




Acta

Medica

Croatica



Vol. 65 2011.
Suplement 1
Zagreb

UDC 61 • AMCREF 65
(Supl. 1)
1-244 (2011)
ISSN 1331-1638

ACTA MEDICA CROATICA

GLASILO AKADEMIJE MEDICINSKIH ZNANOSTI HRVATSKE
Journal of the Academy of Medical Sciences of Croatia,
Praška 2/III
10000 Zagreb
Croatia

Urednica – Editor-in-Chief
NASTJA KUČIŠEC-TEPEŠ

Gošća urednica – Guest Editor
IKA KARDUM-SKELIN

Tajnik – Editorial Assistant
ILIJA KUZMAN

Tehnička urednica – Editor
DUNJA BERITIĆ-STAHULJAK

Urednički odbor – Section Editors
Iva Alajbeg, Marko Banić, Nikolina Bašić Jukić, Iva Dekaris, Marko Duvnjak, Josip Djelmiš, Alenka Gagro, Josipa Kern, Petar Kes, Dragutin Košuta, Ratko Matijević, Zvonko Rumboldt, Adriana Vince

Predsjednica Uredničkog savjeta – Chief Council
JASNA LIPOZENČIĆ

Urednički savjet – Editorial Council
Mladen Belicza (Zagreb), Eugenija Cividini (Zagreb), Theodor Dürriegl (Zagreb), Vladimir Goldner (Zagreb), Hans Georg Fassbender (Mainz), Olga Jelić (Slavonski Brod), Tatjana Jeren (Zagreb), Vjekoslav Jerolimov (Zagreb), Anica Jušić (Zagreb), Eduard Klain (Zagreb), Luka Kovačić (Zagreb), Jan Murker (München), Vasilije Nikolić (Zagreb), M. William Novick (Memphis), Vlado Oberiter (Zagreb), Željko Reiner (Zagreb), Danijel Rukavina (Rijeka), Melita Valentić-Peruzović (Zagreb), Pietro Vajlo (Napoli), John Wallwork (Cambridge), Ljiljana Zergollern-Čupak (Zagreb), Željko Zupančić (Zagreb)

Adresa Uredništva – Address of the Editorial Board
ACTA MEDICA CROATICA
Akademija medicinskih znanosti Hrvatske
Praška 2/III
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel/fax: +385 1 46 40 586; E-mail: amzh@zg.t-com.hr

Časopis se tiska pet puta godišnje. Naručuje se neposredno od Uredništva. Godišnja pretplata u zemlji iznosi za ustanove 500,00 kn, za pojedince 150,00 kn, a uplaćuje se na broj računa 2360000-1101481831. Pretplata u inozemstvu iznosi protuvrijednost US \$ 150.- koju treba uplatiti na račun Privredna banka Zagreb, d.d. No. 70310998200-137182; Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 10 000 Zagreb, Praška 2/III, Hrvatska (za Acta Medica Croatica).

The Journal is published five4 times a year. Orders can be placed directly to our Editorial Office. The annual subscription in the country for institutions 500.00 kn, for individuals 150.00 kn to be paid to the account No. 2360000-1101481831; abroad: the equivalent of US \$150.- to be paid to our foreign currency bank account „Privredna banka Zagreb, d.d.“ No. 703109982800-137182; Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 10 000 Zagreb, Praška 2/III, Hrvatska (for Acta Medica Croatica).

Lektor – Lector
Antonija Redovniković

Omotna stranica – Cover design
Ivan Picelj

Tisak – Printed by
ABF Group, 10000 Zagreb, Croatia
Tiska se u 500 primjeraka – Printed in 500 copies

Tiskanje časopisa potpomognuto je financijskim sredstvima Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske
The printing of the Journal is subsidized by the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia

acta medica croatica

Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske
Acta Med Croatica • Vol. 65 (Supl. 1) • Str. 1-244 Zagreb, rujan 2011.
The Journal of the Academy of Medical Sciences of Croatia

55 GODINA KLINIČKE CITOLOGIJE U KLINIČKOJ BOLNICI MERKUR

Indexed/abstracted in:

Biosis Previews

Cancerlit

Embase/Excerpta Medica

Health Planning and Administration

Medline/Index Medicus

Toxline

OSVRT NA POVIJEST KLINIČKE BOLNICE MERKUR I RAZVOJ KLINIČKE CITOLOGIJE U KLINIČKOJ BOLNICI MERKUR

ŽELJKO VIDAS

Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska

Merkurov sanatorij je izraz vrlina naših. On je dokument međusobne ljubavi, samoprijedora i nesebičnog rada. On je najjači dokaz naše socijalne svijesti, on je goruća žiža našeg humanog pregnuća.

Merkurov vjesnik, studeni 1937.

Od 1930., kada je počeo radom Merkurov sanatorij, do današnjih dana nemoguće je bilo što napisati o radu KB Merkur a da se ne naglasi nesebičan rad, humana i znanstvena dostignuća koja su postignuli zaposlenici ove bolnice. Dobri međuljudski odnosi, ljubaznost i susretljivost prema pacijentima su utkani u temelje našega rada.

Osnovano 1873. godine kao Hrvatsko trgovačko društvo Merkur, s glavnim ciljem poboljšanja ekonomsko-socijalnog položaja trgovaca i obrtnika, društvo je od samog početka omogućavalo školovanje trgovačkih naučnika, te radilo na buđenju nacionalne svijesti. U to doba društvo Merkur je bila jedina ustanova koja je u hrvatskim krajevima trgovačko-obrtničkom staležu pružala stručnu obrazbu i socijalnu skrb, koja se očitovala u pružanju pomoći u slučaju bolesti i nezaposlenosti.

U sastavu društva bila je trgovačka škola, knjižnica, čitaonica, pjevačko-tamburaški zbor, organizirali su tečajeve stranih jezika, a od 1898. izdaju i vlastiti list, Merkurov vjesnik. Europska suradnja je već tada bila naglašena, te društvo surađuje sa sličnim društvima u Pragu, Beču i Grazu.

Nedovoljni kapaciteti u Gradu Zagrebu i povećanje broja osiguranika doveli su 1924. godine do

inicijative za izgradnju sanatorija. Merkurov sanatorij službeno je otvoren 6. siječnja 1930. godine. U svom sastavu imao je interni odjel sa 36 kreveta, rentgen kabinet, mali priručni laboratorij, prateće službe te prvu dijetetsku kuhinju u Zagrebu.

To posebno ističem jer je vidljivo od samih početaka da će se budući razvoj bolnice temeljiti na suradnji dijagnostike i klinike. Kasnijim razvojem bolnice to je postala svakodnevna praksa, koja se posebno istaknula suradnjom citologije, odnosno citodijagnostike s hematologijom, ginekologijom i endokrinologijom. Većina radova koji su objavljeni u ovom suplementu plod su upravo te suradnje.

Ponosni smo na naše citologe što ove godine slave 55. godina citologije u KB Merkur, jer su se u tom razdoblju uspjeli razviti u centar izvrsnosti bez čije citodijagnostike je nemoguće zamisliti moderno liječenje naših bolesnika. Danas naši citolozi zajedno s kolegama iz drugih ustanova sudjeluju u organizaciji i radu domaćih citoloških udruženja i organizacija, ali su priznati i u europskim i svjetskim citološkim organizacijama.

Posebno nas veseli što sudjeluju u organizaciji međunarodnih citoloških skupova, kao pozvani predavači ili kao predsjedatelji pojedinih sekcija, odnosno aktivni učesnici međunarodnih kongresa.

Rezultat je to neumornog rada i promišljanja za dobro bolesnika. Zbog toga se na kraju ponovno želim vratiti na Merkurov vjesnik iz 1937. koji u nastavku kaže: "I zbog toga svjesni Merkuraši, naročito oni stari, sa ponosom gledaju u tu prelijepu tekovinu, gledaju rad svoj, gledaju duge noći vijećanja svojih, gledaju djelo koje je stvoreno vlastitim sredstvima po vlastitoj inicijativi, po vlastitoj volji, vlastitim moralnim i materijalnim žrtvama svje-

snih Merkuraša. Gledaju djelo časti, jer, u Merkuru se radi za čast."

I doista mnogi naši stručnjaci dobivali su i danas dobivaju primamljive ponude za rad u drugim sredinama ali većina je to odbila, znajući da je "tekovinu Merkura", zasnovanu na časti i samozatajnom radu, baziranom na vlastitoj inicijativi, teško napustiti.



Sl. 1. *Klinička bolnica Merkur*

POGLED NA CITOLOGIJU KROZ NAOČALE KLINIČARA

BRANIMIR JAKŠIĆ

*Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju
i Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska*

Obljetnice su dobra prigoda da se ocijeni pređeni put u proteklom razdoblju i da se procijeni kako bi se trebalo razvijati u budućnosti. Stoga sam sa zadovoljstvom prihvatio poziv organizatora da prikazem svoje stavove pod provokativnim naslovom „Pogled na citologiju kroz naočale kliničara“. Razlog za to je moja dugogodišnja uska suradnja s kliničkim citolozima za koju smatram da je bila vrlo uspješna te da nam može pružiti putokaz kako dalje.

KAKAV JE ODNOS HEMATOLOGA - SPECIJALISTA KLINIČARA I CITOLOGA - SPECIJALISTA DIJAGNOSTIČARA?

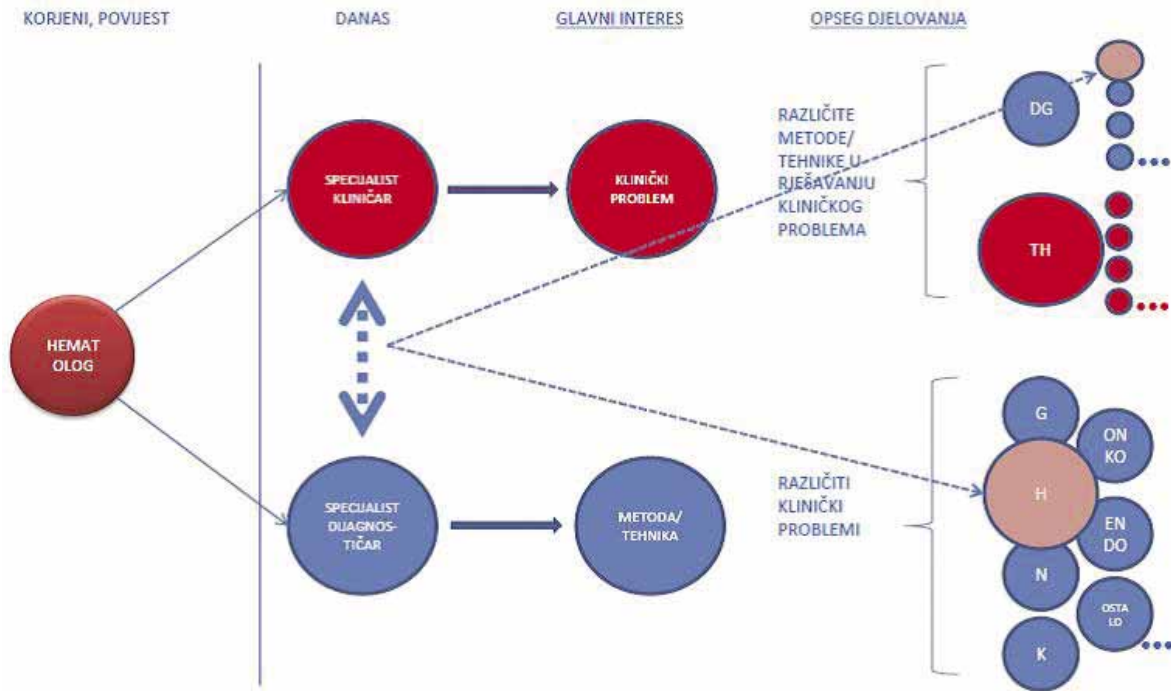
Ako pogledamo polazišta i korijene u prošlosti, onda su ne tako davno, ali svakako prije obljetnice koju slavimo, oba profila predstavljala istu osobu. Liječnici koji su se bavili hematologijom razvijali su vlastitu dijagnostiku poremećaja krvotvornog tkiva. Razvitak dijagnostičkih i terapijskih tehnologija zahtijevao je sve veću ekspertizu u svakom od aspekata tako da je došlo do odvajanja u posebne profile stručnjaka do situacije kakvu imamo danas. Danas se jasno radi o posebnim profilima stručnjaka. S jedne strane radi se o specijalistu kliničaru (u našem slučaju hematologu), a s druge strane o specijalistu dijagnostičaru (u našem slučaju citologu). Iako se radi o općenitim razlikama između kliničara različitih usmjerenja i dijagnostičara različitih profila, na našem je primjeru moguće prepoznati sve temeljne razlike između specijalista kliničara i specijalista (cito)dijagnostičara (sl. 1). Stručnjaci se međusobno razlikuju po glavnom interesu te posljedično po opsegu djelovanja.

Glavni interes kliničara hematologa je hematološki klinički problem pa posljedično kliničar koristi različite metode i tehnike u definiranju i rješavanju tog kliničkog problema. Za definiranje problema kliničar koristi i objedinjuje različite dijagnostičke metode od kliničkih, hematoloških, morfološ-

kih (npr. citoloških), imunoloških, biokemijskih, molekularnih, citogenetskih i slično, do metoda oslikavanja (kao što su UZV, rtg, CT, MRI), mikrobioloških, elektrofizioloških, endoskopskih, nuklearno-medicinskih metoda i slično. Citologija, tj. citodijagnostika je jedna od dijagnostičkih metoda čiji se rezultati integriraju u dijagnostičkom procesu hematoloških bolesti (što je na slici prikazano i označeno posebno).

