)

- Između PR i PB

Progresivna bolest (PB)

- Povećanje tumorske mase za > 50% ili pojava novih čvorova, odnosno infiltrata u regijama ili organima u kojima ih ranije nije bilo.

Načelno se KR i nKR smatraju ekvivalentnima. Vrijednost PR ovisi o vrsti bolesti i liječenju. SB i PB znače da bolest ne odgovara na liječenje i da ga treba mijenjati.

Zaključak

Publiciranje rezultata novih studija može dovesti do potrebe za mijenjanjem preporuka, što će svakako biti predmet rasprava na idućim sastancima KROHEM-a i drugim hematološkim skupovima. Za sada se ne mijenja ranije postignuti hrvatski konsenzus.

Literatura:

1. Aurer I, Dominis M, Štern-Padovan R, Huić D, Šantek F. Dijagnostika i liječenje limfoma – hrvatski konsenzus. Liječ Vjesn 2007;129:111-117.

Epidemiološka studija malignih limfoma u Republici Hrvatskoj

Prof. dr. sc. Mara Dominis, dr. med.
Zavod za patologiju i citologiju
Klinička bolnica Merkur i Medicinski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
E-pošta: mara.dominis@zg.t-com.hr

1. Program Rolyda zamijenjen je programom ISSA. Program ISSA je tehnički dotjeraniji od Rolyde, bar za potrebe patologije.
2. Za 2008. će se podaci obraditi na isti način kao što su obrađeni podaci za 2007. godinu.
3. Od 01.01.2009. godine upisivat će se dijagnoze prema zadnjoj klasifikaciji SZO malignih limfoma (WHO, 2008.)
4. Postignut je dogovor s pedijatrima hematolozima koji će poslati podatke u pripadajuće centre za 2007. godinu, kao i novodijagnosticirane maligne limfome u tijeku 2008.
5. Rezultati epidemiološke studije za 2008. godinu bit će prezentirani na slijedećem sastanku KROHEM-a u proljeće 2009. godine.

Upitnik o biopsijama kosti

Dr. Sandra Bašić-Kinda
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinički bolnički centar Zagreb
E-pošta: emil.kindा@zg.t-com.hr

- 1) Radite li biopsiju kosti?
 - a) DA
 - b) NE
- 2) Ukoliko ne radite biopsije kosti zokružite ponuđene razloge ili navedite Vaš razlog:
 - a) zbog nedostatka materijala za izvođenje pretrage (igle za biopsiju)
 - b) zbog nemogućnosti patohistološke analize u vlastitoj ustanovi
 - c) zbog neadekvatne potpore od starijih kolega
 - d) zbog troškova navedene pretrage
 - e) ostalo
- 3) Mislite li da je navedenu pretragu neophodno učiniti da bi se do kraja definirale pojedine hematološke bolesti?
 - a) da
 - b) ne
- 4) Koje su organizacijske i tehničke prepostavke za izvođenje navedene pretrage u Vašoj ustanovi?

Molimo da se ispunjeni upitnik pošalje na adresu dr. Sandra Bašić-Kinda, Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatičeva 12, 10 000 Zagreb. Upitnik se također može poslati faksom na broj +385-1-2421-892, ili e-poštom na adresu: email.kindа@zg.t-com.hr

CCEP – u liječenju bolesnika s uznapredovalim limfomom

Ivo Radman,¹ Sandra Bašić-Kinda,¹ Marijo Vodanović,¹ Igor Aurer,¹ Radmila Ajduković-Stojisavljević,² Boris Labar¹

¹Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb, ²Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KB Dubrava.

Adresa autora za kontaktiranje:

Prim. dr. Ivo Radman

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: iradman@net.hr

CCEP (lomustin, klorambucil, etopozid i metilprednizolon) je kurativni kemoterapijski protokol liječenja za bolesnike s uznapredovalim Non-Hodgkin limfomom (NHL) i Morbus Hodgkin (MH). Standardnim kemoterapijskim protokolima poput CHOP za agresivni limfom postiže se kompletna remisija u oko 55-65% bolesnika. Dodatak monoklonskog protutijela rituksimaba poboljšao je terapijski odgovor. Nadalje, autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica, ovisno o centrima, dovodi do dugotrajnog preživljjenja između 20 i 50% bolesnika, a u nekih je bolesnika s limfomom indicirana i allogena transplantacija krvotvornih matičnih stanica. Međutim, određeni bolesnici s agresivnim i indolentnim limfomima su refraktorni na standardne kemoterapijske protokole, ili nisu pogodni za agresivniji oblik liječenja, ili tome nisu skloni.

Kao temeljni lijek protokola CCEP je etopozid, koji je pokazao učinkovitost u peroralnoj primjeni, a učinak se temelji na dugotrajanju primjeni manjih doza etopozida. Njegova bioraspoloživost ne opada uzimanjem hrane ili primjenom drugih lijekova, stoga peroralna primjena ovog lijeka ne zaostaje za parenteralnom.

Pratili smo učinak liječenja CCEP protokolom kod 19 bolesnika. U trenutku početka liječenja CCEP protokolom medijan dobi bolesnika iznosio je 45 godina, raspon 20-76 godina. To su bili bolesnici s potvrđenom i jasnom dijagnozom limfoma (7 bolesnika s MH, 7 bolesnika s agresivnim NHL, dok je 5 bolesnika imalo indolentni NHL), proširenim oblikom bolesti, u relapsu ili refraktorni na prethodno liječenje, koji su odbili agresivnije liječenje ili nisu bili kandidati za intenzivnije liječenje. Oni su prethodno liječeni nizom standardnih kemoterapijskih linija, od kojih je otprilike polovica liječena radioterapijom. Mlađi bolesnici su liječeni i autolognom transplantacijom matičnih

krvotvornih stanica, dok je jedan bolesnik liječen i mini-alo transplantacijom matičnih krvotvornih stanica. Najzahvaćeniji ekstralimfatički organ bila su pluća i jetra bolesnika, te koštana srž.

Protokol CCEP se primjenjuje po sljedećoj shemi: a) lomustin (CCNU) 1. dan ciklusa u dozi od 80 mg/m^2 ; b) klorambucil $5 \text{ mg } 1\text{--}7.$ dan; c) etopozid $100 \text{ mg/m}^2 1\text{--}7.$ dan; d) metilprednizolon $50 \text{ mg/m}^2 1\text{--}14.$ dan.

Doza lijekova se modificira prema stupnju toksičnosti, ili se liječenje odgađa do tjedan dana ukoliko su $L < 3.000/10^9$ i/ili $\text{Trc} < 100.000/10^9$, a ukoliko su i nakon tjedan dana $L < 3.000/10^9$ i/ili $\text{Trc} < 100.000/10^9$ doza se reducira. Ukoliko su $L 2.000\text{--}3.000/10^9$ i/ili $\text{Trc} 50\text{--}75.000/10^9$ daje se 75% doze lomustina, klorambucila i etopozida, a ukoliko su su $L 1.500\text{--}2.000/10^9$ i/ili Trc manji od $50.000/10^9$ daje se 50% doze lomustina, klorambucila i etopozida. Doza kortikosteroida se ne reducira.

Ciklusi se primjenjuju svaka 4 tjedna. Cilj je primijeniti >3 ciklusa, optimalno između 6-8 ciklusa. Klinička reevaluacija se provodi na početku liječenja, nakon 3. ciklusa te na kraju liječenja.

Od naših ukupno 19 bolesnika, liječenje je završilo 12 bolesnika, dok kod sedam bolesnika još traje liječenje, te će se konačna procjena učinkovitosti CCEP protokola učiniti po završetku njihove terapije.

Preliminarni rezultati ukazuju da se pozitivan odgovor na liječenje očitavao kod nešto više od 60% bolesnika. Febrilna neutropenija bila je najčešći oblik toksičnosti terapije, skoro kod 40% bolesnika. Bakterijska pneumonija i aspergilom pluća su zabilježeni kod dva bolesnika. Trombocitopenija i anemija su relativno rijetko bile posljedica toksičnosti liječenja, ukupno kod dva bolesnika. Nije bilo znanih odgode provođenja protokola, dok je za sada jedan bolesnik prekinuo liječenje zbog toksičnosti.

Zaključno se može naglasiti da je CCEP protokol prvenstveno namijenjen onim bolesnicima s refraktornim limfomom, rezistentnim na sve prethodne linije liječenja, koji nisu prikladni za agresivniji način liječenja, ili nisu skloni intenzivnjem liječenju.

Zaklada "Ana Rukavina" i Registar davatelja krvotvornih matičnih stanica

Doc. dr. sc. Mirando Mrsić, dr. med.
E-pošta: mmrsic@inet.hr

Medicinski direktor i član Upravnog odbora zaklade "Ana Rukavina"

Od svojih početaka rada u novinarstvu Ana Rukavina se zalagala za prava žena, djece, manjina i svih ugroženih skupina. U svom novinarskom radu posvetila se istraživanju ljudskih sloboda i socijalnih problema kao što su siromaštvo, bijeda, narkomanija i prostitucija. Pisala je o ljudima s margini, posebno o sudbinama ljudi pripadnika manjina. Socijalne teme bile su joj najdraže, provela je dan obilazeći pučke kuhe i napravila reportazu kako se brinemo za zaboravljene i nemoćne «Kada je tanjur juhe dovoljan za osmje», članak o prodavačima na črnomeračkoj tržnici «Ljutiti Knez, baklava i nasmijani Iračanin s diplomom naftnog inženjera». Svojim tekstovima ukazala je na probleme društva zagovarajući ravnopravnost bilo da se radi o ženama, djeci, bolesnicima ili pripadnicima manjina.

Niti bolest za koju je saznala u svibnju 2005. godine Anu Rukavinu nije sprječila da i dalje radi i piše o ravnopravnosti i pravu na jednakost. U razgovoru s prijateljima Ana je rekla „da se sve u životu događa s razlogom“. S još većim žarom pisala je o svojoj bolesti želeći ukazati na probleme koji bolesnici s leukemijom imaju tijekom i nakon liječenja.

Posebno je bila osjetljiva na probleme djece koja su se liječila zajedno s njom. Ana Rukavina je u toj borbi da bude „što manje čelavih glavica u sterilnim jedinicama“ krenula sa svojim najboljim oružjem - riječima. Počela je pisati o svojoj bolesti, davati intervjuje.

U tekstu objavljenom u studenom 2005. godine, pod naslovom «Lobiram u sebi za život» ispričala je svoju priču s Rebra i opisala svoju odluku da krene u lobiranje ne samo za vlastito ozdravljenje nego i za ozdravljenje drugih bolesnika. U tom tekstu leukemiju je opisala kao vremešnu damu s prosijedom punđom koja je na kućnom pragu promatra, držeći mačku u jednoj, a cigaršpic u drugoj ruci. Tada je zaključila «leukemija je ipak ženskog roda pa nekako mislim, lakše će se boriti sa ženom». Iza tog teksta napisala je seriju članaka o svojoj bolesti želeći što više senzibilizirati javnost na problem nedostatka davatelja koštane srži.

U prosincu 2005. godine, objavljen je Anin tekst "Čeznem za prljavim Harryjem" u kojem je opisala tegobe oboljelih od leukemije. Tekst objavljen 22. prosinca 2005. godine odnosio se na posjet Djeda Mraza malim bolesnicima u sterilnim jedinicama kojem je pomogla sakupiti darove. U tom tekstu snažno je progovorila o životnim problemima i patnjama djece koje se liječe transplantacijom koštane srži. Ukazala je na želju tih malih bolesnika da budu kao

i druga djeca. U članku objavljenom 14. travnja 2006. godine objavljen je tekst "Vapaj oboljelih od raka krvi", u kojem je Ana dala intervju, a radilo se o istraživanju zašto u Hrvatskoj unatoč uputama EU još nije zakonski omogućeno osnivanje banke matičnih stanica uzetih pri porođaju iz krvi pupkovine, kojima se s velikim uspjehom liječi leukemija, od koje kod nas godišnje oboli oko 50 ljudi, a više od polovice umire. U tom tekstu pokrenula je pitanje osnivanje Banke matičnih stanica koja bi mogla pomoći u liječenju malih bolesnika s leukemijom i nekim od njih pružiti izlječenje. Tražeći pravo na ravnopravnost napisala je 14. veljače 2006. tekst «Luksuz zvan zdravlje» u kojem je zaključila «Imaš pare – živiš, nemaš pare – mrtav si». U tom tekstu snažno je progovorila o problemu transplantacije i liječenja visokodiferentnom medicinom u Hrvatskoj. Na žalost bolest se Ani vratila u listopadu 2006. godine. Ana se najbližim prijateljima obratila pismom za pomoći u kojem je napisala "ako prikupim novac koji neću moći iskoristiti, dajem Vam najiskreniju riječ da će svaku kunu prosljediti onima kojima će biti spasonosna". Pismo je u nekoliko dana preplavilo Zagreb i cijelu zemlju, Europu, SAD, Kanadu.

Pismo Ane Rukavine

Dobar dan,

ja sam Ana Rukavina, rođena sam i živim u Zagrebu, uskoro ću 30, novinarka sam političkog dnevnika Vjesnik, i na žalost to je za sad sve lijepo od mene. Moja prava osobna karta zapravo je nešto drugačija. Od svibnja 2005. godine bolujem od leukemije, stoga Vas molim za 10 minuta vremena kako bi Vam ukratko opisala svoju priču iz bolesničke sobe na Rebru. Ne bojte se, nije tako tragična, ni depresivna, meni se jednostavno dogodio život, iz kojeg i Vi možda možete nesto naučiti.

Sredinom 2005. kronično iscrpljenja završila sam u ambulantnim kolima Hitne pomoći. Liječnik koji me na Rebru primio samo je zabrinuto klimao glavom, a ja sam ga, danas je to pomalo smiješno, uvjeravala da mi da lijekove, pusti me kući i da će doći za par dana ako mi ne bude bolje. Bezuspješno, moja krvna slika bila je gora od svih onih očajnih na našim novim dokumentima. Osjećala sam nemir, strah i po glavi mi se motala misao da možda bolujem od one bolesti od koje umire glumica filma uz koju su 70-godina plakale sve majke, mislim da se zvala Love story. Na moju veliku žalost, bila sam u pravu, no tu riječ nisam uspjevala izgovoriti. Suze, apaurini, a potom ravnodušnost. Podvlačila sam crtul misleći kako sam u svojih 28 godina uspjela odrasti voljena u divnoj obitelji, zasluziti ljubav, supruga i prijatelja, putovati, raditi posao koji me još i danas veseli. Tonula sam tješći se logikom razvoja situacije, sve dok mi na pamet nije pala jedna prilično glupasta misao. Obožavam sladoled, lješnjak je moj prvi odabir,

ali tog ga ljeta nisam okusila, preduhitrio me odlazak u bolnicu. Pa, zar je moguće da više nikada neću jesti sladoled od lješnjaka? Jesam li se spremna odreći svega i svih koje volim? Tog sam dana preplašena, ali odlučna krenula u lobiranje za vlastito ozdravljenje. Prihvatala sam izazov i bila prebolno svjesna od prvog dana, što me snašlo. Jednu bitku protiv takvog suparnika već sam izgubila, a poraze kad te besramno pokradu, ne podnosim. Moj tata Gordan, umro je 2003. u 54. godini života, karcinom pluća. To me doista slomilo.

No, dobro, liječila sam se 6 mjeseci, do listopada 2005., na Odjelu za transplantaciju koštane srži na KBC Rebro, kod profesora Borisa Labara i njegovog liječničkog tima. Moram priznati da obožavam svoje liječnike i sestrice, i što je još ljepše mislim da su osjećaji uzajamni. Oni su moja velika obitelj, bez lažnog uljepšavanja, i uljevaju mi sigurnost tako da mi prepustiti vlastitu sudbinu u njihove ruke ne pada ni najmanje teško. Obavila sam kemoterapije i potom sam transplantirana. Sve je išlo nekim polaganim tokom, svakim danom sam bivala bolja. Konačno, pomislila sam ljetos, lagano vraćam život u prave tračnice i ostavljam sve ružno iza sebe. Čvrsto sam u to vjerovala. No, onda je stigao rujan i prve glavobolje koje su ubrzo prerasle u danonoćne migrene, izgubila sam vid na desno oko, trpila nesnosne bolove i otežano hodala. Usprkos tome pretrage su bilo uredne, a onda je sve krenulo ispočetka. Sredinom listopada ponovno ona ista hitna, Rebro, ovaj sam put barem znala proceduru. Nakon održenih pretraga potvrđeno je da se moja stara poznanica vratila, pronašli su leukemijske stanice u likvoru. Što da Vam kažem kako sam se osjećala, iskreno toga se i ne volim sjećati, najteže mi je zapravo bilo sve ponovo priopćiti mojoj obitelji.

Tražila sam ponovno neki motiv, nešto da me pokrene jer ja sam sve samo ne tužna i depresivna osoba. Za mene predaja nikada nije bila opcija. Često sam u životu i poslu zbog toga dobila po nosu, ali što će kad drugačije ne znam. Beskrajno volim život i ljude, znam i imam za koga živjeti. Ponekad mi se čini da mi ni 100 godina ne bi bilo dovoljno da učinim sve što je onaj na nebuh namijenio za mene.

Ipak, došla sam do točke kad više ne mogu sama i kad mi trebapomoći dobrih ljudi. Urazgovorusliječničkim timom o dalnjem tijeku liječenja, kemoterapijama, zračenju mozga, i naposljetku vrlo riskantnoj transplantaciji koštane srži od nesrodnog donora koja me očekuje oko Nove godine, otvorena je mogućnost odlaska na liječenje u SAD, i(li) nabavka skupih lijekova, imunosupresiva koji nisu dostupni našem tržistu, a mogli bi pomoći da se izvučem iz ove priče, da ona dobije sretan kraj.

Zapravo mi je teško sročiti što Vas točno želim zamoliti, znam, rekla sam na početku 10 minuta, ali nisam bila sasvim iskrena. Nemojte zamjeriti, nije mi lako. Sve moje želje zapravo stanu u dvije riječi: želim život.

Svjesna sam svih rizika koji me očekuju, spremna sam i na deblij kraj, nije me strah, smo se ne želim okrenuti i otići a da nisam sigurna da sam učinila sve što sam mogla da se još neko vrijeme zadržim tu među vama. Apsolutno vjerujem svojim liječnicima, ali znam gdje živim, stoga Vas najljubaznije molim da mi pomognete. Jedino što Vama, i sebi moram obećati jest da će se truditi biti hrabra, vedra i kad bude teško. A bit će, to sigurno znam.

*Zelim Vam ugodan dan!
Hvala*

Kap dobrote koju je Ana podarila svima nama preplavio je Hrvatsku. Svi su htjeli pomoći mladoj novinarki koja obožava sladoled od lješnjaka. Takva reakcija javnosti ponovno je u Ani probudila onu snagu koju je nosila oduvijek u sebi: nerv mlade novinarke, osjetljivost žene i odlučnost nekoga tko ima cilj. Tada je napisala prijateljici SMS poruku «Nikako mi ne može biti jasno da za spas jednog života treba čak dva i pol milijuna kuna, a za spas stotina i tisuću života samo sedam milijuna kuna. To nije logično. Kad je akcija krenula tako dobro, hajdemo skupljati sedam milijuna pa da pomognemo svima. Meni možda ta lova uopće neće trebati, ali sedam milijuna moramo prikupiti». Kako je jačala akcija, na žalost jačala je i Anina bolest. Napustila nas je u nedjeljno jutro, 26. studenog. Njeno veliko srce nije izdržalo.

S Aninim odlaskom njena želja nije nestala, nastavila je jačati u stotinama srca širom Hrvatske. Njen poziv «Želim život» nije bio poziv nekoga tko se bori sa smrtonosnom bolešću; bio je to poziv nade svim onima koji imaju istu bolest. Na dan Aninog odlaska hrvatski registar brojio je oko 150 dobrovoljnih davatelja koštane srži da bi se taj broj danas popeo na preko 32000 i neprestano raste. Sredstva prikupljena Aninom akcijom pretočena su u Zakladu Ana Rukavina čiji jedini cilj je proširenje Registra dobrovoljnih davatelja koštane srži i osnivanje Banke matičnih stanica. Od dana kada je osnovana Zaklada pa do danas ispunjene su Anine želje. Registar dobrovoljnih darivatelja koštane srži danas broji 33 000 darivatelja od čega je 10 000 darivatelja potpuno tipizirano u sva tri lokusa (HLA A, B i DR). Zaklada je svojim financijskim sredstvima omogućila da se u KBC počne tipizirati molekularnim metodama HLA sustav na velikom broju uzoraka. Danas je Hrvatski registar dobrovoljnih darivatelja koštane srži ravnopravno uključen u Svjetski registar dobrovoljnih darivatelja koštane srži (World Wide Donor Registry). Još jedno obećanje Aninoj trudnoj prijateljici da će se Banka osnovati prije njenog poroda ispunjeno je 28. ožujka 2007. godine kada je Banka svečano otvorena u KBC Zagreb i nosi Anino ime.



NAŠ PRVI KONCERT

ZAKLADA ANA RUKAVINA

21.12.2006. Naš prvi koncert "Želim život" održan u Zagrebu – **produkcija 0 kuna**





Sjećanje na prof. dr. sc. Marina Nolu, dr. med.
(8. rujan 1964. - 3. rujan 2008.)



U OVOM KAMENU

Ovdje sam od prapočetka
U ovom kamenu
Provirujem noktima, i zubima, i borama na čelu
Ovdje gdje kamen već vječno stoji
I ostaje za vječno
(Sa mnom što neprestano nestajem nekamo)
I to je ono po čemu jesam
U svjetlosti
I ovdje
Jer svjetlost iz kamena izbija
A uokolo je tama
Ili zapravo nešto po čemu se prepoznaće
A ona još nije sasvim stigla
Samo joj predstraže kruže
Neobznanjene nastupaju njezine vojske
Al ja sam u samom kamenu
I u njemu doista bivam
Doduše – iscrpljen od stoljetnog sjaja
Al ipak
I ostat će ovdje
Ovdje gdje kamen već vječno stoji
I ostaje; za vječno

Josip Pupačić

Za moga dragog učenika, prijatelja Marina Nolu, koji je došao s kamena, bio u svom kratkom životu čvrst i postojan i koji se vratio svome kamenu.

Prof. dr. sc. Mara Dominis, dr. med.

Angiogeneza u multiplom mijelomu

Sanja Štifter, Ksenija Lučin, Blaženka Grahovac, Ita Hadžisejdić, Toni Valković¹, Irena Seili-Bekafigo¹, Antica Načinović-Duletić¹, Duška Petranović¹, Ivan Host¹, Blažen Marijić¹, Merica Aralica², Štefica Dvornik², Nives Jonjić

Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, ¹Klinika za unutarnje bolesti i ²Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Rijeka

Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Nives Jonjić, dr. med.

Zavod za patologiju

Klinički bolnički centar Rijeka i
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

E-pošta: nives@medri.hr

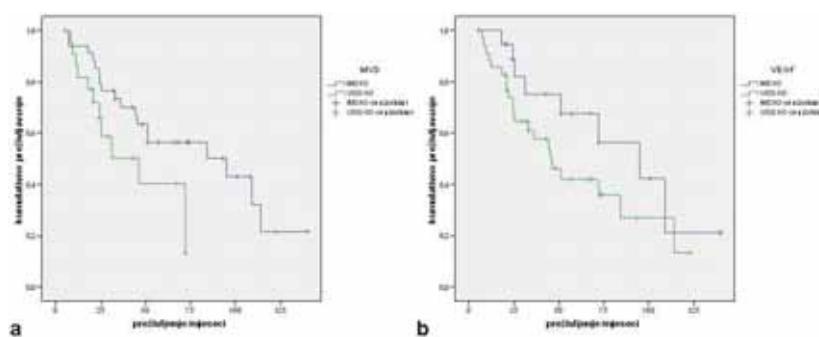
Multipli mijelom (MM) je B-stanična neoplazma obilježena infiltracijom koštane srži s malignim plazma stanicama. Molekularna je osnova bolesti nejasna. Angiogeneza, kao biološki fenomen stvaranja novih krvnih žila, prisutna je u koštanoj srži kod raznih plazma staničnih poremećaja i posebno je značajna karakteristika aktivnog MM. Zbog toga se inhibicija tumorske angiogeneze pokazala kao obećavajući pristup liječenju ove bolesti. Ciljevi našeg istraživanja jesu ispitati angiogenezu i ispoljenost vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF), monocitnog kemotaktičnog proteina (MCP-1) u odnosu prema Nuklearnom Faktoru – kappa B (NF-κB) na molekularnoj razini, razini proteina u stanici i u plazmi bolesnika s MM.