Kliničar za rješavanje kliničkog problema koristi različite terapijske metode npr. antineoplastičke, antimikrobne, potporne itd., i na taj se dio kliničkog procesa odnosi znatan dio djelovanja i ekspertize kliničara. Zajednički je i za dijagnostiku i za terapiju silni razvitak specijaliziranih tehnika i znanja, koje zahtijevaju specijalizirane stručnjake. Stoga je danas kliničar koji je zadužen za bolesnika prisiljen sve češće, gotovo uvijek, koristiti stručnjake različitih profila, a učinkovit klinički proces sve više podrazumijeva timski rad visoko specijaliziranih stručnjaka različitih profila.

S druge strane specijalist dijagnostičar ima kao glavni interes specifičnu metodu ili tehniku. Ovu tehniku primjenjuje u različitim kliničkim problemima (strukama). Na slici su prikazani primjeri različitih kliničkih struka u kojima sudjeluju specijalisti citodijagnostičari, a posebno je označena hematologija, jer je ovaj prikaz pogled na citologiju kroz naočale kliničara hematologa.



Sl. 1. Porijeklo i današnji odnos između specijalista kliničara hematologa i specijalista dijagnostičara citologa. Vidi objašnjenje u tekstu.

Slika pojednostavljeno prikazuje osnovne razlike između specijalista kliničara i specijalista dijagnostičara, njihovu nužnu povezanost, ali i vrlo veliku složenost sustava u kojem se taj odnos događa. Naime, s jedne strane se pojedine dijagnostičke struke dodatno specijaliziraju prema kliničkim strukama u kojima učestvuju, a s druge strane se u ukupnoj dijagnostici koriste rezultati različitih metoda. Zbog toga je na više razina moguća, pa i potrebna koordinacija dijagnostičkog procesa, na primjer skupine za definiranje tipa nozološkog entiteta [morfolologija, imunologija (i protočna citometrija), molekularna dijagnostika, citogenetika i slično], skupine za primjenu metoda oslikavanja (UZV, rtg, CT, MRI, PET i slično).

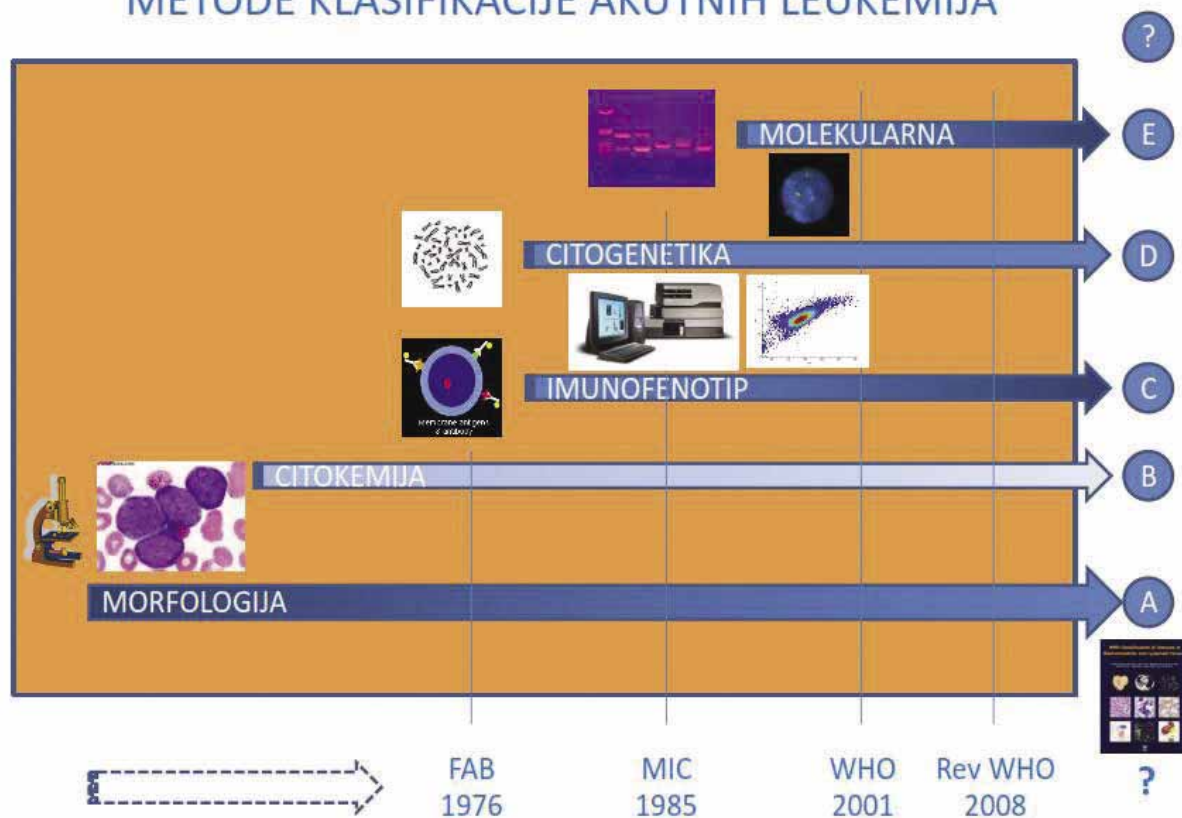
RAZVITAK NOVIH DIJAGNOSTIČKIH POSTUPAKA, NASTANAK NOVIH SPECIJALISTA DIJAGNOSTIČARA. PRIMJER: KLASIFIKACIJA AKUTNIH LEUKEMIJA

Razvitak temeljnih istraživanja, bolje razumijevanje bioloških zakonitosti i procesa u onkologiji zajedno sa stalnim razvitkom dijagnostičkih tehnologija dovodi do razvitka novih, sve više spe-

cializiranih dijagnostičkih postupaka. Na sl. 2. prikazana je shema razvitka dijagnostike akutnih leukemija s približnim razdobljima kada je pojedina dijagnostika prihvaćena u rutinskom kliničkom radu za klasifikaciju akutnih leukemija.

Već na prijelazu 19. u 20. stoljeće mikroskopska slika obojenog krvnog razmaza postaje rutinski pregled i ostaje osnovna pretraga u minimalno izmijenjenom obliku do današnjeg dana (A) (1-4). Dopuna citokemijskim pretragama (B) dovodi do opće prihvaćene FAB klasifikacije sedamdesetih godina prošlog stoljeća (5). Slijedilo je uvođenje određivanja imunofenotipa (C) te citogenetike (D) u rutinsku dijagnostiku sredinom osamdesetih godina kao MIC (Morfolologija-Imunofenotip-Citogenetika) pristup (6). Paralelno se razvijaju nove tehnike imunofenotipizacije uz pomoć protočnog citometra (7) te molekularne pretrage (E) (8), što uzrokuje dalju užu specijalizaciju dijagnostičara, sada više ne nužno povezanih s klasičnom staničnom morfolologijom. Prikazane metode/tehnike od A do E temelj su sadašnjih klasifikacija akutnih leukemija prema WHO (9-11). Ovaj je primjer odabran jer zorno prikazuje sve veću složenost dijagnostičkog procesa, a isti princip se može proširiti i na ostale nozološke entitete.

METODE KLASIFIKACIJE AKUTNIH LEUKEMIJA



Sl. 2. Prikaz razvitka osnovnih dijagnostičkih metoda na primjeru akutnih leukemija. Vidi objašnjenje u tekstu.

DIJAGNOSTIČKI POSTUPAK POSTAJE SVE SLOŽENIJI, POJAVLJUJU SE MNOGOBROJNE ZAMKE

Na prikazanom primjeru je vidljivo da suvremena klasifikacija akutnih leukemija koristi kombinaciju 5 različitih metoda. Na sl. 3. prikazani su mogući međudnosi između dva parametra. Prikazan je najčešći slučaj, a to je da se parametar A i parametar B preklapaju samo u jednom dijelu ($A \cap B$), dok uz to ostaje jedan dio gdje je prisutan samo parametar A i drugi dio u kojem prisutan samo parametar B. Zbog toga od ta dva parametra postoje tri mogućnosti različitih kategorija klasifikacije i to pod uvjetom da se parametri kategoriziraju samo kvalitativno (kao + ili kao -). Postavlja se ključno pitanje: kako odrediti koji od parametara valja smatrati zlatnim standardom? To je važno za validaciju dijagnostike i posljedično ukupnog kliničkog procesa. Ako je zlatni standard, kao što je prikazano na lijevoj strani slike, pozitivan nalaz parametra A, onda se postavlja pitanje kako klasificirati onaj

dio bolesnika koji imaju samo prisutnost pozitivnog parametra B i obratno, prikazano na desnoj strani slike. Jesu li u tom slučaju jedno „klasični“ slučajevi, a drugo „varijante“, ili se radi o potpuno



Sl. 3. Broj mogućih kategorija iz međudnosa dva parametra. Iz Vennovog dijagrama koji prikazuje čest slučaj odnosa između 2 parametra, vidljivo je da je najveći mogući broj kategorija tri. Važno je, međutim, koja je metoda (odnosno parametar) proglašena „zlatnim“ dijagnostičkim standardom.

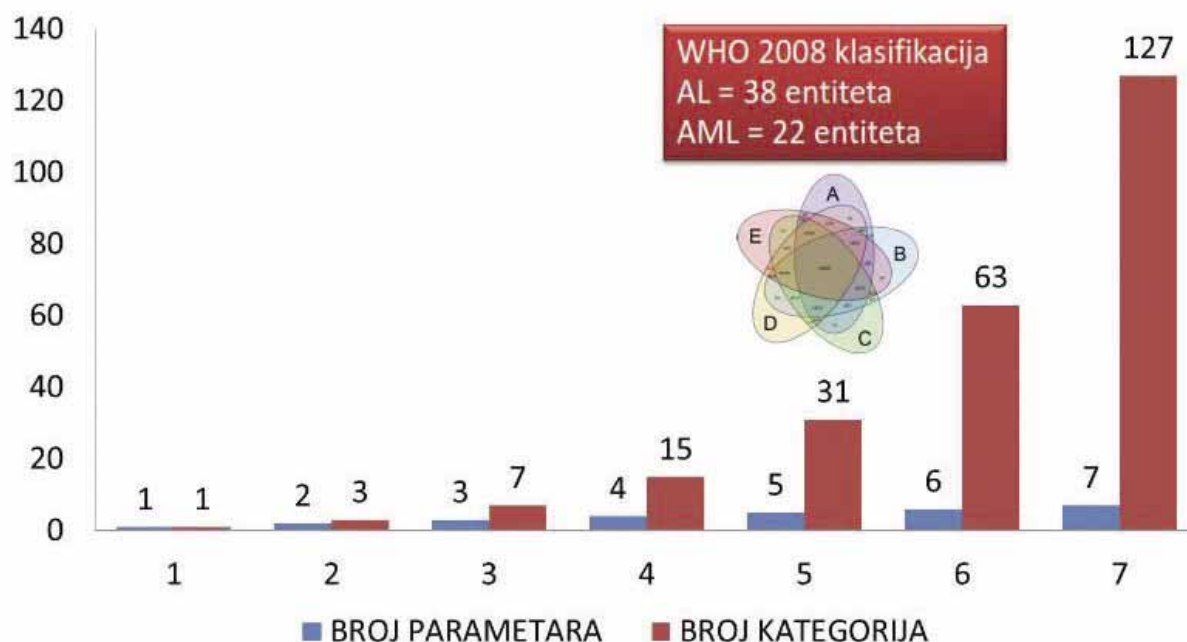
jednakopravnim kategorijama, a u tom slučaju klasifikacija postaje složenija. Jasno je da definiranje zlatnog standarda ne smije biti arbitrarno, nego je potrebno neovisno ocijeniti kliničku relevantnost. Situacija se naravno dalje komplicira ako želimo u sustav uvesti novi parametar. Broj teorijskih mogućnosti eksponencijalno raste i to i u slučaju da se svaka od novo uvedenih metoda klasificira samo binarno (kao + ili kao -). Ako se za klasifikaciju koriste dodatne kvantitativne/kvalitativne gradacije pojedinog parametra, možemo očekivati i daleko veći broj kategorija.

Na sl. 4 prikazan je teorijski broj mogućih kategorija ako se za klasifikaciju koristi određeni broj parametara. Prikazano je da se za WHO klasifikaciju koristi 5 osnovnih parametara, pa je prema tome teorijski minimum 31 kategorija. Kako klasifikacija za akutne leukemije predviđa gotovo dvostruki broj kategorija, jasno je da su neke od metoda dodatno kategorizirane, često na temelju različite kvantitativne zastupljenosti, odnosno vrijednosti parametara koji se koristi za klasifikaciju.

Ovaj je teorijski problem prikazan da pomogne razbiti često prisutnu iluziju da će se klinička dija-

gnostika pojednostaviti i olakšati ako se za klasifikaciju uzme u obzir više (novih) parametara.

Jasno je da ogromni broj mogućih teorijskih kategorija nije moguće sustavno evaluirati u kliničkim istraživanjima. Taj broj i nije realan, jer su različite kategorije u interakciji, pa se informacijski gledano broj teorijskih kategorija može sažeti u manji broj kategorija koje zadovoljavajući prikazuju glavninu dijagnostički relevantnih informacija. Potrebno je, međutim, na temelju kliničkog istraživanja ponderirati svaki pojedini nalaz (odnosno kategoriju), ocjenjujući njegovu točnost, preciznost, osjetljivost, specifičnost, reproducibilnost itd., a uz to je bitna i ocjena kliničke relevantnosti. Tek bi takav postupak kliničkim istraživanjem dijagnostike omogućio racionalnu dijagnostiku koja se temelji na dokazima. Pri tome je nužno evaluirati neovisnu kliničku relevantnost pojedine metode, odnosno neovisni doprinos dijagnostičkom procesu. Štoviše, osim nužno složenog kliničkog istraživanja ovaj sustav postaje sve složeniji i u rutinskoj dijagnostici i zahtijeva dodatnu razinu ekspertize. Pri tome je uobičajeno odrediti osnovnu hijerarhizaciju primijenjenih metoda s obzirom na doprinos u dijagnostičkom procesu.