Do sada je u istraživanje uključeno 79 bolesnika s dijagnozom MM i s kliničkim podacima kao što su klinički stadij bolesti, odgovor na terapiju i preživljjenje. Biopsički uzorci koštane srži koriste se za dvostruku imunohistokemijsku analizu u cilju utvrđivanja gustoće krvnih žila (MVD), Ki67 proliferacijskog indeksa te izražaja VEGF, MCP-1 i subcelularne lokalizacije NF-κB. Krv bolesnika služi za određivanje plazmatske koncentracije VEGF i MCP-1 ELISA metodom, dok se stanice koštane srži koriste za izolaciju plazma stanica metodom magnetske separacije ili protočnom citometrijom u cilju utvrđivanja mRNA VEGF i MCP-1 RT-PCR metodom.

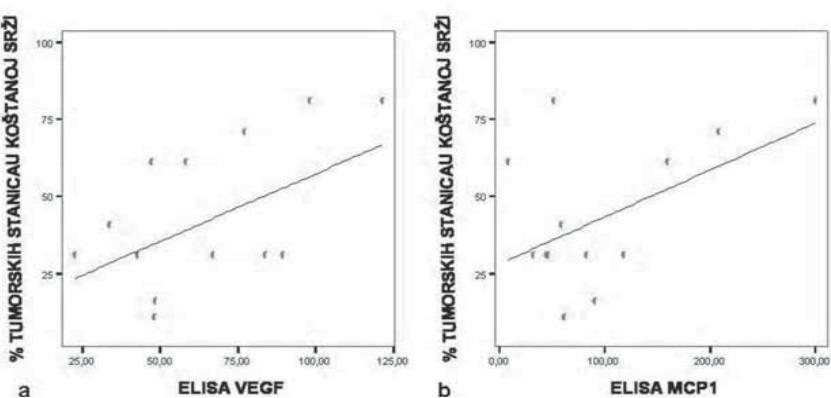
Dosadašnji rezultati su pokazali pozitivnu udruženost između MVD, % tumorskog infiltrata, pojave atipičnih plazma stanica i kliničkog stadija bolesti. Nadalje uočena je značajna povezanost većeg MVD sa slabijim

odgovorom na terapiju i kraćim preživljjenjem (Slika 1a). Jači izražaj VEGF u tumorskim stanicama je bio značajno udružen s kraćim preživljjenjem (Slika 1b). Slabija ekspresija ova citokina, VEGF i MCP-1 bila je udružena s većim izražajem NF-κB. U bolesnika je utvrđena veća plazmatska koncentracija VEGF u odnosu na kontrolnu skupinu. Koncentracije ova citokina, VEGF i MCP-1 bile su udružene s većim % tumorskih infiltrata (Slika 2), a samo VEGF s većim kliničkim stadijem bolesti. Vrijednosti mRNA VEGF i MCP-1 u preliminarnim istraživanjima nisu pokazale udruženost s ispitivanim parametrima.

Rezultati dosadašnjeg istraživanja potvrdili su pozitivnu korelaciju između angiogeneze i loših prognostičkih čimbenika te kraćeg preživljjenja u multiplom mijelomu. Koncentracije sekerniranih citokina u krvi, VEGF i MCP-1, proporcionalne su tumorskoj masi i dugoročno mogu biti važan klinički pokazatelj bolesti. Opažena obrnuta ekspresija između NF-κB i citokina ne isključuje mogućnost njihove međusobne povezanosti u regulaciji sinteze i sekrecije ovih proteina što se daljnijim studijama mora utvrditi.



Slika 1. Preživljavanje bolesnika obzirom na nisku odnosno visoku vrijednost srednje gustoće malih krvnih žila (MVD) (a) i obzirom na niske odnosno visoke vrijednosti VEGF na tumorskim stanicama (b).



Slika 2. Korelacija zahvaćenosti koštane srži s VEGF i MCP-1 u plazmi bolesnika određene ELISA metodom. Veće vrijednosti VEGF (a) i MCP-1 (b) u plazmi (pg/ml) prate veći postotak tumorskih stanica u koštanoj srži.

Međunarodni projekt non-Hodgkinovih limfoma – suradnja s non-Hodgkin lymphoma study group

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

Nakon izlaganja prof. dr. sc. Mare Dominis na Rochovom onkološkom vikendu u veljači 2008. godine o učestalosti limfoma u 2007. godini u Hrvatskoj primijetili smo da se raspodjela limfoma ponešto razlikuje od raspodjele limfoma u Zapadnoj Europi i Sjevernoj Americi. Istovremeno smo pronašli Litvansku studiju s raspodjelom limfoma sličnoj našoj (inverzija učestalosti folikularnog limfoma i limfoma marginalne zone).

Kako bismo utvrdili je li takva raspodjela stvarna početkom 2008. godine započet je projekt s prof. dr. Weisenburgerom iz International Lymphoma Study Group sa sjedištem u Omaha (Nebraska, SAD). Prof. dr. Weisenburgera smo izabrali za suradnika obzirom da je već vodio sličan projekt čiji su rezultati objavljeni u časopisu Blood (A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood. 1997;89(11):3909-3918.). Cilj projekta je utvrditi učestalost non-Hodgkinovih limfoma u Hrvatskoj, a potom i u ovom dijelu Europe. U projekt se uključilo svih pet hrvatskih centara za patohistološku dijagnostiku limfoma (KB Osijek, KBC Rijeka, KBC Split, KBC Zagreb, KB Merkur). Jedna od ključnih stvari u ostvarenju ovog projekta je bliska suradnja hematopatologa i hematologa. Upravo je zbog toga osmišljena kompjutorska baza podataka u kojoj se osim osnovnih podataka o bolesniku i dijagnozi nalaze opširni podaci o molekularnim osobitostima tumora kao i laboratorijski nalazi, detalji o terapiji, praćenju i ishodu bolesti. U kompjutorsku bazu podatke upisuju patolozi i hematolozi.

Planirano je da u Hrvatskoj skupimo 200 uzastopno dijagnosticiranih NHL-ova, sačuvamo stakla obojana hemalaun eozinom, imunohistokemijskim metodama i parafinski blok te da pri kraju projekta prof. dr. Weisenburger sa svojim timom dođe u Hrvatsku i pregleda sakupljene uzorke te potvrdi dijagnoze kako bi procijenio učestalost NHL u Hrvatskoj. Prof. dr. Weisenburger je predložio da nakon dobivenih rezultata studiju proširimo i usporedimo naše rezultate s rezultatima sličnih studija u susjednim te drugim evropskim zemljama.

Do sad smo u čitavoj Hrvatskoj skupili oko 200 NHL-a no samo 110 bolesnika ima potpune kliničke podatke.

Novi prognostički biljezi u difuznom velikostaničnom limfomu

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

Difuzni velikostanični limfom B-imunofenotipa je najčešći non-Hodgkinov limfom. Pojavljuje se u svim dobnim skupinama, najčešće u šestom desetljeću života, podjednako u muškaraca i žena. DLBCL je agresivan limfom s visokom smrtnošću. Liječi se kombinacijom kemoterapije (CHOP) i imunoterapije (rituksimab). Uprkos agresivnom liječenju, u oko 50% bolesnika bolest se ponovo javi. Među brojnim čimbenicima koji su istraživani kao mogući prognostički pokazatelji, međunarodni prognostički indeks pokazao se najboljim. Nakon što su 2000. godine Alizadeh i suradnici objavili rezultate studije prema kojima postoji razlika u preživljenu između dva tipa DLBCL-a različite histogeneze, uslijedile su brojne studije koje su to potvrđivale ili osporavale. Obzirom da je imunohistokemijski moguće razdvojiti ova dva tipa na one podrijetla germinativnog centra (germinative center B cells, GCB) i one koji to nisu (non-GCB), podtipovi, ukoliko bi se to pokazalo korisnim, mogu se navesti kao dio patohistološke dijagnoze.

Cilj našeg istraživanja bio je utvrditi značaj podjele DLBCL na podtipove GCB i non-GCB na prognozu bolesti te utvrditi moguću povezanost izražaja biljega CD43 s prognozom bolesti.

U studiju smo uključili 92 bolesnika s dijagnozom DLBCL koji su dijagnosticirani i liječeni u Kliničkom bolničkom centru Zagreb od 1986. do 2006. godine. U studiju su uključeni bolesnici koji su imali sve kliničke podatke i parafinski blok s tumorom. Iz studije su isključeni bolesnici u kliničkom stadiju I, HIV pozitivni, bolesnici s transformiranim ili medijastinalnim DLBCL-om. Svi bolesnici su liječeni CHOP-om ili sličnim protokolom, dio bolesnika je liječen i rituksimabom. Među bolesnicima bilo je 39 bolesnika u GCB skupini i 53 u non-GCB skupini DLBCL-a.

Žive bolesnike pratili smo prosječno 37 mjeseci. Koristeći χ^2 test nismo našli statistički značajne razlike u kliničkim karakteristikama između bolesnika GCB i non-GCB skupine. Nije bilo razlike između skupina GCB i non-GCB u postizanju potpune remisije (67% vs. 70%), 3-godišnjem preživljenu bez povrata bolesti (46% vs. 49%) te ukupnom preživljenu (54% vs. 56%). Zabilježena je razlika u preživljenu između skupine koja je primala rituksimab i one koja nije, no razlika nije dosegla statističku značajnost. Ispitujući pojavnost CD43 na tumorskim stanicama, našli smo da bolesnici koji imaju prisutan CD43 na tumorskim stanicama imaju lošije preživljenje od onih koji taj biljeg nemaju. Razlika u preživljenu ove dvije skupine bolesnika je statistički značajna.

U studiji nismo našli povezanost podtipova GCB i non-GCB s preživljanjem, dok je prisutnost CD43 na tumorskim stanicama pokazatelj nepovoljnog ishoda bolesti.

Prijedlog dijagnostičkog algoritma za akutne leukemije

Mirna Sučić, Ika Kardum-Skelin¹, Melita Nakić², Mirjana Marković-Glamočak, Sunčica Ries, Koraljka Gjadrov Kuveždić

Zavod za citologiju, Klinički zavod za patologiju i citologiju KBC Zagreb

¹Laboratorij za citologiju i hematologiju, Klinička bolnica Merkur

²Klinika za dječje bolesti Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

prof. dr. sc. Mirna Sučić, dr. med.

Zavod za citologiju, Klinički zavod za patologiju i citologiju Klinički bolnički centar Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-pošta: mirna.sucic@yahoo.com

Prije prijedloga citomorfološkog dijagnostičkog algoritma i prijedloga za dodatne dijagnostičke postupke u bolesnika s akutnom leukemijom navedeni su i prijedlozi za:

- 1) uvjete koje mora ispunjavati centar u kojem se radi kompletna citomorfološka dijagnostika akutnih leukemija, te
- 2) smjernice za ispunjavanje uputnice za citomorfološku analizu, standardi za broj i način pripreme citoloških uzoraka za citološke analize.

Uvjeti koje mora ispunjavati centar u kojem se radi kompletna citomorfološka dijagnostika akutnih leukemija:

1. Kompetentna citološka djelatnost

1.1. Kadrovski uvjeti: 1. specijalist citolog, iznimno specijalist druge specijalnosti (hematoonkolog ili hematopatolog) s poslijediplomskim iz kliničke citologije koji radi citologiju; 2. citotehnolozi

1.2. Citodiagnostika: standardna morfologija, citokemija, imunocitokemija, mogućnost pohrane uzorka („banka tumora“)

2. Dodatna dijagnostika iz citološkog uzorka: imunofenotipizacija na protočnom citometru, citogenetska dijagnostika, molekularna dijagnostika, mikrobiološka dijagnostika

3. Patohistološka analiza

4. Znanstvena i istraživačka djelatnost

Smjernice za ispunjavanje uputnice za citomorfološku analizu, te standardi za broj i način pripreme citoloških uzoraka za citološke analize

1. Postupak uzimanja citoloških uzoraka – koštane srži, limfnih čvorova, slezene, razmaza periferne krvi

1.1. Indikacije za citološku punkciju postavlja kliničar i/ili citolog. Uputnica za citološku analizu mora sadržavati osnovne podatke o bolesniku (godine, spol, uputnu dijagnozu) i po mogućnosti anamnestičke i laboratorijske i/ili druge podatke vezane uz uputnu dijagnozu.

1.2. Postupak citološke punkcije: citološku punkciju koštane srži, limfnih čvorova i slezene rade specijalisti citolozi i/ili kliničari. Punkcija se izvodi uz informirani pristanak bolesnika poštujući osnovna načela (sterilnost zahvata, lokalnu anesteziju, upotrebu jednokratnih igala itd.).

1. Priprema razmaza za standardne, citokemijske i imunocitokemijske analize

1.1. Iz punktata koštane srži radi se 10-15 razmaza na predmetnim stakalcima s matiranim rubom (preporuča se) koji se suše na zraku za standardne analize, citokemijske analize i imunocitokemijske analize.

1.2. Stakalca se označavaju (na matiranom rubu) rednim brojem prema knjizi protokola te inicijalima (prva dva slova imena i prezimena ili slično).

1.3. Kada su potrebne analize FISH, PCR in situ itd. koriste se posebna stakalca i slijede upute za pohranu i čuvanje uzorka do momenta analize.

1.4. Iz punktata limfnih čvorova i slezene uzima se najmanje 5 razmaza, daljnji postupak isti kao kod koštane srži.

1.5. Uz uzorce koštane srži i limfnog tkiva **obavezno** je uzeti najmanje 6 razmaza periferne krvi.

Slijedi tekst s prijedlogom citomorfološkog dijagnostičkog algoritma akutnih leukemija, te dodatnim dijagnostičkim analizama koje je potrebno učiniti iz uzorka koštane srži, limfnog tkiva kod bolesnika s akutnom leukemijom.

Prijedlog dijagnostičkih postupaka za akutne leukemije

1. Dijagnoza bolesti

1.1. Hematološke vrijednosti krvne slike i razmaz periferne krvi.

1.2. Citomorfologija koštane srži, analizira se: a) postotak blasta; b) citomorfologija blasta, (postotak Auerovih štapića); c) postotak eritroblasta; d) postotak monocita; e) postotak eozinofila (morphološke promjene eozinofila); f) postotak bazofila; g) dishematopoeza (disgranulopeza: hipogranularnost, nepravilna - pseudo Chediak granula, Aureovi štapići, pseudo Pelger-Heut anomalija jezgre; diseritropoeza: megaloblastoidna struktura jezgre, brojnijinezrelioblici, bi-imultinuklearne jezgre, nepravilne jezgre; distrombopoeza: veliki atipični megakariociti, mikromegakariociti (u broju megakariocita), mononuklearne i binuklearne forme.

1.3. Citomorfologija periferne krvi i likvora.

1.4. Citokemija, analizira se postotak pozitivnih blasta i opis reakcije: mijeloperoksidaza, sudan-reakcija, nespecifična esteraza, nespecifična esteraza s inhibicijom s natrijevim fluoridom, toluidin, ne-hemoglobinsko željezo (postotak sideroblasta, prstenastih sideroblasta i siderofaga), PAS, kisela fosfataza).

1.5. Imunocitokemija - kada se ne može učiniti imunofenotipizacija na protočnom citometru ili kada se nalazi tumorski oblik bolesti bez blasta u perifernoj krvi:

- 1) diferencijacija nediferenciranih malignih stanica (LCA, vimentin, citokeratin, EP4, MOC31, biljeg melanocita, neurofilamenti, NSE, dezmin);
- 2) mijeloidni i limfoidni biljezi (CD2, CD3, CD10, CD19, CD4, CD8, mijeloperoksidaza, CD68, lizozim, glikoforin A, megakariocitni biljezi- CD42, CD41, CD61, CD56, PML protein (AML-M3)

1.6. Uzimanje citoloških uzoraka za dodatnu dijagnostiku:

- a) imunofenotipizaciju,
- b) citogenetsku analizu i
- c) molekularnu analizu.

1.7. Prema indikaciji kliničara i/ili citologa histologija koštane srži po patohistološkim algoritmima.

1.8. Citomorfologija i imunofenotipizacija limfnog čvora ako je prisutna limfadenopatija, prema indikaciji kliničara i/ili citologa PHD limfnog čvora po patohistološkim algoritmima

Citološki nalaz obuhvaća mijelogram, diferencijalnu krvnu sliku te interpretaciju svih upotrebljenih metoda sa završnim mišljenjem, odnosno klasifikacijom po FAB-u i po WHO (ukoliko je to moguće). Ukoliko završno mišljenje nije moguće definirati preporučiti dodatne dijagnostičke analize.

2. Praćenje bolesti i detekcija minimalne ostatne bolesti

1. Hematološke vrijednosti krvne slike i razmaz periferne krvi.
2. Citomorfologija koštane srži.
3. Imunocitokemija - PML protein kod AML-M3.
4. Uzimanje citoloških uzoraka za dodatnu dijagnostiku:
 - a) imunofenotipizacija koštane srži ako postoji aberantni imunofenotip kod postavljanja dijagnoze bolesti;
 - b) citogenetska analiza koštane srži ako su citogenetske promjene nađene kod postavljanja dijagnoze i
 - c) molekularna analiza koštane srži ako su molekularne promjene nađene kod postavljanja dijagnoze.

3. Ponovna akutizacija bolesti

1. Hematološke vrijednosti krvne slike i razmaz periferne krvi.
2. Citomorfologija koštane srži.
3. Citokemijska i/ili imunocitokemijska analiza kao kod dijagnoze (po procjeni - ovisno o morfologiji blasta).
4. Uzimanje citoloških uzoraka za dodatnu dijagnostiku (po procjeni - ovisno o morfologiji blasta).

Citomorfologija i dodatne tehnologije iz citološkog uzorka u dijagnostičkom algoritmu povećanog limfnog čvora

Ika Kardum-Skelin¹, Dunja Šušterčić¹, Biljana Jelić-Puškarić¹, Iris Fabijanić¹, Marina Milas¹, Zoran Šiftar¹, Mirjana Mariana Kardum Paro¹, Rajko Kušec², Ružica Lasan-Trčić³, Hrvoje Minigo⁴, Slobodanka Ostojić-Kolonić⁴, Ana Planinc-Peraica⁴, Radovan Vrhovac⁴, Delfa Radić-Krišto⁴, Branimir Jakšić⁴

¹Klinička bolnica Merkur, ²Klinička bolnica Dubrava, ³Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

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

Laboratorij za citologiju i hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti

Klinička bolnica Merkur

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

Citološke pretrage pripadaju u skupinu morfoloških, neagresivnih ili minimalno invazivnih pretraga, jednostavnih za izvođenje i za bolesnika. Uz to su vrlo pouzdane, s prednošću prema srodnim dijagnostičkim postupcima, jer pružaju brzu orijentaciju i sigurnu dijagnozu, pri čemu štede i vrijeme i novac (1).

Za punkciju limfnih čvorova u načelu nema kontraindikacije, a dostupni su joj svi povećani limfni čvorovi. Osim površnih, dostupnih palpaciji, mogu se punktirati i duboki (abdominalni ili mediastinalni) uz pomoć ultrazvuka, kompjuterizirane tomografije, magnetske rezonance ili endoskopskih instrumenata. Citološka punkcija, naročito kod imunokompromitiranih bolesnika (npr. HIV pozitivnih) je manje rizična od kirurškog zahvata, a smanjena je i rizičnost infekcije za osoblje koje vrši zahvat (1).

Povećani limfni čvor je za bolesnika, kliničara i citologa idealan model kada se iz uzorka dobivenog citološkom punkcijom na osnovu citomorfologije i dodatnih tehnologija s velikom sigurnošću može odvojiti nemaligni od malignog procesa, gdje u stvari leži i najveća odgovornost citologa. Limfatično tkivo je ograničeno u svojim mogućnostima morfoloških reakcija na različite žive uzročnike, njihove produkte (toksine) ili pak kemijske tvari ili druga štetna djelovanja koja su najčešće uzročnici benignih limfadenopatija. To znači da će morfološki sličan tip upalne reakcije ili hiperplazije imati više kliničkih i etioloških entiteta (1,2). Različite dodatne laboratorijske tehnike mogu pomoći u prevladavanju limitirane morfologije te dobivanju sigurne dijagnoze limfoma. Primarna uloga citologije je u dijagnozi reaktivnih hiperplazija, infekcija, granulomskih i metastatskih procesa (1).

Maligni limfomi su heterogena grupa

monoklonalnih neoplastičnih bolesti podrijetla imunog sistema. Različiti tipovi limfoidnih neoplazmi predstavljaju akumulaciju stanica zamrznutih na različitim stupnjevima njihove normalne diferencijacije. Svaki pojedini tip B-stanične neoplazme predstavlja stadij na kojem je daljnja diferencijacija "zamrznuta" (1). Različiti tipovi NHL-a mogu imati sličnu morfologiju s velikim varijacijama u podrijetlu, imunofenotipu i ostalim biološkim karakteristikama.

Najčešće upotrebljavane dodatne tehnologije u dijagnostici limfoma su protočna citometrija, imunocitokemija, lančana reakcija polimeraze (polymerase chain reaction - PCR), konvencionalna citogenetika i/ili FISH (fluorescent in situ hybridization) te kinetičke metode (DNA citometrija). Laserska citometrija (laser scanning cytometry - LSC) i DNA mikročipovi (DNA microarray) su još uvijek u istraživačkoj fazi (1,2).

Imunocitokemijska analiza igra veliku ulogu u dijagnostici i subtipizaciji malignih limfoma, kao i u diferencijalnoj dijagnozi prema slabo diferenciranim tumorima drugog staničnog podrijetla. Imunocitokemijskim analizama na razmazima punktata moguće je pomoći staničnih biljega odvojiti Hodgkinov limfom (Slika 1.) od anaplastičnog limfoma velikih stanica (anaplastic large cell lymphoma – ALCL), a u slučaju non-Hodgkinova limfoma subtipizirati B i T staničnost (Slika 2a, 2b i 2c.). Ako se radi o slabo diferenciranim tumorima drugog staničnog podrijetla, postoji čitav niz staničnih biljega čijom je kombinacijom moguće pobliže reći da li se radi o nelimfoidnim neoplazmama epitelnog, neuroendokrinog, histiocitnog, glatkomštićnog, poprečnoprugastog, embronalnog itd. podrijetla (3).

Protočna citometrija pomaže u odvajanju reaktivnih hiperplazija i malignih limfoma određivanjem klonalnosti limfatičnih stanica (restrikcija lakošća lanaca kappa/lambda); u subtipizaciji limfoma određivanjem diferencijacijskog statusa limfatičnih stanica (1) (Slika 2d.) te procjeni proliferacijskog statusa određivanjem proliferacijskih antigena i količine DNA.