Sl. 4. Porast mogućeg broja različitih kategorija u funkciji broja parametara. Iz Vennovog dijagrama vidi se teorijski broj mogućih različitih kategorija koji proizlaze iz preklapanja 5 različitih parametara.

KAKVA JE PRI TOME ULOGA MORFOLOGIJE DANAS?

Morfologija je duboko ukorijenjena u način razmišljanja hematologa, ima prednosti, jer prepoznaje „slike“ (1 slika=1000 riječi), integrira vrlo složene informacije reducirajući ih na prihvatljivi broj informacija (tj. kategorija). Zbog toga još uvijek predstavlja temelj klasifikacije i temelj kliničkom djelovanju u hematologiji.

Morfolozi, međutim, moraju biti otvoreni novim, nemorfološkim informacijama, integrirati ih, a s obzirom na njihovo odlično snalaženje u vrlo složenim situacijama, smatram da bi čak trebali biti predvodnici tog procesa.

POZITIVNA ISKUSTVA – KAKO DALJE ?

Nema dvojbe da je suvremeni dijagnostički proces daleko složeniji od onog vremena kada se hematologija počela razvijati kao posebna struka, a kada je osnovnu dijagnostiku kao i skrb za bolesnika obavljala ista osoba. Nakon zajedničkog početka došlo je do divergencije, razvile su se nove specijalizacije, ali je za hematologiju kao struku bio potrebno održati suradnju u obliku timskog rada.

Mi smo u KB Merkur od naših učitelja naslijedili i provodimo vrlo usku suradnju između kliničara i kliničkih citologa. Smatram da je to odličan model koji pokazuje niz dobrih strana.

Klinički citolozi svakodnevno sudjeluju u radu kliničkog odjela, sudjeluju u planiranju i provode dijagnostičke pretrage, raspoređuju uzorke drugim dijagnostičkim specijalistima. Bolje razumiju probleme kliničara od većine ostalih specijalista dijagnostičara, ali i probleme drugih dijagnostičara bolje od većine kliničara. Među sve više specijaliziranim dijagnostičarima važna je suradnja i interakcija za učinkovito provođenje kliničkog procesa (a to se i događa formalno ili neformalno). Ovu suradnju i interakciju treba pospješiti, pa čak i formalizirati organizacijske okvire.

Smatram da je klinički citolog odličan kandidat za koordinatora onog dijela dijagnostičkog postupka koji ima za cilj definiranje nozološkog entiteta, tj. klasifikaciju bolesti, te vjerujem da u budućnosti valja ići u tom smjeru.

L I T E R A T U R A

1. Ehrlich P. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Z klin Med* 1889; 1: 553-60.
2. Naegeli O. Über rothes Knochenmark und Myeloblasten. *Deutsch Med Wochenschr* 1900; 26: 287.
3. Wright JH. A Rapid Method for the Differential Staining of Blood Films and Malarial Parasites. *J Med Res* 1902; 7: 138-44.
4. Giemsa G. Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung. *Zentralbl Bakteriol* 1904; 37: 308-11.
5. Bennett J, Catovsky D, Daniel M i sur. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-8.
6. Van den Berghe H. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. Second MIC Cooperative Study Group. *Br J Haematol* 1988; 68: 487-94.
7. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; 100: 534-40.
8. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/228983/human-genetics/50731/The-human-chromosomes> Encyclopaedia Britannica, The Human Chromosome (online access on 20-04-2011).
9. Harris N, Jaffe E, Diebold J i sur. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999; 10: 1419-32.
10. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-302.
11. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL i sur. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition, WHO Classification of Tumours, Volume 2; 2008. ISBN-13 9789283224310.

55. GODINA KLINIČKE CITOLOGIJE U KB MERKUR – 55 RAZLOGA ZA OBLJETNICU

IKA KARDUM-SKELIN^{1,2}, INES KRIVAK BOLANČA¹ i MIA ŠUNJIĆ STAKOR¹

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
i ²Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

*Citolozi KB Merkur su sanjali i
dosanjali „raskoš“ od citologije*

ZAŠTO 55. OBLJETNICA?

Godine 1955. počinje citološka era prof. dr. sc. Inge Črepinko u KB Merkur, u Zavodu za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu na čijem je čelu tada bio prof. dr. Ibrahim Ruždić, medicinski biokemičar, gdje je osnovan laboratorijsko-hematološki odsjek.

Prva petica (55) za naše učitelje i osnivače: prof. Črepinko, prvu voditeljicu citološkog laboratorija Interne klinike; kliničare prof. dr. sc. Erika Hauptmanna, prof. dr. sc. Zvonimira Singera, prof. dr. sc. Svebora Čerleka i prof. dr. Zdenka Škrabala (za služne za osnivanje citoloških laboratorija).

Druga petica (55) za njihove kasnije neposredne suradnike (prim. dr. sc. Hrvoja Harambašića, prof. dr. sc. Maru Dominis, dr. Đurđicu Šips i prim. dr. sc. Zvonimira Papića), koji uz brigu oko svakodnevne rutinske citodijagnostike, uvode nove tehnologije; od samog početka sudjeluju u osnivanju i djelovanju Europskog društva kliničkih citologa, osnivanju Sekcije za citologiju i citodijagnostiku (prva predsjednica prof. Črepinko), poslijediplomskog studija iz kliničke citologije na Medicinskom fakultetu (MEF) u Zagrebu (prvi voditelj prof. dr. Erik Hauptmann), organizirane edukacije citotecnologa (prof. Črepinko) te samostalne specijalizacije iz medicinske/kliničke citologije. U citološkim djelatnostima KB-a Merkur započeli su svoje prve citološke korake ili proveli dio svoga radnog vijeka prim. dr. sc. Vida Jakaša (Klinika za tumore KB-a Sestre milosrdnice, Zagreb); prof. Dominis, mr. sc. Sonja Džebro i dr. sc. Ana Borovečki (Klinički za-

vod za patologiju i citologiju KB Merkur); dr. Magdolna Bollman (Bonn, Njemačka); mr. sc. Sanja Ban Bastić (Privatna ordinacija Moderna dijagnostika, Zagreb); dr. sc. Božica Vrabc-Branica (Jordanovac, KBC Zagreb); mr. sc. Iris Fabijanić, dr. sc. Koraljka Gjadrov Kuveždić (KBC Zagreb) i dr. Anđelka Dominis (Zadar).

Danas njihovi nasljednici sudjeluju u vodstvu Hrvatskog društva za kliničku citologiju HLZ (predsjednica od 2001. doc. dr. sc. Kardum-Skelin, tajnica dr. Jelić Puškarić od 2009.); osnivanju Hrvatske udruge citotecnologa (prva predsjednica Veronika Anić); koordiniranju edukacije citologa/citopatologa (doc. Kardum-Skelin) i citotecnologa (Veronika Anić) u sklopu *European Federation of Cytology Societies*.

Među glavnim su inicijatorima i organizatorima budućeg Europskog citološkog kongresa u Cavtatu 2012. godine: počasna predsjednica prof. Črepinko; ko-predsjednica doc. Kardum-Skelin i tajnica dr. Biljana Jelić Puškarić. Djelatnici Zavoda za kliničku citologiju i citogenetiku KB Merkur uvodili su i dalje uvode nove tehnologije u dijagnostiku: ciljenu punkciju pod kontrolom ultrazvuka površnih i intraabdominalnih organa; stereotaktičku punkciju dojke; telecitologiju i kompjutersku analizu slike; suvremenu obradu povećanog limfnog čvora iz citološkog uzorka (imunocitokemiju, fenotipizaciju, citogenetsku i molekularnu analizu); transplantacijsku citologiju (doc. Kardum-Skelin, dr. Dunja Šušterčić, dr. Biljana Jelić Puškarić); imunocitokemiju u ginekološku citologiju (mr. sc. Ines Krivak

Bolanča); nastavljaju s citogenetikom (mr. sc. Karmela Šentija i dr. Suzana Katalenić Simon) gdje je stao prof. Singer (pionir prenatalne citogenetike, naročito placentocenteze); s ciljanom punkcijom štitnjače i citološkom obradom muških gonada, naročito kod muške neplodnosti, gdje je stao dr. sc. Zvonimir Papić (dr. Mia Šunjić Stakor). Sukreatori su sustavne edukacije svih profila uključenih u kliničku citologiju u RH: doc. Kardum-Skelin - voditeljica poslijediplomskog studija iz kliničke citologije; predsjednica povjerenstva za izradu novog programa specijalizacije iz citologije; voditeljica tečaja trajne edukacije citotehnologa pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi RH. Aktivno surađuju u timskom radu s drugim dijagnostičkim strukama i kliničarima objavljujući zajedničke radove, sustavno vode brige o stručnom i znanstvenom radu djelatnika, a u tijeku je izrada doktorskih disertacija (mr. sc. Ines Krivak Bolanča i mr. sc. Karmela Šentija) i pohađanje dokorskog studija na MEF-u u Zagrebu (dr. Biljana Jelić Puškarić).

Odrasli uz svoje bazične kliničare interniste (doc. Ika Kardum-Skelin, dr. Dunja Šušterčić, dr. Biljana Jelić Puškarić, dr. Marina Pažur, citotehnolozi Biserka Križaj, ing. med. lab. dijagn., Katarina Parigros, Veronika Anić, Gordana Knežević te pomoćna djelatnica Katarina Hrgović), ginekologe (mr. sc. Ines Krivak Bolanča, mr. sc. Karmela Šentija, dr. Suzana Katalenić Simon i citotehnolozi Emilija Đorđijevski, bacc. med. lab. dijagn., Ljiljana Gavranović, Sanja Rakek Novak, Marijana Baburić i Viktorija Švenčbir, bacc. med. lab. dijagn., administratorica Ksenija Bagarić i pomoćna djelatnica Danica Burušić) i endokrinologe (dr. Šunjić Stakor i citotehnolog Siniša Vlahović, bacc. med. lab. dijagn.) nakon 55 godina, počinju zajedno u sklopu *Zavoda za kliničku citologiju i citogenetiku* (pročelnica doc. Kardum-Skelin, zamjenica mr. sc. Ines Krivak Bolanča i glavni citotehnolog Siniša Vlahović, bacc. med. lab. dijagn.) s tri jedinice (Jedinica za hematološku i ostalu aspiracijsku te neginekološku eksfolijacijsku citologiju i citogenetiku; Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku te Jedinica za endokrinološku citologiju i andrologiju).

KOJI SU 55 RAZLOGA ZA OBLJETNICU?

To su sljedećih 55 slova - VOLIMO NAŠ ZAVOD ZA KLINIČKU CITOLOGIJU I CITOGENETIKU KB MERKUR - gdje svako slovo ima značenje: učitelji, osnivači i druga generacija njihovih nasljednika; pretrage koje se rade (nativna citologija, citochemija, imunocitochemija, citogenetika, istraživanje); osobine koje mora posjedovati svaki član kao što su: odgovornost, inovativnost, operativnost, odlučnost, iskrenost, upornost, ustrajnost, radišnost, lijepe ideje i umijeće; uz razumijevanje uprave; suradnju i sudjelovanje u timskom radu s internistima, otorinolaringolozima, ginekolozima, endokrinolozima, radiolozima te ostalim kliničarima i dijagnostičarima.



Prof. dr. sc. Philippe Vielh (generalni tajnik European Federation of Cytology Societies) u posjetu KB Merkur prilikom Svjetskog senološkog kongresa održanog u Zagrebu 2006. godine



Organizatori i pokrovitelji Simpozija: dr. sc. Željko Vidas, ravnatelj KB Merkur, akademik Željko Reiner, predsjednik Akademije medicinskih znanosti Hrvatske i ravnatelj Kliničkog bolničkog centra Zagreb, doc. dr. sc. Ika Kardum-Skelin, pročelnica Zavoda za kliničku citologiju i citogenetiku KB Merkur i predsjednica Hrvatskog društva za kliničku citologiju HLZ, prim. dr. Hrvoje Minigo, predsjednik Hrvatske liječničke komore



Djelatnici Zavoda za kliničku citologiju i citogenetiku KB Merkur



Uzvanici i učesnici Simpozija

50 GODINA LABORATORIJA ZA GINEKOLOŠKU CITOLOGIJU I KLINIČKU GENETIKU

EMILIJA ĐORĐIJEVSKI i INES KRIVAK BOLANČA

*Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku,
Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku, Zagreb, Hrvatska*

Još davne 1964. g. održan je prvi preliminarni sastanak citologa tadašnje Jugoslavije u Ljubljani, na kojem je bila tema stanje citodijagnostike u našoj zemlji i ukazana je potreba organiziranog i koordiniranog rada nove struke - citologije. Osnovane su tada sekcije citologa koje su kasnije formirale Udruženje citologa Jugoslavije. Citolozi su tada mogli organizirano stvarati program rada koji je obuhvaćao stručni rad, edukaciju kadrova te proširenje citodijagnostičkih metoda. Omogućena je i edukacija tehničkog kadra i citologa. Te je iste godine, nakon završetka specijalizacije iz ginekologije dr. Zvonimir Singer osnovao laboratorij i počeo se u početku baviti samo citologijom, a kasnije i medicinskom genetikom (sl. 1). U početku se sva tehnička obrada uzetih razmaza obavljala u citološko-hematološkom laboratoriju Interne klinike pod vodstvom dr. Inge Črepinko, koji je funkcionirao već pet godina. Tijekom godina kolege su počeli uvažavati rad dr. Singera te je zbog povećanja opsega rada osnovan Laboratorij za eksfolijativnu ginekološku citologiju pri Ginekološko porođajnom odjelu bolnice.

Dr. Singer se educirao u klinikama Europe, i 1978. g. položio ispit iz citopatologije u Beču pred Internacionalnim odborom za citopatologiju te postaje redovni član Internacionalne akademije za citopatologiju s pravom pisanja FIAC iza imena. Godinu dana nakon toga i Odsjek za citologiju i kliničku genetikom čiji je voditelj prof. dr. Z. Singer dobiva status pridruženog laboratorija Internacionalne akademije za citologiju (*International Academy of Cytology Board for Laboratory Certification*).