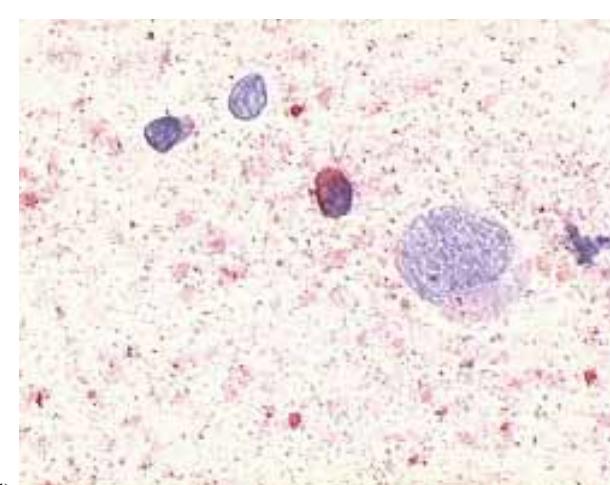
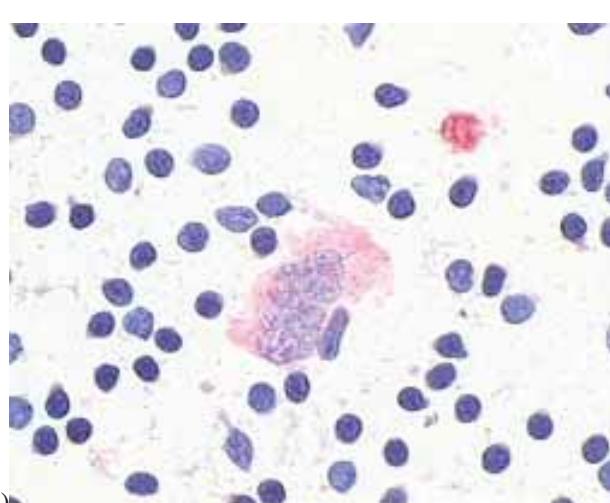
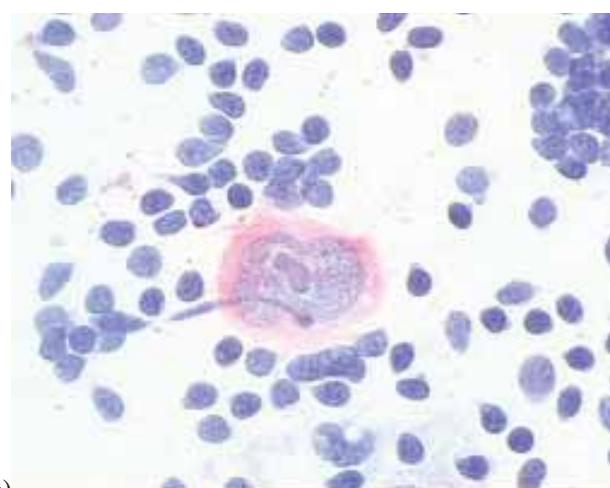
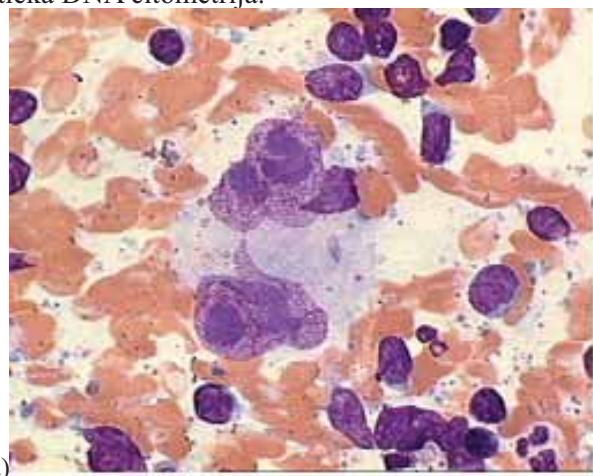
Razne preuređbe gena malignih stanica mogu se analizirati lančanom reakcijom polimeraze (*polymerase chain reaction – PCR*) (Slika 2e.). Vrlo je korisna informacija o preuređbi gena za imunoglobulinske lanci: teške (*immunoglobulin high chain – IgH*) ili luke (*immunoglobulin light chain – IgL*), ili pak preuređbi gena za receptore T limfocita (*T-cell receptor – TCR*) što govori u prilog B ili T klonalnosti limfatičnih stanica te uz citomorfološku sliku u većini slučajeva i za dijagnozu malignih limfoma.

Kromosomske promjene se mogu identificirati konvencionalnom citogenetikom (Slika 2f), PCR-om (Slika 2g.) ili FISH-om, a važne su u dijagnozi, subklasifikaciji te u prognostičkoj procjeni limfoma. Primarni kromosomski poremećaji mogu biti specifični ili nespecifični za pojedini subtip.

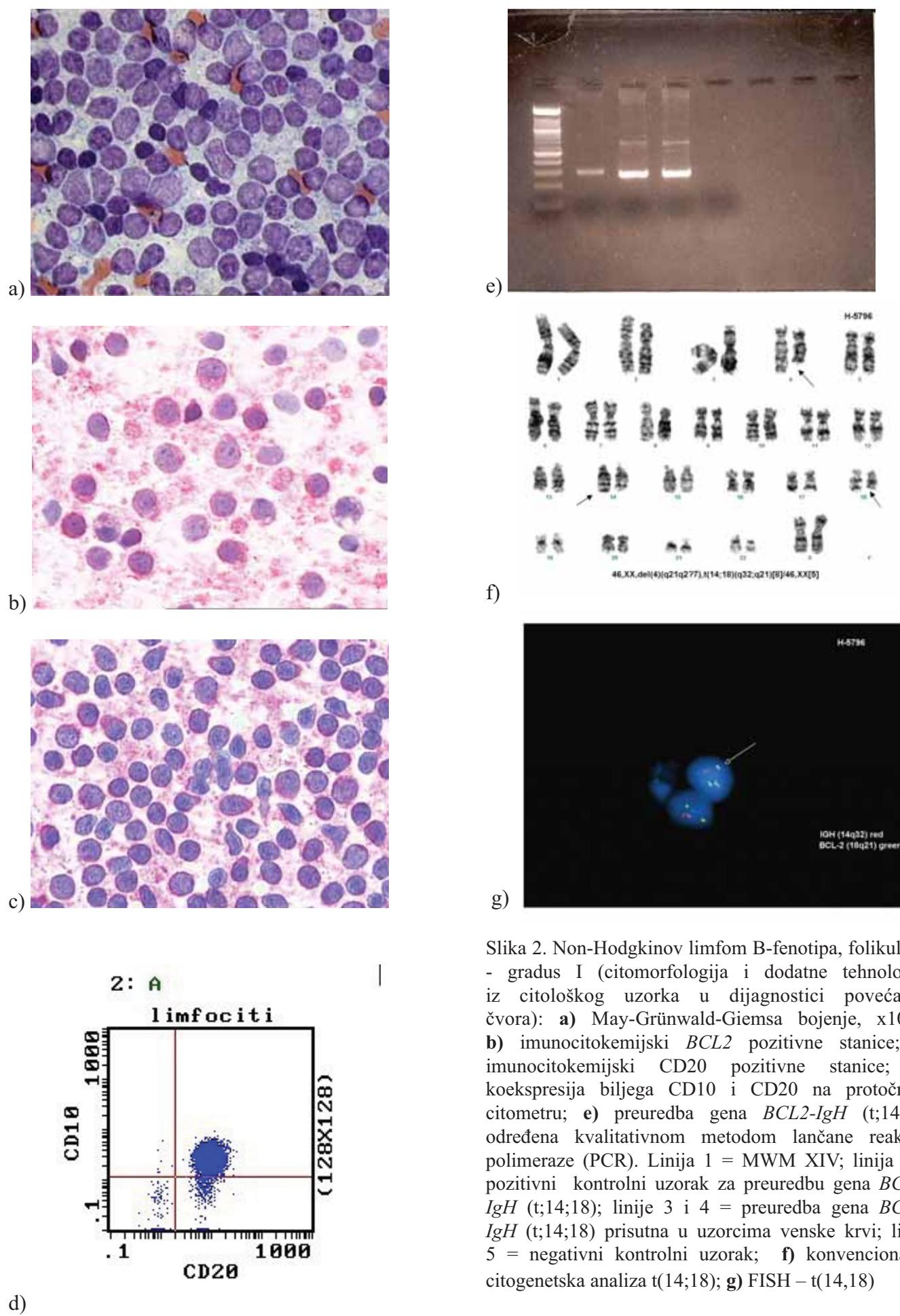
Mnogi parametri i osobitosti stanica su prihvatljivi za digitalnu analizu u svrhu određivanja kinetike i proliferacijskog statusa limfoma (1): određivanje količine DNA, kvantifikacija imunocitokemijskog bojenja (denzitometrija), određivanje proliferacijskog statusa (Ki-67, osobine AgNOR-a) (Slika 3.).

Algoritmi za dijagnostiku povećanog limfnog čvora uključuju citološku punkciju kao prvu dijagnostičku metodu, nakon čega slijede ranije opisane dodatne tehnologije (Slika 4.). Korelacija kinetičkih parametara (proliferacijskih markera, analize AgNOR-a, DNA ploidije na razmazima obojenim Feulgenom itd.) uz određivanje pregradnje gena u maloj količini DNA i testiranje onkogena ili tumor suspresorskih gena kao C-myc i p53, sa stupnjem malignosti limfoma, predstavlja budućnost sigurnog potpunog dijagnostičkog i prognostičkog profila limfoma na maloj količini stanica dobivenoj citološkom punkcijom (1). Postavlja se pitanje hoće li povećanje upotrebe citološke punkcije u primarnoj dijagnozi i klasifikaciji limfoma rezultirati gubitkom arhivskog tkiva limfnih čvorova za komplementarne analize, reklasifikacije i/ili daljnja istraživanja? Zaključak je da citološka punkcija igra veliku ulogu u odvajanju malignih od benignih limfadenopatija, naročito metastatskih promjena. Kada se citološki dokaže limfom kod prve obrade, potrebna je eksicija i patohistološka analiza. U slučajevima relapsa, određivanja proširenosti bolesti i detekcije minimalne rezidualne bolesti, citološki uzorak upotpunjeno dodatnim tehnologijama je sasvim dostatan za dijagnozu (4).

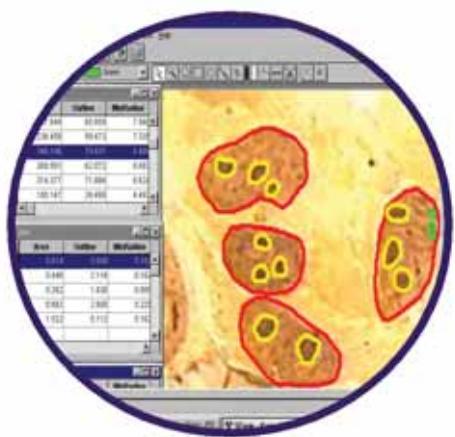
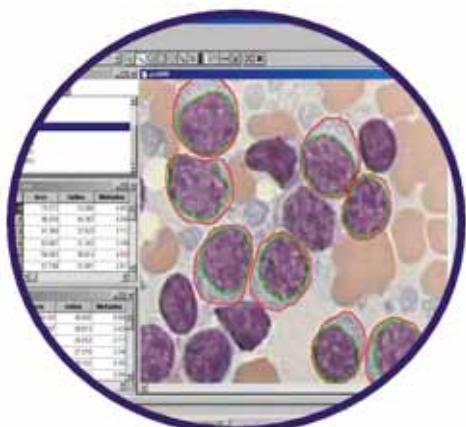
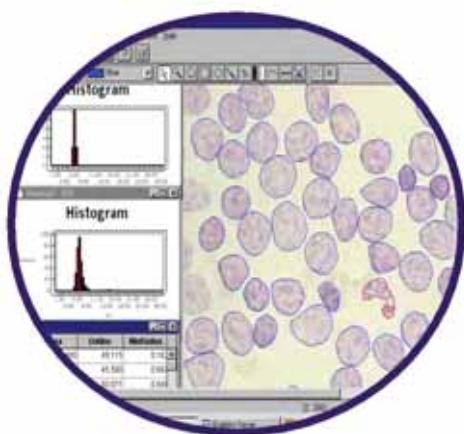
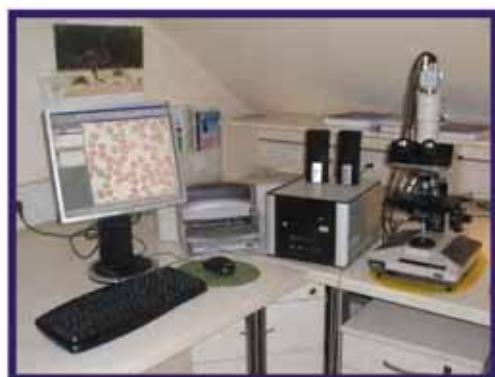
U zaključku se može reći da je minimum u citološkoj dijagnostici povećanog limfnog čvora standardna morfologija. Optimum je uz citomorfologiju (naročito u dijagnostici malignih limfoma) određivanje klonalnosti B-limfocita na protočnom citometru, imunocitokemijsko određivanje staničnih biljega na razmazima, citogenetska analiza te određivanje preuređbe gena PCR-om. Za istraživanje ostaje određivanje proliferacijskog statusa (Ki-67, AgNOR) te staticka DNA citometrija.