Usporedo s djelovanjem prvih citologa, 1968. g. organiziran je i prvi tečaj za citotehničare – skrinere, pod pokroviteljstvom Lige za borbu protiv raka.



Sl. 1. Prof. dr. Zvonimir Singer

Od tada se s malim prekidima provodi edukacija sve do danas, a naš laboratorij je bio mjesto na kojem su mnogi tehničari i medicinske sestre obavljali praktični dio programa edukacije.

Tijekom rada i razvoja nailazili smo na niz poteškoća, koje su se pokušavale riješiti uvođenjem novih metoda bojanja, citokemijskim reakcijama, a i počelo se sa citogenetikom. Teško se dolazilo do literature na našem jeziku, stoga je dobro došla ideja da se napiše praktikum kako bi na jednostavan i pristupačan način ukazali na potrebne tehničke i teorijske momente s područja ginekološke citologije. Vrlo brzo nakon osnutka laboratorija dr. Singer

je uz pomoć suradnika izdao priručnik za ginekološku citologiju koji je u proširenom obliku doživio drugo izdanje 1994. g.

U radu se ukazala potreba za dijagnostičkim pomagalom u slučajevima hormonalne poremetnje, poremećene trudnoće i ranog otkrivanja karcinoma.

Dolaskom dr. Đurđice Šips uz rano otkrivanje karcinomskih promjena počela se obraćati pozornost hormonalnoj citologiji. Doktorica Šips je sudjelovala u opisivanju površnih i intermedijarnih stanica, opisivala je hormonalne poremećaje u trudnoći te obavljala svakodnevnu rutinu u ranoj dijagnostici karcinoma. Mnogo truda uložila je u edukaciju mladih kadrova, naročito skrinerica.

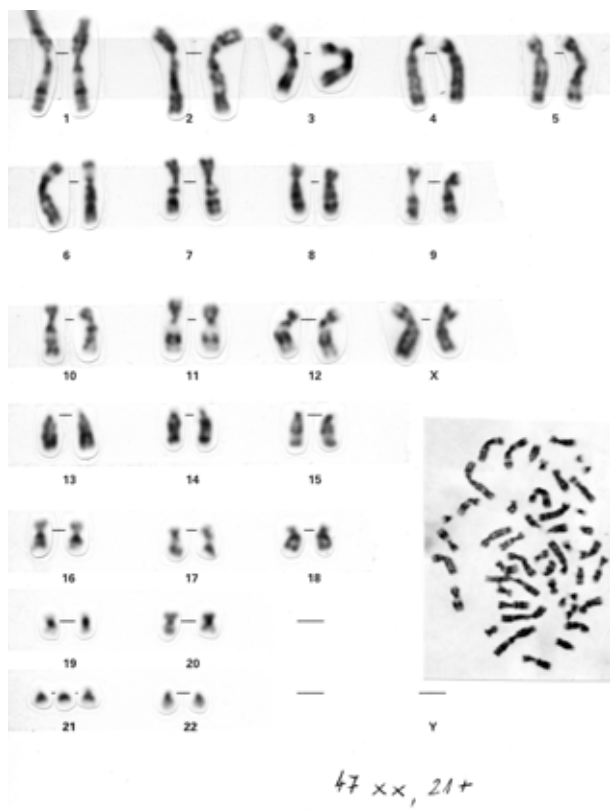
Osim bojanja po Papanicolaouu za hormonalnu dijagnostiku i otkrivanje raka, uveli smo metodu bojanja po Kittrichu (bojanje s nil-blau-sulfatom) za dokazivanje prisustva elemenata amnijske tekućine u vaginalnim razmazima. Za dokazivanje i otkrivanje uzročnika upale uporabom fazno-kontrastnog mikroskopa uveli smo očitavanje stupnja čistoće vaginalnog iscjotka kao sastavnog dijela ginekološkog pregleda. Istim mikroskopom se po

Barr-Bertramovoj metodi (bojanjem acet-orceinskom tehnikom) dokazivao spolni kromatin (test ženskosti).

Od genetskih metoda u početku su rađene analize kromosoma iz kulture limfocita, mejoza testisa i kariotipizacije kože i tkiva pobačenih zametaka. Godine 1972. uvedena je metoda kultiviranja stanica fetusa iz amnijske tekućine (rana amniocenteza). Kasnije se za potrebe Interne klinike počelo raditi i kariotipizaciju koštane srži. Krajem 1986. g. analizirane su stanice trofoblasta što je kasnije prešlo u rutinski postupak za dijagnostiku kromosomskih abnormalnosti iz tkiva korionskih resica (sl. 2). Zbog velikih potreba ginekološke klinike za prenatalnom dijagnostikom, koja se u međuvremenu počela provoditi na Klinici, nismo bili u mogućnosti dalje razvijati metode kariotipizacije koštane srži što zbog zahtjevnosti metode a dijelom i zbog nedostatka prostora i stručnih kadrova.

Prof. dr. Z. Singer, FIAC i dr. med. Đ. Šips (sl. 3.) sada su u zasluženoj mirovini, a poslove u laboratoriju obnose novi ljudi, zaljubljenici u citologiju koji nastavljaju s uvođenjem novih suvremenih metoda - uporabom imunocitokemijskog bojanja u dijagnostičkim postupcima.

Sada laboratorij vodi dr. Ines Krivak Bolanča, koja uz pomoć suradnika: dr. Karmele Šentije i dr. Suzane Katalenić Simon, citotehnologa, gđe Ljiljane Gavranović, Sanje Rakek Novak, Marijane Baburić, te ostalog osoblja: Ksenije Bagarić i Danice Burušić nastoje nastaviti dalje s radom uz uvođenje novih metoda dijagnostike po zahtjevima vremena.



Sl. 2. Kariogram trisomija 21 (Sy. Down)



Sl. 3. Dr. Đurđica Šips i prof. dr. Zvonimir Singer

ZAŠTO JE CITOLOGIJA STRUKA, A NE METODA? DESET PRAVILA ZA USPJEŠNOST CITOLOŠKE STRUKE

IKA KARDUM-SKELIN

*Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku i
Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska*

Klinička citologija je interdisciplinarna medicinska dijagnostička struka medicine, koja objedinjuje kliniku, laboratorijsku obradu, analizu i završno mišljenje specijalista citologa. Neagresivna je, minimalno invazivna i jednostavna, kako za izvođenje, tako i za bolesnika. Pruža brzu orijentaciju, a uz dodatne tehnologije na samim citološkim razmazima (citokemiju, imunocitokemiju - analizu staničnih biljega, kompjutorsku analizu slike) ili sofisticirane metode koje koriste citološki uzorak (protočnu citometriju, molekularne i citogenetske analize) postaje važna karika u dijagnozi, subtipizaciji i prognozi malignih tumora. Deset pravila za uspješnost citološke struke su: 1. Poznavati cijelu citologiju (biti opći citolog); 2. Sudjelovati u svim fazama citološkog nalaza od uzimanja uzoraka do pisanja izvješća; 3. Poznavati dodatne tehnologije kako bi ih se moglo interpretirati i/ili ih racionalno preporučiti u diskutabilnim slučajevima; 4. Čuvati dostojanstvo struke, jer svaka struka ima svoje prednosti, mane i ograničenja; 5. Ustrajati na kontroli procesa rada, kontroli kvalitete rada citologa i cijelog citološkog tima; 6. Prenositi znanje mladima; 7. Pomažati kolegama u diskutabilnim slučajevima bez obzira na izgubljeno vrijeme i naknadu, jer se samim time pomaže bolesniku i samoj struci; 8. Izmjenjivati iskustva s kolegama drugih struka čime se postiže bolje međusobno razumijevanje; 9. Staviti interes struke ispred osobnih interesa; 10. Voljeti citologiju.

Ključne riječi: klinička citologija, edukacija, dodatne tehnologije, kontrola kvalitete

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Ika Kardum-Skelin, prim., dr. med.
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
KB Merkur
10 000 Zagreb, Zajčeva 19
Tel.: +385 1 2308 461, faks: +385 1 22 53 254
E-mail: ikardum@hi.t-com.hr

UVOD

Citologija kao morfološka dijagnostička grana medicine dijagnosticira bolesti na staničnoj razini. Primjenjuje se odmah u početku dijagnostičkog postupka, čime se često može izbjeći složenije i agresivnije, skuplje i za pacijenta neugodnije postupke (1). Može se ponavljati, jer ne ostavlja nikakve trajne posljedice na analiziranom tkivu ili organu, te je samim time prikladna za praćene premalignih promjena i učinka liječenja. Citodijagnostika je danas nezaobilazna i nezamjenjiva u detekciji i ranoj dijagnozi premalignih i malignih bolesti. U ginekologiji, kao metoda probira, poznata kao popularni «PAPA» test, služi za otkrivanje pretkliničkog karcinoma i njegovih predstadija (klinički kar-

cinom otkriva ginekolog) te ima javnozdravstveno značenje. U obradi simptomatskih bolesnika ima dijagnostičku vrijednost, jer često pruža definitivnu dijagnozu (naročito u kombinaciji s dopunskim tehnologijama kao što su imunofenotipizacija, molekularna i/ili citogenetska analiza), pri čemu štedi i vrijeme i novac (2).

Pogubno je citologiju proglašiti metodom i samim time oduzeti joj status struke. Istina je da uz već etablirane metode kao što je histopatologija, paralelna analiza citološkog otiska poboljšava histopatološku analizu (naročito u slučaju premalog uzorka koji nije adekvatan za patohistološku obradu) te se logično nameće poznavanje citomorfologije kao metode u datim slučajevima. Međutim, svođenjem

citologije na metodu, gubi se jedan od njezinih važnih učinaka - ukazivanje na potrebne kirurške zahvate i izbjegavanje nepotrebnih. Ako je koristimo samo kao metodu i dalje ćemo svaki povećani čvor (limfni čvor, čvor u dojci, štitnjači, intratorakalne i intraabdominalne čvorove) odstranjivati što zahtijeva kirurški zahvat, najčešće u hospitalnim uvjetima ili će se morati koristiti biopsija širokom iglom ("core needle" biopsija). Biopsija širokom iglom je ponekad prihvatljivija kad se citološkom punkcijom ne može odrediti priroda bolesti (3). Biopsije širokom iglom su u odnosu na citološke punkcije tehnički zahtjevnije i neugodnije za bolesnika, a često s istim ili sličnim dijagnostičkim učinkom.

Treba posebno istaknuti da je citološka punkcija, naročito kod imunokompromitiranih bolesnika npr. HIV pozitivnih (*engl. Human Immunodeficiency Virus*), manje rizična od kirurškog zahvata, a smanjena je i rizičnost infekcije za osoblje koje obavlja zahvat (4). Nažalost, još se i danas često događa da se bolesnici s bezazlenom limfadenopatijom upućuju na kiruršku ekstirpaciju i patohistološku dijagnostiku kao prvu diferencijalno dijagnostičku pretragu.

DESET PRAVILA ZA USPJEŠNOST CITOLOGIJE KAO STRUKE

1. Poznavati cijelu citologiju (biti opći citolog)

Citolog mora biti opći citolog i mora biti upoznat s citomorfološkim karakteristikama svih organa i svim upalnim, funkcionalnim i neoplastičnim promjenama u hematologiji, ginekologiji, gastroenterologiji, urologiji, pulmologiji, bolestima dojke, štitnjače, muškim reproduktivnim organima, promjenama u centralnom nervnom sistemu, kostima, mekim tkivima itd. Za to je potrebna adekvatna edukacija u adekvatnom razdoblju, kako se ne bi svela na razinu informacije ili tečaja. Samim time neće se doći u iskušenje da se kod punkcije promjena blizu kosti, krvne stanice (npr. megakariocite) zamijeni za sarkomske stanice. Isto tako, moći će usmjeriti prepoznavanje primarnog ishodišta metastatskih procesa u jetri, plućima, čvorovima. Ograničavanjem citologije na kiruršku citologiju

dovelo bi do njene dezintegracije i cijepanja (jer će veliki dio citologije ostati izvan djelokruga tako educiranih stručnjaka). Osiguravanjem dovoljnog vremena za edukaciju iz citologije, neće se ći na štetu drugih programa, ako se citologiju shvati kao struku, a ne kao metodu (5).

2. Sudjelovati u svim fazama citološkog nalaza od uzimanja uzoraka do pisanja izvješća

Točnost citološkog nalaza ovisi o: 1. vizualizaciji lezije za što su zaslužne slikovne metode (ultrazvuk - UZV, rentgenološke metode uključujući i kompjuteriziranu tomografiju - CT, magnetsku rezonanciju -MR); 2. ciljanom uzimanju uzoraka (punkcije pod kontrolom UZV, CT, MR) ili uzimanju briseva ili punktata pri endoskopskim zahvatima (bronhoskopija, gastroskopija, kolonoskopija, endoskopska retrogradna kolangio-pankreatografija - ERCP, endoskopska pretraga pod UZV - EUS); 3. adekvatno izvedenoj punkciji (idealno je da punkciju radi citolog ili osoba koja vizualizira leziju ultrazvukom ili endoskopom u suradnji s citologom); 4. ispravno učinjenom razmazu (bez previše primjesa krvi, bez ugrušaka, razmazan da se nakon bojenja može uočiti međusobni odnos stanica, kao i sve strukture unutar stanice: citoplazma, vakuole, granule, jezgra, kromatin, jezgrice); 5. idealno obojenom razmazu May-Grünwald Giemson (aspiracijski uzorci) ili neposredno fiksirani alkoholom i obojeni po Papanicolaou (eksfolijacijski uzorci). U suspektnim slučajevima, gdje će biti potrebne dodatne tehnologije uzimaju se ili razmazi ili se punktati spremaju u posebne medije i dostavljaju u specijalizirane laboratorije za protočnu citometriju, molekularnu dijagnostiku, citogenetiku. Tek na kraju, prilikom citološke analize, dolazi do izražaja iskustvo citologa, koje nije zanemarivo. Dobar citološki nalaz je ishod cjelovitog lanca postupaka, a on je čvrst koliko i najslabija karika. Za adekvatnost dobivenog materijala izuzetno je važno tko ga uzima. Ako ga uzima citolog, zbog prirode lezije može biti neadekvatan u 3-6% slučajeva (6), dok se taj udio kreće do čak 40%, ako ga uzimaju drugi (7). Važnost sudjelovanja u cijelom procesu nalazimo u svim granama citologije (8,9). Definitivni citološki nalaz sadrži opis citološke slike, završno mišljenje ako je nalaz definitivni, te preporuke za daljnju dijagnostiku ako se i nakon svih dostupnih tehnologija samu prirodu ili uzrok bolesti nije uspjelo identificirati (8).

3. Poznavati dodatne tehnologije kako bi ih se moglo interpretirati i/ili ih racionalno preporučiti u diskutabilnim slučajevima

Primjenom dodatnih tehnologija kao: analiza staničnih biljega (imunocitokemija i protočna citometrija) (10,11), kompjutorske analize slike (morfometrija, statička DNA citometrija) (12,13), molekularnih (lančana reakcija polimeraze – engl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) (14) i citogenetskih tehnologija (konvencionalna i/ili FISH – engl. *Fluorescent In Situ Hybridization* (15,16) na samim citološkim razmazima postaje važan faktor u dijagnozi, subtipizaciji i prognozi malignih tumora. Sve navedene tehnologije mogu koristiti uzorak dobiven citološkom punkcijom i ovisno o kliničkoj slici mogu se uzeti pri prvoj citološkoj punkciji ili naknadno nakon prve citološke analize i sumnje na maligni tumor.

4. Čuvati dostojanstvo struke, jer svaka struka ima svoje prednosti, mane i ograničenja

Svaka struka ima svoje prednosti i nedostatke. I histopatologija i citologija su subjektivne metode. Biološko ponašanje tumora (dobročudni ili zloćudni) ovisi o morfološkom izgledu, staničnom podrijetlu, stupnju diferenciranosti i proliferacijskom statusu. Između benignog tumora i dobro diferenciranog zloćudnog tumora često postoji morfološka sličnost te je ponekad tumore nemoguće razlučiti (17).

Prvi primjer je ograničenje citologije u dijagnostici određenih tumora zbog njihove slične citomorfologije (folikularni adenom/karcinom štitnjače, papilom/dobro diferencirani papilarni karcinom urotela, karcinom *in situ*/invazivni karcinom dojke), a kriterij je histološka invazija. Druga stvar je pojam citološke atipije, gdje nemamo dovoljno morfoloških kriterija da bismo nešto proglasili malignim. U histopatologiji postoji pojam granično malignih tumora (engl. *borderline*) kada nema invazije, a postoje drugi kriteriji maligniteta. Uspjeh ispravne dijagnoze ovisi o dva faktora: samoj leziji i osobama (histopatologu ili citologu) koje interpretiraju nalaz. Neovisnim mišljenjem citologa i histopatologa, na početku dijagnostičkog postupka (citologa) i definitivno nakon potrebnog operativnog zahvata (histopatologa), potvrđuje se hipoteza da je bolje imati dvije točne, nego jednu netočnu dijagnozu. Ako se dijagnoze ne slažu, potrebno je obje revidirati ili upotrijebiti dodatne metode.

5. Ustrajati na kontroli procesa rada, kontroli kvalitete rada citologa i cijelog citološkog tima

Kontrola kvalitete i interna i eksterna su ključ uspjeha svake dijagnostičke struke pa tako i citologije. Unutar svake citološke djelatnosti vrlo je važna unutrašnja i vanjska kontrola kvalitete, nadzor i protokol kao dio dobre laboratorijske prakse. *Interna kontrola kvalitete* je integralni i sistemni proces praćenja svih laboratorijskih funkcija koje osiguravaju kontinuiranu pouzdanost rezultata u skladu s dogovorenim standardima. Uz odgovarajuće osoblje ona podrazumjeva: kontrolu skupljanja uzoraka, kontrolu pripreme preparata i bojenja, primarni (selektivni) dvostruki probir, pregled prethodnog citološkog nalaza, kontrolu spremanja preparata i nalaza, cito-histološku korelaciju, kliničko-citološku korelaciju, konzultacije (diskusijski mikroskop). *Vanjska kontrola kvalitete* - do sada nema formalne sheme za stručno citološko testiranje bilo koje vrste. Najčešće je neformalna, na stručnim sastancima društva i izmjenom preparata. Postoje redovite sponzorirane vanjske procjene kvalitete rada iz područja laboratorijske hematologije IEQAS (H); ili imunotipizacije hematoloških bolesti (engl. *UK NEQAS for Leukocyte Immunophenotyping*).

6. Prenositi znanje mladima

Obrazovanje iz citologije podrazumijeva edukaciju citotehnologa i edukaciju specijalizanata, budućih citologa, te trajno usavršavanje specijalista citologa. Citotehnolozi su neizostavni dio citološkog tima, jako važan naročito u ginekološkoj citologiji u probiru na rak vrata maternice (Papa test), jer samo suspektni i patološki nalazi idu na daljnju analizu specijalistu. Uključivanje neprimjereno školovanih kadrova u citološku struku, bilo citotehnologa, bilo citologa, može dovesti do povećanja broja lažno negativnih nalaza i netočnih dijagnoza, s obzirom da će se posljedice takve odluke vidjeti tek za 5, 10 ili više godina, a odgovornost treba preuzeti mnogo ranije.

7. Pomagati kolegama u diskutabilnim slučajevima bez obzira na izgubljeno vrijeme i naknadu jer se samim time pomaže bolesniku i samoj struci

Iako u izradi citoloških nalaza postoji hijerarhija od citotehnologa, specijalizanata, mlađih i starijih citologa, ne bi se smio dogoditi presedan da citotечно-

lozi ili mlađi citolozi ne mogu dobiti pomoć starijih ili iskusnijih stručnjaka. U medicini je institucionaliziran pojam konzilija (međusobno savjetovanje liječnika radi dogovora o dijagnozi i liječenju bolesnika), citološki konzilij mora biti dio našeg rada. Posebno su u nezavidnoj situaciji kolege u manjim centrima. Na sreću, današnje komunikacije dozvoljavaju dostupnost konzultacija na više razina (direktno dolaskom u veće centre ili telecitologijom elektroničkim medijima), za što bi neposredni rukovoditelji trebali imati više razumijevanja.

8. *Izmjenjivati iskustva s kolegama drugih struka čime se postiže bolje međusobno razumijevanje*

Treba naglasiti kako je temelj za poznavanje, izvođenje i razumijevanje citoloških vještina dobro poznavanje citomorfologije. Kako bi citolog mogao izdavati nalaze razumljive i upotrebljive svim ostalim kliničarima, a i pacijentima, neophodno je da poznaje kliničke manifestacije bolesti, kao i da raspolaže svim relevantnim podacima o pacijentu, sadašnjoj i ranijim bolestima. Isto zahtijeva blisku suradnju citološkog i kliničkog odjela, odnosno citologa, bolesnika i kliničara. Klinički citolog ne može zadovoljavajuće funkcionirati bez tijesne suradnje sa kliničarima (18). Misao velikog citologa P. Lopeza Cardoza: "Točnost citološke dijagnoze obrnuto je proporcionalna s kvadratom udaljenosti između kliničara i citologa" govori kako je klinička citologija neraskidivo povezana s kliničkim strukama. To zahtijeva blisku suradnju citološkog i kliničkog odjela, odnosno citologa, bolesnika i kliničara (19). Ništa manje nije važna i suradnja s ostalim dijagnostičkim strukama: histopatologijom kao i laboratorijskom, molekularnom i citogenetskom dijagnostikom (2).

9. *Staviti interes struke ispred osobnih interesa*

Citologija je mala struka. Nije lako biti specijalist struke koja nije stereotipna i koja se ne uklapa u već ustaljene, poznate i tradicionalne specijalnosti. Većina svoj život posve posveti struci u koju se vjeruje, nesebično prenoseći znanje na sljedeće generacije. Neki pod teretom i pritiscima pokleknu i nastoje ići linijom manjeg otpora na štetu struke, a u svrhu osobnih interesa.

10. *Voljeti citologiju*

Citologija je vrlo zahtjevna struka za svakog citologa. Zahtijeva minucioznost, strpljivost te fizičku i psihičku spremnost. Minucioznost i strpljivost su potrebne u skriningu i traženju patoloških stanica gdje se često na osnovi malog broja stanica ili vrlo diskretnih promjena postavlja konačna dijagnoza. Fizička spremnost se očituje u cjelodnevnom prisilnom položaju za mikroskopom pod umjetnim svjetlom. Psihička pribranost je neophodna kod visoko rizičnih zahvata u svrhu dobivanja uzoraka te donošenja teških dijagnoza i odluka koje impliciraju diferentne terapijske zahvate. Mnogi na citologiju gledaju kao na struku koja ima definirano radno vrijeme, često slobodne vikende, u kojoj se ne dežura! Oni koji se odlučuju za tu struku zbog tih razloga se ili ne snađu u struci pa je napuštaju ili postaju nesretni. Drugi joj se posvete punim srcem bez radnog vremena, često bez slobodnih vikenda. Naša stakalca nitko neće pogledati umjesto nas, nema dežurnih koji će nastaviti započeti proces, sve što ostaje neriješeno dočeka sljedeće jutro, kada svi s nestrpljenjem (i kliničari i bolesnici) gledaju u nas čekajući dijagnozu. Kliničari, da bi znali dalje usmjeriti dijagnostički ili terapijski postupak, a bolesnici da bi u sretnijim okolnostima nastavili planirati i sanjati svoje snove. Zato se često sjetimo kliničara i citologa, „velikog“ Lopez Cardoza koji je rekao za citologiju „Love it or leave it“ (1).

L I T E R A T U R A

1. Cardozo PL. Atlas od clinical cytology. The Netherlands: Targa b.v. 's-Hertogenbosch, 1973.
2. Kardum-Skelin I, Fabijanić I, Jelić-Puškarčić B i sur. Jedna stanica - konačna dijagnoza! Gdje prestaje struka i počinje umjetnost? Acta Med Croatica 2008; 62: 334-49.
3. Kocjan G. Needle aspiration cytology of the breast: current perspective on the role in diagnosis and management. Acta Med Croatica 2008; 62: 391-401.
4. 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, 8-9.
5. Anshu, Cochand-Priollet B, Cross P, Desai M i sur. Survey of medical training in cytopathology carried out

by the editorial board of Cytopathology. Cytopathology 2010; 54: 606-9.

6. Kocjan G. Evaluation of the cost effectiveness of establishing a fine needle aspiration cytology clinic in a hospital out-patient department. Cytopathology 1991; 2: 13-8.

7. Pedio G, Landolt U, Dirsch OR. The value and limitations of aspiration cytology in the diagnosis of primary tumors: the advantage of a fine needle aspiration center. Acta Cytol 1990; 34: 906.

8. Kocjan G, Bourgain C, Fassina A i sur. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. Cytopathology 2008;19: 271-8.

9. Kocjan G. Fine needle aspiration cytology. Inadequate rates compromise success. Cytopathology 2003;14: 307-8.

10. Ganjei-Azar P. Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology. 1st ed. New York: Springer, 2006.

11. Borovecki A, Kardum-Skelin I, Sustercic D, Hitrec V, Lasan R, Jaksic. The chromosomal abnormalities and DNA image cytometry of hematologic neoplasm in the fine needle aspirates of the lymph nodes. Cytopathology 2003; 14: 320-6.

12. Kardum-Skelin I, Jelić Puškarić B, Radić-Krišto D, Jakšić O, Kardum M, Jakšić B. Multimodal image analysis of chronic leukemic lymphoproliferative disorders and the hypothesis of „single“ and „multiple“ programmed stops in the development of typical and atypi-

cal forms of leukaemias and lymphomas. Coll Antropol 2010; 34: 367-76.

13. Kardum-Skelin I, Jaksic O, Ostojic Kolonic S i sur. New parameters of diploid histogram of image DNA cytometry and newly characterized types of the nucleolar organizer region structures in defining the proliferative-kinetic index in the chronic leukemic lymphoproliferative disorders. Anal Quant Cytol Histol 2009; 31: 313-23.

14. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M i sur. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003; 17: 2257-317.

15. Lasan Trčić R, Šušterčić D, Kuspilic M, Jelić Puškarić B, Fabijanić I, Kardum-Skelin I. Recurrent chromosomal abnormalities in lymphoma in fine needle aspirates of lymph node. Coll Antropol 2010; 34: 387-93.

16. Lasan Trčić R, Kardum Skelin I, Šušterčić D i sur. Cytogenetic of multiple myeloma: short report. Coll Antropol 2010; 34: 41-4.

17. Kocjan G. Fine needle aspiration cytology: Diagnostic principles and dilemmas. Berlin - Heildeberg: Springer-Verlag, 2006.

18. Znidarčić Ž, Črepinko I, Jeren T i sur. Uloga kliničara u citološkoj dijagnozi. Lijec Vjesn 2002; 124: 360-5.

19. Znidarčić Ž, Jeren T, Kaić G i sur. Cytology in primary health care of children and adults. Coll Antropol 2010; 34: 737-48.