Slika 1. Hodgkinov limfom: a) May-Grünwald-Giemsa bojenje, x1000; b) CD30 pozitivna Reed-Sternbergova stanica; c) CD15 pozitivna Reed-Sternbergova stanica; d) CD3 negativna atipična stanica

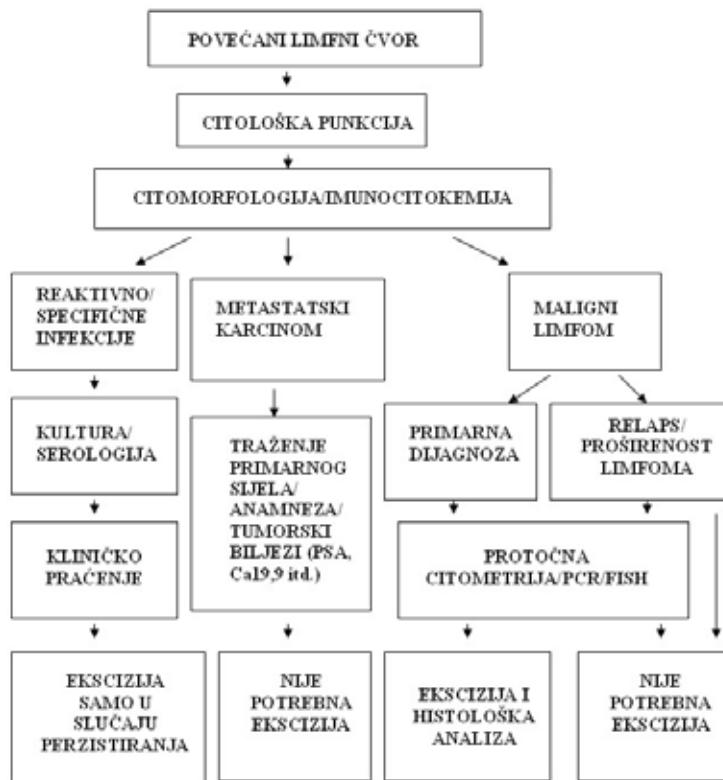


Slika 2. Non-Hodgkinov limfom B-fenotipa, folikularni - gradus I (citomorfologija i dodatne tehnologije iz citološkog uzorka u dijagnostici povećanog čvora): **a)** May-Grünwald-Giemsa bojenje, x1000; **b)** imunocitokemijski *BCL2* pozitivne stanice; **c)** imunocitokemijski *CD20* pozitivne stanice; **d)** koekspresija biljega *CD10* i *CD20* na protočnom citometru; **e)** preuredba gena *BCL2-IgH* (*t*;14;18) određena kvalitativnom metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). Linija 1 = MWM XIV; linija 2 = pozitivni kontrolni uzorak za preuredbu gena *BCL2-IgH* (*t*;14;18); linije 3 i 4 = preuredba gena *BCL2-IgH* (*t*;14;18) prisutna u uzorcima venske krvi; linija 5 = negativni kontrolni uzorak; **f)** konvencionalna citogenetska analiza *t*(14;18); **g)** FISH – *t*(14;18)



Slika 3. Kompjuterska „image“ analiza: a) aparatura, b) statička DNA citometrija, c) morfometrija, d) regije nukleolarne organizacije - AgNOR

Slika 4. Dijagnostički algoritam kod povećanog limfnog čvora prema Kocjan G. J Clin Pathol. 2005. (4)



LITERATURA:

1. Kardum-Skelin I, Fabijanić I, Jelić-Puškarić B, Šiftar Z, Kardum Paro MM, Lasan-Trčić R, Mahovlić V, Kušec R, Seili-Bekafigo I. Jedna stanica - konačna dijagnoza! Gde prestaje struka i počinje umjetnost? *Acta Med Croatica* 2008;62(4): 334-349.
2. Kardum-Skelin I. Može li citomorfologija i dodatne tehnologije iz citološkog uzorka zamijeniti patohistološku dijagnozu malignih limfoma u bolesnika oboljelih od AIDS-a. Knjiga sažetaka 7. Simpozija o spolno prenosivim bolestima i urogenitalnim infekcijama. Opatija: Hrvatsko društvo za urogenitalne i spolno prenosive infekcije HLZ-a, Klinika za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ Zagreb; 2005, str. 8-9.
3. Znidarčić Ž, Črepinko I, Jeren T, Roglić M, Nakić M, Marković-Glavaš D, Kraljić I, Kardum-Skelin I. Uloga kliničara u citološkoj dijagnozi. *Lijec Vjesn.* 2002;124(11-12):360-365.
4. Kocjan G. Best Practice No 185. Cytological and molecular diagnosis of lymphoma. *J Clin Path.* 2005; 58:561-567.
5. Saboorian MH, Ashfaq R. The use of fine needle aspiration biopsy in the evaluation of lymphadenopathy. *Semin Diagn Pathol.* 2001;18(2):110-123.
6. Kardum-Skelin I. Morfometrijski i kinetički parametri kao dijagnostički i prognostički čimbenici leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti (dizertacija) Zagreb: Medicinski fakultet; 2008, str. 160.
7. Dey P. Role of ancillary techniques in diagnosing and subclassifying non-Hodgkin's lymphomas on fine needle aspiration cytology. *Cytopathology.* 2006;17(5):275-287.
8. Mathiot C, Decaudin D, Klijanienko J, Couturier J, Salomon A, Dumont J, Vielh P. Fine-needle aspiration cytology combined with flow cytometry immunophenotyping is a rapid and accurate approach for the evaluation of suspicious superficial lymphoid lesions. *Diagn Cytopathol.* 2006;34(7):472-478.
9. Zeppa P, Marino G, Troncone G, Fulciniti F, De Renzo A, Picardi M, Benincasa G, Rotoli B, Vetrani A, Palombini L. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. *Cancer.* 2004;102(1):55-65.
10. Katz R.L. Cytologic Diagnosis and Leukemia and Lymphoma. Values and Limitation. *Clin Lab Med* 1991; 11:469-499.

Usporedba morfoloških i citogenetskih promjena stanica kod bolesnika s AML sa znacima mijelodisplazije

Dr. Koraljka Gjadrov Kuveždić
Dr. Sunčica Ries

Zavod za citologiju, Klinički zavod za patologiju i citologiju Klinički bolnički centar Zagreb
E-pošta: gjadrov@yahoo.co.uk, sun77ries@yahoo.com

UVOD: Klasifikacija mijeloidnih i limfoidnih neoplazmi Svjetske zdravstvene organizacije snizila je kriterij postavljanja dijagnoze akutne leukemije na više od 20% blasta u razmazu koštane srži. Entitet refraktorne anemije s viškom blasta u transformaciji (RAEB-t) time je svrstan u skupinu akutnih mijeloičnih leukemija sa znacima mijelodisplazije (AML-MDS), novoprepoznati podtip. Kriterij postavljanja dijagnoze podrazumijeva displaziju dvije ili više mijeloidnih linija koja mora biti prisutna u više od 50% stanica pojedine linije. Cilj našeg istraživanja bio je usporediti morfološke promjene stanica na uzorcima koštane srži bolesnika s novootkrivenom AML sa znacima mijelodisplazije s rezultatima citogenetskih analiza na uzorcima koštane srži istih bolesnika.

BOLESNICI I METODE: U istraživanje je u periodu 2000-2008. godine bilo uključeno 50 bolesnika s *de novo* AML-MDS, 26 s brojem blasta 20-29%, te 24 s brojem blasta iznad 30%. Uzorci koštane srži analizirani su citomorfološki May-Gruenwald Giemsom i standardnim citokemijskim reakcijama (MPO, Sudan Black, PAS, ANAE s inhibicijom Na-fluoridom), a citogenetski tehnikom G-pruganja i fluorescentnom *in situ* hibridizacijom (FISH), probama za -5q/5, -7q/7, -8/8. Intenzitet citomorfoloških promjena prikazan je semikvantitativno, gdje je promjenama u svakoj lozi pridružen jedan bod. Disgranulocitopoeza (hipogranuliranost, pseudo Pelger-Huet anomalija, bizarno lobulirane jezgre), diseritrocitopoeza (megaloblastoidni, bi- i multinuklearni eritroblasti, te pupanje jezgara) i distrombocitopoeza (mikromegakariociti, hipolobulirani i megakariociti odvojenih jezgara) mogu dobiti najviše tri boda, a pridruženi "zbroj" (engl. "score") pojedinog bolesnika može iznositi 2-9 (Slike 1-8.).

REZULTATI: Neovisno jesu li pripadali skupini 20-29% blasta ili iznad 30% blasta, 36 bolesnika imalo je AML-MDS s dvolinijskom displazijom, u 34 slučaja sa "zbrojem" 2-3, u dva slučaja sa "zbrojem" 4-9. 14 bolesnika imalo je AML-MDS sa trilinijskom displazijom, u jednom slučaju sa "zbrojem" 2-3, u 13

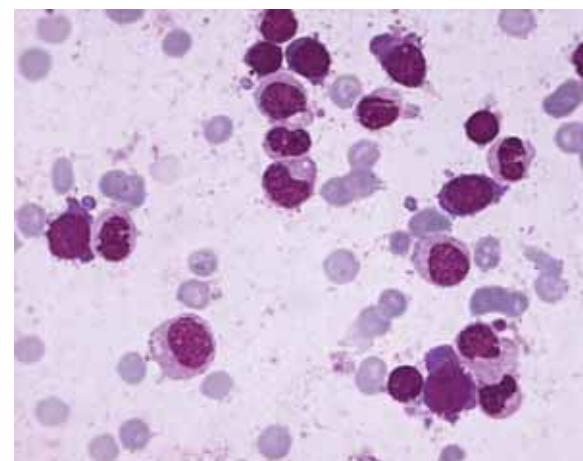
slučaja 4-9 (Tablica 1.). 22 bolesnika imali su uredan kariotip, dok u tri bolesnika nije zabilježen rast. 25 bolesnika imali su izmijenjen kariotip, u 18 slučajeva nebalansiranu promjenu, u 3 slučaja balansiranu promjenu, a kompleksan kariotip u 4 bolesnika. Sva 4 bolesnika s kompleksnim kariotipom imali su nizak "zbroj" (2-3), i dvo- i višegodišnje preživljene.

	Bolesnici s 20-29% blasta	Bolesnici s $\geq 30\%$
	BLD 16	BLD 20
-	Score 2-3 15	Score 2-3 19
-	Score 4-9 1	Score 4-9 1
	TLD 10	TLD 4
-	Score 2-3 1	Score 2-3 0
-	Score 4-9 9	Score 4-9 4

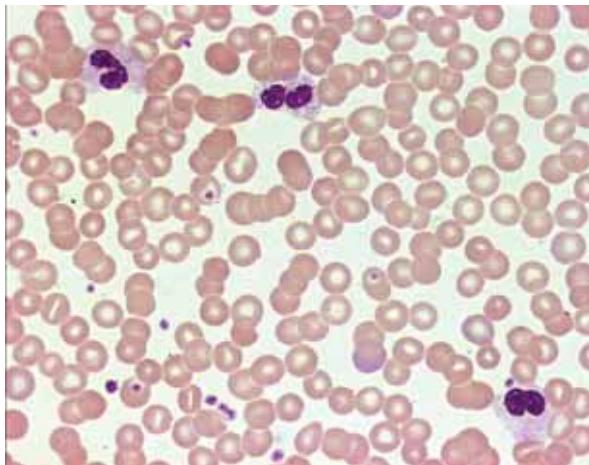
Tablica 1. Usporedba "zbroja" (engl. "score") bolesnika s bilinijskom i trilinijskom displazijom.