S U M M A R Y

WHY IS CYTOLOGY A PROFESSION (BRANCH), NOT A METHOD? TEN RULES FOR SUCCESS OF THE CYTOLOGY PROFESSION

I. KARDUM-SKELIN

*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics
and University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Clinical cytology is an interdisciplinary medical diagnostic profession that integrates clinical, laboratory and analytical fields along with final cytologist's expert opinion. Cytology involves nonaggressive, minimally invasive and simple for use procedures that are fully acceptable for the patient. Cytology offers rapid orientation, while in combination with additional technologies on cytologic smear analysis (cytochemistry, immunocytochemistry for cell marker analysis, computer image analysis) or sophisticated methods on cytologic samples (flow cytometry, molecular and cytogenetic analysis) it plays a major role in the diagnosis, subtyping and prognosis of malignant tumors. Ten rules for successful performance in cytology are as follows: 1) due knowledge

of overall cytology (general cytologist); 2) inclusion in all stages of cytologic sample manipulation from sampling through reporting; 3) due knowledge of additional technologies to provide appropriate interpretation and/or rational advice in dubious cases; 4) to preserve dignity of the profession because every profession has its advantages, shortcomings and limitations; 5) to insist on quality control of the performance, individual cytologists and cytology team; 6) knowledge transfer to young professionals; 7) assisting fellow professionals in dubious cases irrespective of the time needed and fee because it implies helping the patient and the profession itself; 8) experience exchange with other related professionals to upgrade mutual understanding; 9) to prefer the interest of the profession over one's own interest; and 10) to love cytology.

Key words: clinical cytology, education, additional technologies, quality control

ZNAČENJE AKREDITACIJE KLINIČKIH LABORATORIJA U TRANSPLANTACIJSKOJ MEDICINI

ZLATA FLEGAR-MEŠTRIĆ^{1,3}, AIDA NAZOR¹, SONJA PERKOV¹,
BRANKA ŠURINA¹, ZORAN ŠIFTAR¹, IVAN OŽVALD¹ i ŽELJKO VIDAS³

*Klinička bolnica Merkur, ¹Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, ²Služba za urologiju
i ³Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Hrvatska*

Uloga kliničkog laboratorija u transplantacijskoj medicini vrlo je značajna u postupku kliničke procjene statusa primatelja i davalca prije transplantacije, u praćenju statusa bolesnika tijekom transplantacije organa, praćenju funkcije organa i optimiziranju individualne terapije nakon transplantacije. U okviru KB Merkur provodi se transplantacija abdominalnih organa i krvotvornih matičnih stanica za koje se program općih, specijalističkih i visokodiferentnih biokemijskih, hematoloških, imunoloških i koagulacijskih laboratorijskih pretraga velikim dijelom provodi u Zavodu za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu KB Merkur, 2003. g. certificiranom prema normi ISO 9001 i 2007.g., akreditiranom prema normi ISO 15189: Medicinski laboratoriji - Posebni zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost, za područja kliničke kemije, laboratorijske hematologije i koagulacije, laboratorijske imunologije-imunofenotipizacije stanica i molekularne dijagnostike. U laboratorijskoj dijagnostici posebno se izdvaja intraoperacijsko praćenje biokemijskih parametara tijekom transplantacije jetre, mjerenjem pH i plinova u krvi, koncentracije ioniziranih elektrolita (kalij, natrij, magnezij) i laktata. Uspješnost transplantacijskog liječenja zahtijeva multidisciplinarni pristup i stalnu suradnju i odgovornost brojnih kliničkih ali i laboratorijskih struka: imunologije, transfuziologije, patologije, medicinske biokemije i drugih. Postignutim rezultatima i članstvom u Eurotransplantu hrvatska transplantacijska medicina dokazala je da ispunjava sve europske kriterije kvalitete u čemu je akreditacija laboratorijske dijagnostike prema međunarodnim standardima dala nesumnjiv doprinos.

Ključne riječi: akreditacija medicinskih laboratorija, mjeriteljska sljedivost, transplantacijska medicina, presađak, reakcija odbacivanja

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Zlata Flegar-Meštrić, spec. med. biokemije
Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19,
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: zlata.mestri@gmail.com

UVOD

Međunarodna norma za uvođenje sustava upravljanja kvalitetom u medicinske laboratorije i njihovu akreditaciju ISO 15189: Medicinski laboratoriji – Posebni zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost, objavljena je 2003. godine, a namijenjena je medicinskim laboratorijima koji obuhvaćaju laboratorije za biološka, mikrobiološka, imunološka, kemijska, imunohematološka, hematološka, biofizikalna, citološka, patološka i druga ispitivanja humanog materijala u svrhu postavljanja dijagnoze, prevencije, praćenje tijeka liječenja bolesti ili za procjenu zdravlja ljudi (1). Prema politici Međunarodne or-

ganizacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (*The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine - IFCC*) osnovna svrha akreditacije medicinskih laboratorija je rad prema najvišim stručnim standardima što je u interesu pacijenata i društva u cjelini jer se odluke o dijagnozi, prognozi i načinu liječenja vrlo često donose temeljem laboratorijskih pretraga pri čemu svaki pogrešan rezultat može imati vrlo teške i nepopravljive posljedice (2). Akreditacijom se uspostavlja povjerenje u kvalitetu rezultata laboratorijskih pretraga i stvaraju preduvjeti za međulaboratorijsku usporedivost i prihvaćanje laboratorijskih nalaza na međunarodnoj razini.

Razvoj transplantacijske medicine koja je danas dio standardne zdravstvene skrbi, omogućio je očuvanje života i zdravlja mnogih teških bolesnika. Mogućnost presađivanja organa i tkiva onim bolesnicima kojima je to najpotrebnije u značajnoj mjeri ovisi o dobro reguliranoj međunarodnoj suradnji u području uzimanja, presađivanja i razmjene potrebnih organa i tkiva. U tu svrhu Hrvatska je 2007. g. postala punopravna članica međunarodne organizacije za razmjenu organa *Eurotransplant International Foundation*, www.eurotransplant.org (EIF).

Uloga kliničkog laboratorija u transplantacijskoj medicini vrlo je značajna u postupku kliničke procjene statusa primatelja i davatelja prije transplantacije, u praćenju statusa bolesnika tijekom transplantacije organa i praćenju funkcije organa i optimiziranju individualne terapije nakon transplantacije (3,4).

U okviru Kliničke bolnice Merkur provodi se transplantacija abdominalnih organa i krvotvornih matičnih stanica za koje se program općih, specijalističkih i visokodiferentnih biokemijskih, hematoloških, imunoloških i koagulacijskih laboratorijskih pretraga velikim dijelom provodi u Zavodu za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, 2003. g. certificiranom prema normi ISO 9001 i 2007. g. akreditiranom prema normi ISO 15189 za područja kliničke kemije, laboratorijske hematologije i koagulacije, laboratorijske imunologije-imunofenotipizacije stanica i molekularne dijagnostike (5).

Cilj rada bio je kroz iskustva Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur prikazati značenje akreditacije medicinsko-biokemijske dijagnostike u području transplantacijske medicine.

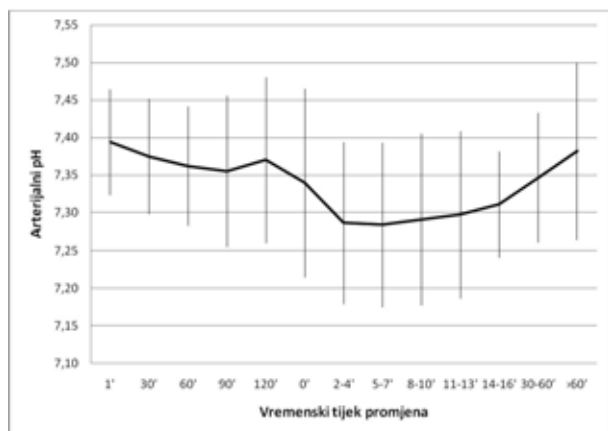
MATERIJAL I METODE

Program transplantacije jetre u Kliničkoj bolnici Merkur provodi se od 1998. godine, te se broj transplantiranih pacijenata progresivno povećava i danas je preko 500. Tijekom transplantacije jetre određivani su parametri acidobaznog stausa, ioni-

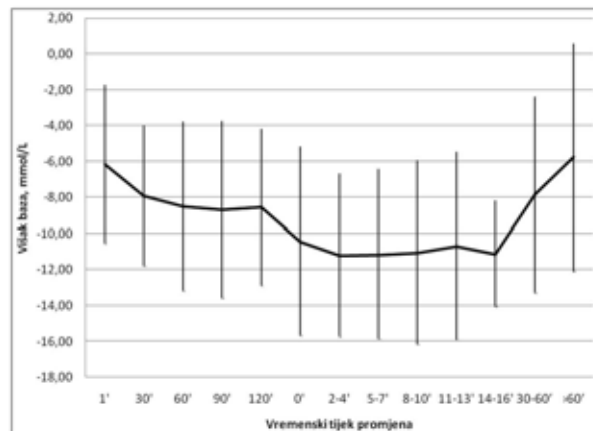
zirani kalcij, ionizirani magnezij i laktat na acidobaznom analizatoru *Stat Profile Critical Care Xpress* tvrtke Nova Biomedical, u uzorcima pune arterijske krvi, neposredno nakon uzorkovanja. Statističkom obradom provedenih ispitivanja obuhvaćeno je 68 pacijenata u dobi od 49 do 68 godina. Analitička pouzdanost dobivenih rezultata potvrđena je kroz sustav unutrašnje kontrole kvalitete korištenjem komercijalnih kontrolnih uzoraka i sustava vanjske procjene kvalitete u okviru međunarodne sheme „*Acid-base Status and Electrolytes*“ koju četiri puta godišnje provodi *Labquality - WHO Collaborating Centre for Education and Training in Laboratory Quality Assurance*, Finska i u okviru nacionalne sheme koju 3 puta godišnje provodi Povjerenstvo za vanjsku procjenu kvalitete rada Hrvatskog društva medicinskih biokemičara. Sve medicinsko-biokemijske pretrage koje se određuju u predtransplantacijskom razdoblju, tijekom transplantacije jetre i u posttransplantacijskom razdoblju akreditirane su prema međunarodnoj normi ISO 15189: Medicinski laboratoriji - Posebni zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost (1).

REZULTATI

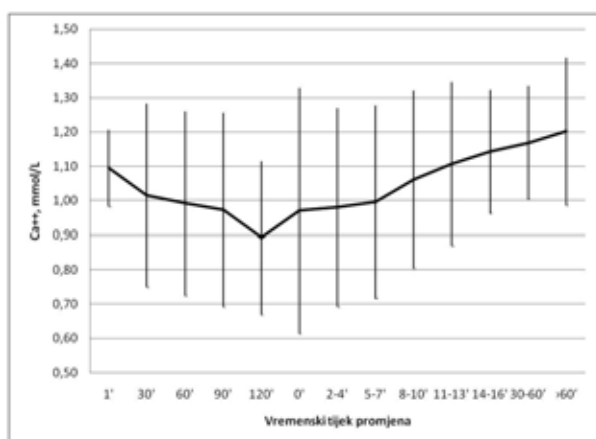
Rezultati statističke obrade intraoperativnog mjerenja acido-baznog statusa, ioniziranog kalcija, ioniziranog magnezija i laktata tijekom transplantacije jetre prikazani su grafički kao srednja vrijednost i raspon vrijednosti za sve ispitivane pretrage u odnosu na vremenski tijek promjena (sl. 1-5). Rezultati za acido-bazni status prikazani na sl. 1 i 2 pokazuju postupno smanjene pH i koncentracije titrabilnih baza s najnižim vrijednostima u anhepatičkoj fazi i u prvim minutama (1 do 7 minuta) nakon uspostavljanja protoka krvi u presatku. Uspostavljanjem funkcije presatka tijekom prvih 60 minuta, acido-bazni status se postepeno normalizira s koncentracijama u području referentnih intervala za pH od 7,31 do 7,42 pH jedinica i koncentracijom titrabilnih baza u intervalu od -2 do 3 mmol/L. Na sl. 3 prikazani su rezultati dinamičkog praćenja koncentracije ioniziranog kalcija koja se značajno smanjuje kao posljedica povišene koncentracije egzogenog citrata. Tijekom 60 minuta nakon uspostave funkcije presatka koncentracije ioniziranog kalcija postupno se vraćaju u područje referentnih intervala



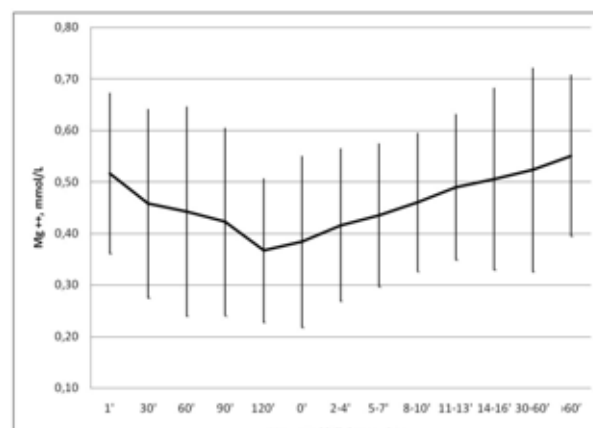
Sl. 1. Transplantacija jetre. Tijek promjena arterijskog pH.



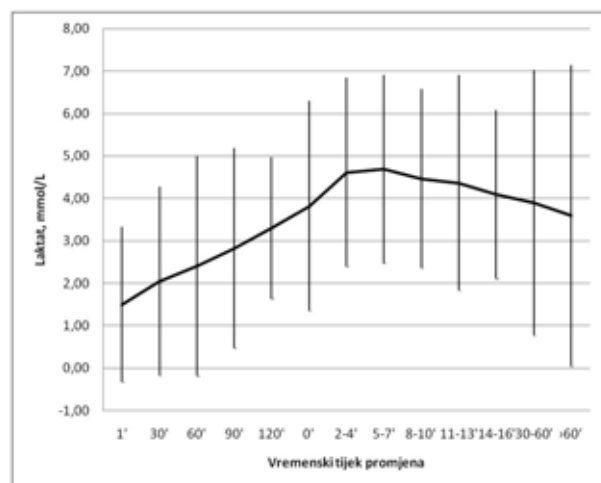
Sl. 2. Transplantacija jetre. Tijek promjena arterijalne koncentracije titrabilnih baza.



Sl. 3. Transplantacija jetre. Tijek promjena koncentracije ioniziranog kalcija (mmol/L) u uzorcima arterijske krvi



Sl. 4. Transplantacija jetre. Tijek promjena koncentracije ioniziranog magnezija (mmol/L) u uzorcima arterijske krvi



Sl. 5. Transplantacija jetre. Tijek promjena koncentracije laktata (mmol/L) u uzorcima arterijske krvi

od 1,18 do 1,32 mmol/L. Intraoperativne promjene koncentracije ioniziranog magnezija identične su kao i za ionizirani kalcij s najnižim koncentracijama u anhepatičkoj fazi i postupnim porastom nakon uspostavljanja protoka krvi u presatku, u područje referentnih intervala od 0,43 do 0,59 mmol/L (sl. 4). Tijekom anhepatičke faze i prvim minutama nakon uspostavljanja cirkulacije u presatku (1-7 minuta) dolazi do progresivnog porasta koncentracije laktata (sl. 5), koja se uspostavom metaboličke funkcije nove jetre postepeno stabilizira.

RASPRAVA

Laboratorijska dijagnostika u predtransplantacijskom razdoblju

U predtransplantacijskom razdoblju potrebno je objektivno procijeniti zdravstveni status bolesnika i utvrditi postoji li indikacija za liječenje transplantacijom (6,7). Procjena statusa primatelja i davatelja mora slijediti utvrđene standarde za svaku vrstu organa, tkiva ili stanica, mora biti cjelovita, pravodobna i učinkovita. Svaki bolesnik za kojeg se postavi indikacija za liječenje transplantacijom prolazi standardiziranu obradu i pripremu za transplantaciju u okviru koje su uključene i brojne laboratorijske pretrage jer svaka promjena zdravstvenog stanja može utjecati na odluku o transplantaciji. Program laboratorijskih pretraga ovisit će o vrsti presatka, pri čemu standardni panel uključuje rutinske biokemijske pretrage (elektroliti i acido-bazna ravnoteža), biomarkere funkcije jetre (aspartat-aminotransferaza, alanin-aminotransferaza, g-glutamyl transferaza, bilirubin, albumin), funkcije bubrega (kreatinin, brzina glomerularne filtracije), koštani status (kalcij, magnezij, fosfati, alkalna fosfataza), lipidni status (kolesterol, trigliceridi, HDL-kolesterol), homeostazu glukoze, kompletnu krvnu sliku i koagulacijski profil (protrombinsko vrijeme, aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, trombociti). Sudjelovanjem Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur u nacionalnom programu vanjske procjene kvalitete u organizaciji Hrvatskog društva medicinskih biokemičara (8) i međunarodnim shemama za opću i specijalnu medicinsku biokemiju u organizaciji WHO-UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Scheme*) i LAB-QUALITY (*WHO Collaborating Centre for Education and Training Laboratory Quality Assurance, Finland*) potvrđuje se klinička pouzdanost rezultata laboratorijskih pretraga uključenih u transplantacijski program.

Iako je transplantacija solidnih organa postala standardizirana metoda liječenja, transplantacija jetre izniman je multidisciplinarni klinički postupak koji zahtijeva razumijevanje specifičnih patofizioloških promjena koje obilježavaju završni stadij jetrene bolesti. Procjenjivanje rizika smrtnosti takvih bolesnika provodi se prema bodovanju tzv. MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*) bodovanju (9).

MELD je matematička funkcija koja uključuje sljedeće laboratorijske pretrage: bilirubin, kreatinin i INR (International Normalized Ratio). Različiti rezultati laboratorijskih pretraga ovisno o primijenjenoj laboratorijskoj metodologiji mogu dati značajno različit broj bodova na ljestvici MELD. Kako se tim sustavom procjenjuje težina zatajenja jetre i time određuje koji bolesnici moraju najranije primiti jetru, broj MELD bodova mora osigurati jednaki status bolesnika na listi čekanja za transplantaciju jetre bilo gdje u svijetu (10). Da laboratorijska metodologija ne bi kompromitirala navedeni sustav bodovanja, rezultati laboratorijskih pretraga moraju biti usporedivi neovisno o geografskom području na kojem su određeni, primijenjenoj metodologiji ili analitičkoj opremi, što se značajnim dijelom osigurava kroz uspostavu referentnih mjernih sustava (11) i akreditaciju laboratorijske dijagnostike prema međunarodnom standardu ISO 15189.

Intraoperativna laboratorijska dijagnostika tijekom transplantacije jetre

Posebno se ističe uloga kliničkog laboratorija u intraoperativnom praćenju transplantacije jetre. Laboratorij mora osigurati stalno mjerenje kritičnih pretraga među kojima je najvažnije praćenje elektrolitskog i acido-baznog statusa bolesnika, te praćenje metabolizma i funkcije presatka sukladno individualnom statusu bolesnika.

Za većinu pacijenata u završnoj fazi jetrene bolesti koji su pod odgovarajućom terapijom laboratorijski nalazi za parametre acidobaznog-statusa su u području referentnih intervala. Tijekom transplantacije jetre promjene acido-baznog statusa su bifazične pri čemu inicijalnu fazu obilježava metabolička acidoza zbog nakupljanja laktata koja postepeno prelazi u metaboličku alkalozu u razdoblju nakon kirurškog postupka (12). Porast koncentracije laktata je rezultat anaerobne glikolize nastale u trenutku uklanjanja bolesne jetre kada potrebe za kisikom nadmašuju opskrbu kisikom. Nakon reperfuzije brzi porast klirensa laktata odličan je pokazatelj stabilne inicijalne funkcije i odgovarajuće veličine presatka (13,14). Naši rezultati prikazani na slikama 1, 2 i 5 potvrđuju inicijalnu laktatnu acidozu koja se uspostavom funkcije presatka postepeno normalizira eliminacijom vodikovih iona uz

istodobno smanjenje koncentracije laktata. Smatra se da je koncentracija citrata u bolesnika sa završnim stadijem jetrene bolesti unutar referentnih intervala, ali se može značajno povećati zbog potrebe korištenja transfuzija citratne krvi. Ionizirani kalcij i magnezij se vežu na citrat, te je zbog održavanja kardiovaskularne ravnoteže vrlo značajno njihovo učestalo intraoperativno praćenje (15-17). Naši rezultati dobiveni određivanjem koncentracije ioniziranog kalcija i magnezija u uzorcima arterijske krvi (18-20) potvrđuju da su koncentracije ioniziranog kalcija i magnezija najniže tijekom uklanjanja bolesne jetre (anhepatička faza), ali se brzim klirensom citrata koji započinje neposredno nakon uspostavljanja funkcije presatka, krajem transplantacijskog postupka vraćaju u područje referentnih intervala (sl. 3, 4). Brzo i učinkovito intraoperativno praćenje hematoloških pretraga i koagulacijskog statusa pomoć je u otkrivanju uzroka mogućeg krvarenja i posljedičnih komplikacija tijekom transplantacijskog postupka.

Laboratorijska dijagnostika u posttransplantacijskom razdoblju

U posttransplantacijskom razdoblju značenje laboratorijske dijagnostike najveće je u dijelu ranog praćenja funkcije transplantata, praćenja imunosupresivne terapije i njezinih nuspojava, te razvoja mogućih komplikacija od kojih je najteža komplikacija reakcija odbacivanja, tj. reakcija transplantata protiv primatelja (21). Odgovor primatelja moguće je kontrolirati imunosupresivnom terapijom čime se u većine bolesnika sprječava odbacivanje transplantiranog organa i značajno produžuje život (4). Kako imunosupresivni lijekovi potiskuju ukupan imunološki odgovor organizma nakon transplantacije bolesnici su skloni razvoju različitih komplikacija (infekcija, nefrotoksičnost, demineralizacija kostiju, metaboličke bolesti). U tom je razdoblju laboratorijska dijagnostika odbacivanja transplantata i praćenje imunološkog odgovora nakon transplantacije od posebne važnosti. Smjernice za praćenje terapije imunosupresivnim lijekovima s obzirom na jačinu i incidenciju nuspojava zbog njihove toksičnosti definiraju kriterije prihvatljivosti laboratorijskih rezultata za koncentraciju lijeka unutar ukupne dozvoljene analitičke pogreške od 10%, uz specifičan program osiguranja kvalitete (3,22). Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu

Kliničke bolnice Merkur uz praćenje i nadzor svih laboratorijskih procesa kroz uspostavljeni sustav unutrašnje kontrole kvalitete, uključen je u vanjsku neovisnu procjenu kvalitete u organizaciji UK NEQAS (*United Kingdom Mycophenolate International Proficiency Testing Scheme*) za koncentraciju mikofenolata, te DGKL (*Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriums-medicin e.V., Bonn, Germany, RfB, Referenzinstitut für Bioanalytik*) za koncentraciju ciklosporina i takrolimusa. Pouzdanost analitičkog praćenja imunološkog odgovora primjenom metode protočne citometrije potvrđuje se dugogodišnjim sudjelovanjem u shemama vanjske procjene kvalitete u organizaciji UKNEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leukocyte Immunophenotyping*) (23).

U cilju što kvalitetnijeg i učinkovitijeg praćenja statusa zdravlja bolesnika s transplantatom u posttransplantacijskom razdoblju Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur uvođenjem laboratorijskog informatičkog sustava osigurao je za ambulantne bolesnike izdavanje rezultata laboratorijskih pretraga iz transplantacijskog programa uključujući imunosupresivnu terapiju u vremenu od 5 do 6 sati od uzorkovanja do izdavanja nalaza, što je na razini međunarodnih iskustava (24). Tijekom hospitalizacije svi rezultati se pohranjuju u laboratorijsku bazu podataka iz koje su u svrhu longitudinalnog praćenja funkcionalnog statusa transplantiranih organa te individualizacije imunosupresivne terapije, stalno dostupni ovlaštenom kliničkom osoblju.

ZAKLJUČAK

Uspješnost transplantacijskog liječenja zahtijeva interdisciplinarni pristup uz stalnu suradnju i odgovornost brojnih kliničkih ali i laboratorijskih stručnjaka: imunologije, transfuziologije, patologije, medicinske biokemije i drugih. Postignutim rezultatima i članstvom u Eurotransplantu, Hrvatska transplantacijska medicina dokazala je da ispunjava sve europske kriterije kvalitete u čemu je akreditacija medicinsko-biokemijske dijagnostike prema međunarodnim standardima dala nesumnjiv doprinos.

L I T E R A T U R A

1. HRN EN ISO 15189:2008. Medical laboratories. Particular requirements for quality and competence.
2. www.ifcc.org/ Principles of Clinical Laboratory Accreditation. Datum pristupa informaciji 25. veljače 2011.
3. Müller MM, Andert SE. Laboratory monitoring of the allograft recipient, U: Thomas L, ur. Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. Frankfurt/Main: TH-Books, 1998:870-6.
4. Labar B, Pasini J. Liječenje transplantacijom, U: Vrhovac B i sur, ur. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak, 1997.
5. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Perkov S i sur. Accreditation of medical laboratories in Croatia - experiences of the Institute of clinical chemistry, University Hospital Merkur, Zagreb. Coll Antropol 2010; 34: 181-6.
6. Murray KF, Carithers RL Jr. AASLD practice guidelines: evaluation of the patient for liver transplantation. Hepatology 2005; 41:1407-32.
7. Bušić M, ur. Vodič za kvalitetu i sigurnost u transplantaciji organa, tkiva i stanica. Prevela Tihana Sudar. 1. izd. Zagreb: Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske, Logopress d.o.o., Zagreb, Hrvatska, 2004.
8. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Parag G, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. Ciljevi analitičke kvalitete u vanjskoj procjeni kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj. Biochemia Medica 2005; 15: 15-25.
9. Coombes JM, Trotter JF. Development of the Allocation System for Deceased Donor Liver Transplantation. Clin Med Res 2005; 3: 87-92 .
10. Trotter JF, Brimhall B, Arjal R, Phillips C. Specific Laboratory Methodologies Achieve Higher Model for Endstage Liver Disease (MELD) Scores for Patients Listed for Liver Transplantation. Liver Transplantation 2004; 10: 995-1000.
11. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Šimonović B, Juretić D. Applicability of common reference intervals for serum creatinine concentrations to the Croatian population. Clin Chem Lab Med 2010; 48: 231-5.
12. Krenn Claus-Georg, De Wolf AM. Current approach to intraoperative monitoring in liver transplantation. Current Opinion in Organ Transplantation 2008; 13: 285-90.
13. Nishimura A, Hakamada K, Narumi S i sur. Intraoperative blood lactate level as an early predictor of initial graft function in human living donor liver transplantation. Transplantation Proc 2004; 36: 2246-8.
14. Kost GJ, Nguyen TH, Tang Z. Whole-blood glucose and lactate. Trailayer biosensors, drug interference, metabolism and practice guidelines. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 1128-34.
15. Külpmann WR, Rademacher E, Bornscheuer A. Ionized magnesium concentration during liver transplantation, resection of the liver and cardiac surgery. Scand J Clin Lab Invest 1996; 56, Suppl.224: 235-43.
16. Scott VL, De Wolf AM, Kang Y i sur. Ionized hypomagnesemia in patients undergoing orthotopic liver transplantation: A complication of citrate intoxication. Liver Transplantation and Surgery 1996; 2: 343-7.
17. Díaz J, Acosta F, Parrilla P i sur. Correlation among ionized calcium, citrate and total calcium levels during hepatic transplantation. Clin Biochem 1995; 28: 315-7.
18. Flegar-Meštrić Z, Perkov S. Comparability of point-of-care whole-blood electrolyte and substrate testing using a Stat Profile Critical Care Xpress analyzer and standard laboratory methods. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 898-903.
19. Ben Rayana MC, Burnett RW, Covington AK i sur. (IFCC Scientific Division, Committee on Point of Care Testing). Guidelines for sampling, measuring and reporting ionized magnesium in undiluted serum, plasma or blood. Clin Chem Lab Med 2005; 43: 564-9.
20. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Approved IFCC Recommendations on Whole blood Sampling, Transport and Storage for Simultaneous Determination of pH, Blood Gases and Electrolytes. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33: 247-53.
21. Hickam PE, Potter JM, Pesce AJ. Clinical chemistry and post-liver-transplant monitoring. Clin Chem 1997; 43: 1546-54.
22. Steele BW, Wang E, Palomaki GE i sur. An Evaluation of Analytical Goals for Assays of Drugs. Arch Pathol Lab Med 2001; 125: 730-5.
23. Šiftar Z, Kardum Paro MM, Sokolić I, Nazor A, Flegar-Meštrić Z. External quality assessment in clinical cell analysis by flow cytometry. Why is it so important? Coll Antropol 2010; 34: 207-17.
24. Staes CJ, Evans RS, Rocha B i sur. Computerized Alerts Improve Outpatient Laboratory Monitoring of Transplant Patients. J Am Med Inform Assoc 2008; 15: 324-32.