- **36 bolesnika-BLD (displazija u 2 stanične linije)**
- **14 bolesnika-TLD (displazija u 3 stanične linije)**

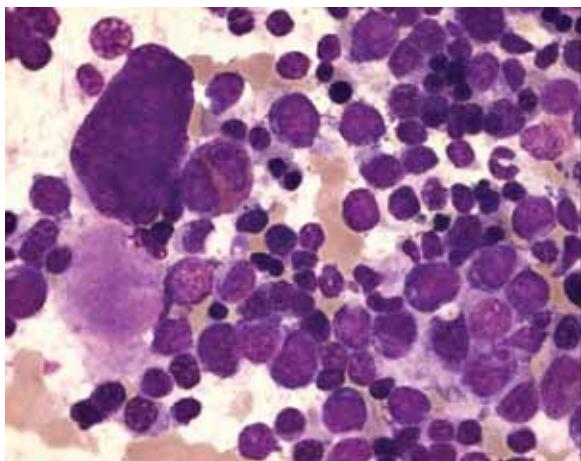
ZAKLJUČAK: Iz našeg istraživanja zaključili smo da, neovisno radi li se o skupini bolesnika s brojem blasta 20-29% ili onoj s brojem blasta više od 30%, izražajnost morfoloških promjena ne prati jačinu promjena u kariotipu. Za prognostičko značenje izražaja morfoloških promjena potrebno ih je usporediti s izražajem ne samo citogenetskih već i molekularnih promjena.



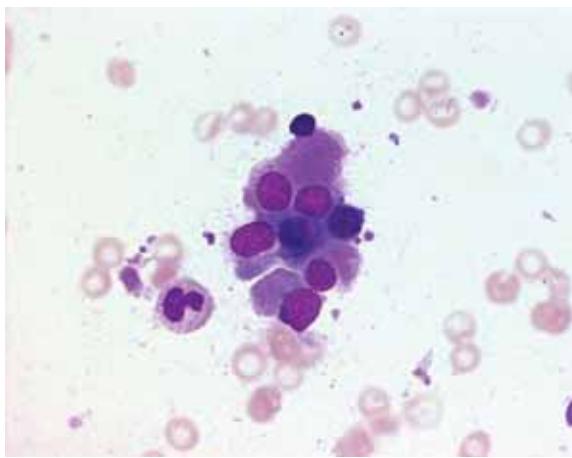
Slika 1. Hipogranuliranost



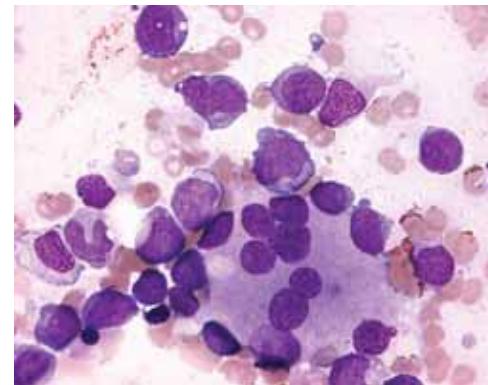
Slika 2. Pseudo Pelger-Huet anomalija



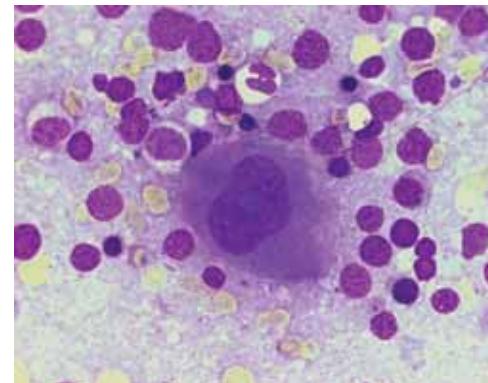
Slika 3. Bizarno lobulirane jezgre



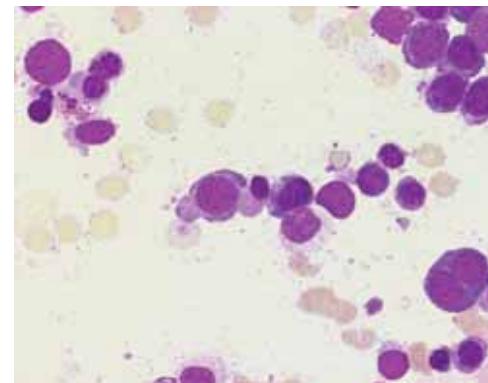
Slika 4. Mikromegakariociti



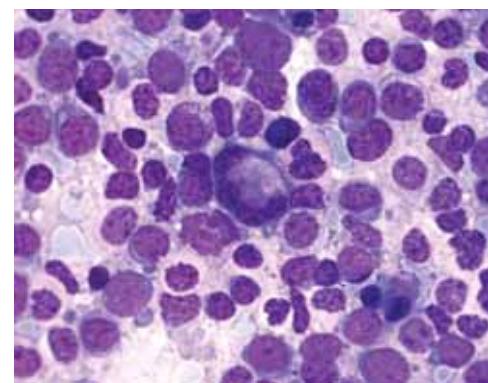
Slika 5. Megakariociti brojnih odvojenih jezgara



Slika 6. Hipolobulirani megakariociti



Slika 7. Megaloblastoidni eritroblasti, pupanje



Slika 8. Bi- i multinuklearni eritroblasti

Klofarabin u liječenju pedijatrijskih bolesnika s akutnom leukemijom u relapsu ili s refraktornom leukemijom

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

Odjel za hematologiju i onkologiju

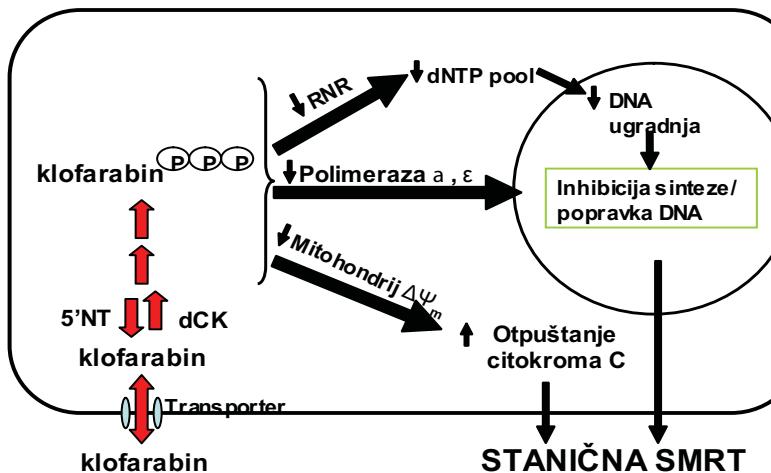
Klinika za dječje bolesti Klinički bolnički centar Rijeka i Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

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

Leukemija je najčešća maligna bolest u djece. Zahvaljujući napretku u terapiji, danas se postiže izlječenje u 80% djece s akutnom limfatičnom leukemijom (ALL) i 50% djece s akutnom mijeloičnom leukemijom (AML). Unatoč ovim impresivnim rezultatima, pedijatrijski bolesnici s refraktornom leukemijom ili relapsom, osobito ranim medularnim, imaju lošu prognozu. Stoga se ulažu kontinuirani napor u pronašlaku novih antileukemijskih lijekova i terapijskih pristupa u pedijatrijskim refraktornim i relapsnim leukemijama.

Klofarabin je analog purinskih nukleozida druge generacije koji citotoksični učinak ostvaruje putem tri mehanizma: inhibicijom ribonukleotid reduktaze, inhibicijom DNA polimeraze te direktnim i indirektnim oštećenjem mitohondrija s posljedičnim otpuštanjem citokroma i drugih proapoptotskih mitohondrijskih proteina (Slika 1.).

Klofarabin – Mehanizam djelovanja



Slika 1. Predloženi mehanizam djelovanja klofarabina.
NT = nukleotidaza; dCK = deoksicitidin kinaza; RNR = ribonukleotid reduktaza; dNTP = deoksinukleozid trifosfat

Klofarabin je status lijeka za posebno rijetke bolesti (engl. "orphan drug") dobio 2002. godine. U prosincu 2004. godine odobren je u SAD-u od FDA (Food and Drug Administration), a u svibnju 2006. godine u EU od EMEA (European Medicines Agency) za liječenje bolesnika od 1 do 21 godine starosti s refraktornom ALL ili s relapsom ALL koji su prethodno primili najmanje dva kemoterapijska protokola. Klofarabin je jedini citostatik koji je dobio primarnu indikaciju za liječenje u

pedijatrijskoj populaciji.

Prva faza 1 kliničkog ispitivanja u djece (Jeha S. i sur.) provedena je u M.D. Anderson centru u Houstonu u 25 bolesnika (17 ALL i 8 AML) u dobi od 1 do 19 godina. Najveći dio bolesnika prethodno je liječen multiplim kemoterapijama, od kojih je devetoro (4 ALL i 5 AML) transplantirano. Kompletna remisija je postignuta u 5 bolesnika (4 ALL i 1 AML) i parcijalna remisija u troje (1 ALL i 3 AML), sa sveukupnim odgovorom od 32%. Srednje trajanje remisije bilo je dulje od jedne godine. Multicentrično kliničko ispitivanje Faze 2 (Jeha S. i sur.) obuhvatilo je 61 pedijatrijskog bolesnika (1 do 20 godina) s refraktornom ili relapsnom ALL. U trećine bolesnika prethodno je učinjena najmanje jedna alogena transplantacija koštane srži, a 57% je bilo rezistentno na posljednju kemoterapiju. Klofarabin je primijenjen u dozi 52 mg/m^2 kroz 5 dana; ciklusi su ponavljani svakih 2 do 6 tjedana do ukupno 12 ciklusa. Odgovor je postignut u 30% bolesnika: 7 kompletne remisije, 5 kompletne remisije bez oporavka broja trombocita i 6 parcijalne remisije. Duljina remisije je bila dovoljna da omogući nastavak liječenja transplantacijom koštane srži u 9 bolesnika. Srednje trajanje remisije bilo je 7 mjeseci. Najčešće zabilježene nuspojave stupnja ≥ 3 bile su febrilna neutropenija, anoreksija, hipotenzija i mučnina. U fazi 2 kliničkog ispitivanja u 42 pedijatrijska bolesnika s refraktornom ili relapsnom AML (Jeha S. i sur. ASH 2006.) postignut je odgovor u 26% djece. U europskoj

multicentričnoj studiji (faza 2, BIOV-111, Kearns P. i sur.) u 65 djece s refraktornom/relapsnom ALL postignut je odgovor u 28% bolesnika. Ukratko, sva navedena ispitivanja faze 1 i faze 2 u pedijatrijskih bolesnika s visokorezistentom leukemijom ili multiplim relapsima ALL i AML potvrdila su učinkovitost klofarabina kao jedinog lijeka (engl. "single agent") s prihvatljivom toksičnosti.

Daljnja ispitivanja usmjerena su na kombinacije klofarabina s drugim lijekovima. U ispitivanju Hijiya N. i sur. (faza 1, ASH 2007) klofarabin je primijenjen u kombinaciji s ciklofosfamidom i etopozidom. U ispitivanje je uključeno 25 pedijatrijskih bolesnika s refraktornom leukemijom ili multiplim relapsima (20 ALL i 5 AML), a odgovor je postignut u 64% bolesnika: 10 kompletne remisije i 6 kompletne remisije bez oporavka broja trombocita. U tijeku je COG (Children's Oncology Group) studija o učinkovitosti kombinacije klofarabina i citarabina.

U zaključku, klofarabin je pokazao učinkovitost i sigurnost u heterogenoj populaciji djece s refraktornom leukemijom i ALL/AML u relapsu. Primijenjen kao jedini lijek, u 30% ovih bolesnika postiže remisiju i omogućuje nastavak liječenja transplantacijom koštane srži. Buduća istraživanja usmjerena su na kombinacije klofarabina s drugim citostaticima.

Primjena citokina u pedijatrijskoj onkologiji - antiangiogena terapija

Doc. dr. sc. Srđana Čulić, dr. med.

Klinika za dječje bolesti Klinički bolnički centar Split i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

E-pošta: srdjana.culic@st.htnet.hr

Citokini su polipeptidi ili glikopeptidi, pozitivni i negativni regulatori imunog odgovora. Oni su glasnici koji spadaju u vrlo važne čimbenike u komunikaciji između ljudskih stanica. Riječ *citokini* je izvedena iz dvije riječi grčkog podrijetla - "cytos", što znači stanica, i "kine", iz riječi "kinein", što znači micati se. U citokine spada grupa interleukina, čimbenika rasta i interferona. Interleukini su medijatori odgovorni za međusobno komuniciranje leukocita. Danas poznajemo 35 vrsta interleukina, koji se nazivaju od IL-1 do IL-35, čije su efektorske funkcije aktivacija i diferencijacija stanice, kemotaksija i proliferacija širokog spektra stanica. Oni modificiraju biološki odgovor stimulirajući proliferaciju i diferencijaciju limfocita T i B, NK stanica, makrofaga i dendritičnih stanica. Njihovo djelovanje regulirano je genima.

Imunoterapijski pristup liječenju malignih bolesti danas, kao kockica u mozaiku liječenja, uključuje imunomodulatorne citokine (čimbenik tumorske nekroze alfa, interferoni, interleukini -2, -12, -15, -18) i inhibitore angiogeneze, koji potiču antitumorsku aktivnost. Smatra se da će primjena novih citokina IL-21, IL-23, IL-27 s njihovim imunomodulatornim i antitumorskim efektom naći mjesta u budućim imunoterapijskim protokolima (1). U pedijatrijskoj onkologiji primjenjujemo danas različite limfokine i interferone, a naročito eritropoetin i čimbenike stimulacije rasta granulocita i makrofaga. Primjena rekombinantnog humanog eritropoetina (rHEpo) značajno popravlja kvalitetu života i uspjeh liječenja u djece s malignom bolesti (2). Prolongirana teška neutropenijska povećava rizik od smrti uzrokovanje teškim septičkim infekcijama što se događa kod 5% malih bolesnika. Primjena čimbenika rasta granulocita i makrofaga skraćuje trajanje neutropenijske bolesti, značajno ubrzava hematološki oporavak i izlječenje.

Interferoni nastaju kao odgovor na virus, dvostruku RNA, antigene i mitogene, a razlikujemo alfa, beta i gama izoforme. Djeluju antimikrobično, imunomodulatorno, antiproliferativno uz poticanje diferencijacije stanica, kao i poticanje apoptoze (3). Interferoni imaju proizvedeno antiviralno djelovanje i sudjeluju u eliminaciji virusa iz limfocita. Ovisno o tipu stanice koja ga proizvodi interferone dijelimo na IFN- α kojeg stvaraju leukociti, IFN- β kojeg stvaraju fibroblasti, IFN- γ kojeg stvaraju imunkompetentne stanice. Utječu na regulaciju stanične funkcije kao što je fagocitoza, ali i povećavaju citotoksičnost limfocita T (IFN- γ),

kao i aktivnost makrofaga i NK-stanica (4). IFN- α može se primijeniti kod djece s Hodgkin limfomom ili histiocitozom Langerhansovih stanica (LCH) ako imaju multisistemsku bolest (5).

Potpuni ili djelomični odgovor na liječenje IFN- α primjećen je kod bolesnika s astrocitomom, neuroblastom i ganglioneuroblastom. Kombinacija IFN- α s kemoterapijom poboljšava prognozu bolesti, a primjena IFN- α u fazi održavanja pomaže boljoj kontroli minimalne ostatne bolesti. Također je uspješno primjenjen intralezionalno u liječenju velikih hemangioma naročito onih koji ugrožavaju život djeteta (6).

IFN- γ je najvažniji proinflamatorni citokin odgovoran za aktivaciju i reguliranje fagocitne funkcije mononuklearnih stanica. Rekombinantni interferon gama (USA Actimunne) ima antineoplastične, imunoregulatorne i antiviralne sposobnosti.

IL-3 može stimulirati proliferaciju i diferencijaciju pluripotentnih krvotvornih matičnih stanica, kao i različitih hematopoetskih progenitora. Mobilizacija perifernih krvotvornih matičnih stanica može se uspješno napraviti primjenom kombinacije IL-3 i GM-CSF-a. Interleukin-12 je odlučujući čimbenik urođenog i stečenog imunosnog odgovora. Sam po sebi može potaknuti snažan antitumorski učinak djelujući sinergistički s nekoliko drugih citokina.

Talidomid i njegovi analozi lenalidomid, Revlimid, ACTIMID stimuliraju humani imunosni sustav inhibirajući brojne citokine kao što su TNF- α , IL-1 β , IL-6, -12 i GM-CSF. Mogu inducirati proliferaciju limfocita T, poticati stvaranje citokina IL-2 i IFN- γ te na taj način povećavati antitumorsku aktivnost limfocita T. Također stimuliraju makrofage i NK stanice. Antiangiogeni i proapoptotski efekt primjene ovih preparata pokazao se efikasan kod dobro vaskulariziranih tumora inhibirajući vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) (7).

Chintagumpala je proveo studiju kombinacije thalidomida s carboplatinumom u djece s refrakternim solidnim malignim tumorom (maligni gliom, meduloblastom, anaplastični ependimom, Ewingov sarkom, neuroblastom, angiosarkom, osteosarkom, nefroblastom). Studija je pokazala dobru podnošljivost u djece uz produženo održavanje stabilne bolesti (8).

Angiogeneza je proces nastajanja novih krvnih žila iz već postojećih, a završava nastankom arteriole ili venule. Angiogenezu potiču upala, cijeljenje rana, imunološki mehanizmi, te neoplazije, a sastavni je dio i metastaziranja malignih novotvorina.

Angiogeneza može biti fiziološka i patološka. Patološka angiogeneza nastaje kod patoloških stanja s neovaskularizacijom tkiva, kao što se događa kod malignih bolesti i rezultira progresijom istih. Nekontrolirana angiogeneza može doprinijeti rastu tumora i nastanaku metastaza. Tumor ne može rasti preko 1-2 mm³ ako nema krvnih žila jer mu nedostaje

kisik i nutrijenti, pa inducira rast krvnih žila tako što luči bFGF i VEGF i na taj način ekspandira. Angiogeneza je neophodna za prelaz bezazlenih nakupina stanice u opasne maligne bolesti i njenih metastaza.

Endotelne stanice se diferenciraju i migriraju u perivaskularni prostor pomažući formiranje tumora. VEGF ima najvažniju ulogu u formiranju krvnih žila, rastu i metastaziranju tumora pomoću angiogeneze pupanjem. Tumor poremeti ravnotežu između pro i anti angiogenih čimbenika. Inhibitori angiogeneze zaustavljaju proces angiogeneze. Pro i antiangiogeneza moraju biti u ravnoteži.

Tablica 1. Pozitivni i negativni regulatori angiogeneze

Pozitivni regulatori	Negativni regulatori
Čimbenik rasta fibroblasta	Trombospondin 1
Placentalni čimbenik rasta	Angiostatin
Vaskularni endotelni čimbenik rasta	Interferon alfa
Transformirajući čimbenik rasta	Prolaktin 16-kd fragment
Angiogenin	Inhibitori metaloproteinaze
Interleukin-8	Trombocitni čimbenik 4
Čimbenik rasta hepatocita	Genostein
Čimbenik rasta granulocita	Placental proliferin-related protein
Čimbenik rasta endotelnih stanica deriviranih iz trombocita	Transformirajući čimbenik rasta beta?
Angiopoetin 1	Endostatin

U slučaju da prevagne proangiogeneza nastaje ekscesivna neovaskularizacija. U tablici 1 navedeni su pozitivni i negativni regulatori angiogeneze.

VEGF ima presudnu ulogu u patološkoj i fiziološkoj angiogenezi i limfangiogenezi. Stimulira endotelne stanice na migraciju, diobu, formiranje cjevčica i štiti ih od apoptoze i starenja. Stimulira monocito/makrofagnu kemetaksiju, te ima učinak na limfocite, granulocitno-makrofagne progenitore, osteoblaste, epitelne stanice i neke tumorske stanice. Mijeloidne stanice iz koštane srži kao što su makrofazi, neutrofili, eozinofili, mastoidne stanice i dendritične stanice važni su regulatori stvaranja i održavanja krvnih žila u tumoru (9).

Povećanje ekspresije VEGF gena nađeno je kod rasta i invazije tumora kao i metastaziranja. Iznimno je važan u tumorskoj angiogenezi jer stimulira stanično preživljavanje, mitogenezu, migraciju, diferencijaciju i mobilizaciju endotelnih progenitorskih stanica. Povišena koncentracija serumskog VEGF-a nađena je u bolesnika s različitim tipovima karcinoma, što korelira s lošjom prognozom.

Primjena inhibitora tumorske angiogeneze povećava učinak primjenjene kemoterapije i

radioterapije. Liječenje tumora može biti vezano uz prirodne i sintetske inhibitore angiogeneze kao što su angiostatin, endostatin i tumstatin. Prva odobrena terapija koja ima za cilj inhibiciju angiogeneze je monoklonsko protutijelo protiv jedne od izoformi VEGF. Otkriće humaniziranog anti-VEGF protutijela, Avastin® (bevacizumab) za liječenje solidnih tumora potaklo je brojne studije u djece s refrakternim solidnim tumorima (neuroblastom, Ewing sarkom, progresivni primarni tumori mozga, abdomiosarkom). Dobro se podnosi i pokazuje antitumorsku aktivnost u prethodno liječene djece i mladim osoba s rekurentnim solidnim malignim tumorima. Kombinacija bevacizumaba s irinotekanom pokazala je aktivnost kod visoko rizičnih glioma i glioblastoma multiforme rezistentnih na kemoterapiju (10).

Potrebne su daljnje prospektivne studije da bi mogli evaluirati sigurnost i efikasnost citokina i antiangiogenih lijekova u pedijatrijskim bolesnikama.

Literatura

- Oniki S, Nagai H, Horikawa T, Furukawa J, et al. Interleukin-23 and interleukin-27 exert quite different antitumor and vaccine effects on poorly immunogenic melanoma. *Cancer Res* 2006;66(12):6395-6404.
- Shasha D, George MJ, Harrison LB. Once-weekly dosing of epoetin-alpha increases hemoglobin and improves quality of life in anemic cancer patients receiving radiation therapy either concomitantly or sequentially with chemotherapy. *Cancer* 2003;98(5):1072-1079.
- Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediator of apoptosis. *Apoptosis* 2003;8:237-249.
- Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I interferon in the T-cell response: implications for its clinical use. *Immunol Today* 1996;17:369-372.
- Culić S, Jakobson A, Culić V, et al. Etoposide as the basic and interferon-alpha as the maintenance therapy for Langerhans cell histiocytosis: a RTC. *Pediatr Hematol Oncol* 2001;18(4):291-294.
- Kaselas C, Tsikopoulos G, Papouis G, et al. Intralesional administration of interferon A for the management of severe haemangiomas. *Pediatr Surg Int* 2007;23(3):215-8.
- Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS J* 2005;7(1):E14-E19.
- Chintagumpala M, Blaney SM, Bomgaars LR, et al. Phase I and pharmacokinetic study of thalidomide with carboplatin in children with cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(21):4394-400.
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8(8):618-631.
- Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007;25:4722-4729.