S U M M A R Y

THE PURPOSE OF CLINICAL LABORATORY ACCREDITATION IN TRANSPLANTATION MEDICINE

Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ^{1,3}, A. NAZOR¹, S. PERKOV¹, B. ŠURINA¹, Z. ŠIFTAR¹, I. OŽVALD¹
and Ž. VIDAS²

¹Merkur University Hospital, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, ²Department of Urology and ³University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

Although transplantation of solid organs has become a more standardized method of treatment, liver transplantation represents an exceptional multidisciplinary clinical procedure requiring understanding of specific pathophysiological changes that occur in the end stage of liver disease. Liver transplantation has been performed at Merkur University Hospital since 1998, with 360 transplantations performed to date. The most common indications are alcohol liver disease, cirrhosis caused by hepatitis B and C virus, hepatocellular carcinoma and cryptogenetic liver cirrhosis. Laboratory tests required for liver transplantation are performed at Department of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, accredited according to ISO 15189 in 2007 for the areas of clinical chemistry, laboratory hematology and coagulation, laboratory immunology-cell immunophenotyping, and molecular diagnosis. The complexity of liver transplant patients requires constant interaction between the anesthesiologist team and clinical laboratory, which has to ensure fast and efficient intraoperative monitoring of biochemical and liver profile: electrolytes and acid-base status, complete blood count, coagulation profile and monitoring of graft function according to the individual patient's health status. Dynamics of intraoperative changes is measured in whole arterial blood samples on a Nova Biomedical Stat Profile Critical Care Xpress mobile acid-base analyzer. Frequent monitoring of ionized calcium and magnesium levels is very important because of citrated blood transfusion and for appropriate therapeutic procedure. During anhepatic stage, there is a progressive increase in lactate level concentration. After reperfusion, a rapid increase in lactate clearance is an excellent indicator of stable graft initial function and its adequate size. During the transplantation procedure, there is usually a biphasic acid-base disturbance characterized by metabolic acidosis and then by metabolic alkalosis. The loss of base equivalents starts during the dissection stage and accelerates during the anhepatic stage. Fast and efficient intraoperative monitoring of hematological tests and coagulation status is of great help in detecting the cause of possible hemorrhage and consequential complications during transplantation procedure. The possibility of organ and tissue transplantation mostly depends on well regulated international cooperation in the areas of donating, transplanting and exchange of required organs and tissues, while laboratory test results must be comparable regardless of their geographical area, methodology employed or analytical equipment used, which is mainly warranted through accreditation according to the international ISO 15189 standard.

Key words: accreditation of medical laboratories, metrological traceability, transplantation medicine, graft, rejection reaction

NEKLASIFICIRANA MIJELOPROLIFERATIVNA NEOPLAZMA - MORFOLOŠKE, CITOGENETSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE

ANA BOROVIČKI¹, ANITA ŠKRTIĆ^{1,4}, MIRJANA MARIANA KARDUM PARO²,
RUŽICA LASAN³ i MARA DOMINIS^{1,4}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinički zavod za patologiju i citologiju, ²Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, ³Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za pedijatriju, Citogenetski laboratorij i ⁴Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Mijeloproliferativna neoplazma koju se ne može klasificirati (MPN,U) se morfološki, klinički, laboratorijski i molekularno citogenetski ne uklapa ni u jedan podtip MPN. S obzirom na preklapajuće karakteristike, u 10 bolesnika s MPN,U analizirana je učestalost morfoloških karakteristika, citogenetskih promjena, prisutnost *BCR-ABL1* i mutacije *V617F JAK2*. Nađene morfološke karakteristike su trilinejska proliferacija stanica mijelopoeze, difuzno smješteni megakariociti blage do umjerene pleomorfije, zrelih jezgara, bez umnažanja retikulina. Svi slučajevi su bili *BCR-ABL1* negativni, *V617F JAK2* mutacija je nađena u šest od osam analiziranih slučajeva. U dva je slučaja prisutna trisomija 8, u jednom t(6;12)(q12;p13). U analiziranim slučajevima MPN,U morfološke promjene najbližije su dijagnostičkim morfološkim kriterijima za policitemiju veru, iako morfologija megakariocita ne odgovara. Visoka učestalost *V617F JAK2* mutacije utvrđuje nepovezanost mutacije sa specifičnim fenotipom, te za konačnu dijagnozu treba uzeti u obzir morfološke, kliničke i laboratorijske karakteristike.

Ključne riječi: MPN,U; *V617F JAK2*, kromosomske promjene

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Ana Borovečki, dr. med.
Klinički zavod za patologiju i citologiju
KB Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: anaborov@yahoo.com

UVOD

Mijeloproliferativne neoplazme (MPN) su klonalne bolesti matične hematopoetske stanice morfološki karakterizirane efektivnom nereguliranom proliferacijom cirkulirajućih prijelaznih i/ili zrelih oblika granulopoeze, eritrocita i trombocita, samih ili u kombinaciji, bez znakova displazije i monocitoze (1). Klinički su karakterizirane dugotrajnim tijekom te različitom učestalosti pojave arterijske i venske tromboze, ekstramedularne hematopoeze s prisutnom hepatomegalijom ili splenomegalijom, te fibroze i transformacije u akutnu leukemiju. Unutar skupine MPN određene u novoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2008. godine, razlikujemo kroničnu mijeloičnu leukemiju (KML)

BCR-ABL1 pozitivnu, te ostale bolesti koje su *BCR-ABL1* negativne i uključuju policitemiju veru (PV), esencijalnu trombocitemiju (ET), primarnu mijelofibrozu (PMF), kroničnu neutrofilnu leukemiju (CNL), kroničnu eozinofilnu leukemiju, ne drugačije specificiranu (CEL, NOS), mastocitozu i neklasificiranu mijeloproliferativnu neoplazmu (MPN,U) (1).

Fenotipske karakteristike MPN uvjetovane su specifičnim citogenetskim translokacijama ili mutacijama gena (2). KML je jasno definirana bolest s karakterističnim morfološkim, kliničkim, laboratorijskim nalazima te prisutnošću *BCR-ABL1* fuzijskog gena. Skupina *BCR-ABL1* negativnih tzv.

klasičnih MPN - PV, ET i PMF, karakterizirana je prisutnošću aktivirajućih točkastih mutacija V617F i exon 12 Janus kinase 2 (*JAK2*) gena i mutacijama W515L/K *MPL* gena. *JAK2* mutacije prisutne su u gotovo svih bolesnika s PV, 60% bolesnika s ET i 50% bolesnika s PMF. *MPL* W515L/K mutacije prisutne su u malom broju bolesnika s ET i PMF (3-5). Prisutnost navedenih mutacija ne pomaže u podklasifikaciji MPN, ali dokaz je klonalnosti i dijagnoze MPN, dok njihova odsutnost ne isključuje dijagnozu (6).

Klonalne citogenetske promjene javljaju se s različitom učestalošću 3-40% ovisno o podtipu MPN. Bolesnici s PMF pokazuju najveću učestalost 40% i složenost citogenetskih promjena, zatim slijede bolesnici s PV 35%, bolesnici s MPN,U 20-33%, te bolesnici s ET 3%. Najčešće nađene citogenetske promjene su trisomija 9, trisomija 8, delecije 20q i 13q (6).

Određeni novi dijagnostički kriteriji i algoritmi, uz analizu morfoloških karakteristika koštane srži i molekularno citogenetsku analizu čine osnovu nove klasifikacije SZO MPN. Iako su morfološke karakteristike osnova klasifikacije, postoje slučajevi neklasificiranih MPN koji se morfološki, klinički, laboratorijski i citogenetski ne uklapaju ni u jedan podtip MPN. Prema definiciji MPN,U morfološki se može raditi o ranom stadiju PV, ET ili PMF bez prisutnih karakterističnih promjena, uznapredovalom stadiju MPN s izraženom fibrozom ili znakovima transformacije, te prisutnim drugim neoplastičnim ili upalnim promjenama koje zaklanjaju kliničke ili morfološke karakteristike (1).

Cilj ovog rada je analizirati učestalost pojedinih morfoloških karakteristika MPN,U, njihovih citogenetskih promjena, prisutnost *BCR-ABL1* i mutacije V617F *JAK2* gena.

BOLESNICI I METODE

U razdoblju 2005.-2010. godine u KB Merkur dijagnosticirano je ukupno 29 bolesnika s MPN,U pre-

ma kriterijima klasifikacije SZO iz 2008. godine. Od navedenih 29 bolesnika, devet bolesnika je liječeno u KB Merkur i jedan u KB Dubrava s dostupnim kliničkim i laboratorijskim podacima. Ostali bolesnici su liječeni u drugim bolnicama te su klinički i laboratorijski podaci nedostupni.

Morfološka analiza rađena je na standardnim histološkim rezovima biopsija koštane srži, uzetih prilikom postavljanja dijagnoze bolesti i prije početka liječenja, obojenih hemalaun-eozin, Giemsa, berlinsko modriilo, PAS, Gömöri i Masson metodom.

Citogenetska analiza rađena je na kratkotrajnim kulturama aspirata koštane srži (7). Korištena je standardna tripsin-Giemsa metoda pruganja visoke rezolucije (8). Kromosomske promjene opisane su prema *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN, 1995 (9).

Standardna metoda alel-specifičnog PCR korištena je za otkrivanje točkaste mutacije V617F u genu tirozin kinaze *JAK2* (10).

U ispitivanim uzorcima standardiziranim protokolom RT-PCR analiziran je fuzijski prijepis gena *BCR-ABL1* koji kodira protein p210, odnosno protein p190 (11).

REZULTATI

Rezultati morfološke analize biopsija koštane srži bolesnika s neklasificiranom kroničnom mijeloproliferativnom neoplazmom prikazani su u tablici 1. U svim analiziranim biopsijama koštana srž je bila hipercelularna s prisutnom trilinejskom proliferacijom eritropoeze, granulopoeze te megakariocita, osim u slučaju 2 i 3 u kojima je prisutna bilinijska proliferacija granulopoeze i megakariocita. Ni u jednom slučaju nije prisutno umnažanje nezrelih oblika niti znakovi displazije. Početno blago umnažanje retikulina bez umnažanja kolagena prisutno je u slučajevima 3 i 10. Oskudno ekstrahemoglobinsko željezo prisutno je u slučajevima 1, 3 i 6, dok je u ostalim

Tablica 1.

Morfološke karakteristike biopsija koštane srži u bolesnika s neklasificiranom mijeloproliferativnom neoplazmom (MPN,U)

Bolesnici		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Celularnost		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Retikulin		-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Kolagen		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe		+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Eritropoeza	brojnost	↑	↓	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Granulopoeza	brojnost	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Megakariociti	brojnost	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	nakupine	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	difuzno	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pleomorfizam	++	+	++	+	+	+	++	++	+	++
	veličina	=↑	=↓	=↑	=↑	=↑	=↑↓	=↑	=↑↓	=↓	=↑
	jezgre zrele	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	jezgre nezrele	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-

+ pozitivno, prisutno; - negativno, odsutno; = normalno; ↑ povišeno, povećano; ↓ sniženo, smanjeno.

Tablica 2.

Laboratorijski, klinički nalazi, rezultati citogenetske analize, nalaz BCR-ABL1 i mutacije V617F/JAK2 u bolesnika s neklasificiranom mijeloproliferativnom neoplazmom (MPN,U)

Bolesnici	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Spol / dob	M/26	M/59	M/77	M/76	M/73	M/79	Ž/23	M/39	Ž/57	M/80
E x10 ¹² /L	5,56	∅	4,84	6,42	6,52	4,55	4,98	∅	5,89	3,79
Hb g/L	168	∅	105	155	187	142	149	∅	178	96
Htc L/L	0,48	∅	0,37	0,49	0,55	0,43	0,44	∅	0,56	0,32
L x10 ⁹ /L	8,04	∅	28,0	14,45	9,97	7,06	19,39	∅	6,30	12,10
Tr x10 ⁹ /L	620	∅	402	882	325	579	470	∅	307	57
Slezena	↑	∅	↑	=	=	=	=	∅	=	↑
Jetra	=	∅	=	=	=	=	=	∅	=	=
Kariogram	∅	*	∅	46,xy	∅	46,xy	46,xx	46,xy	46,xx	**
BCR-ABL1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V617F JAK2	∅	∅	+	+	+	+	+	+	-	-

+ pozitivno; - negativno; = normalno; ↑ povećano; ∅ nije rađeno, nepoznati rezultati; * 47,xy,t(6;12) (q12;p13), +8[10],46,xy[2]; **47,xy, +8,inv(9)c[10]/46,xy,inv(9)c[5].

slučajevima ekstrahemoglobinsko željezo negativno. U svim slučajevima prisutno je umnažanje megakariocita blago do umjereno pleomorfnih, koji su smješteni difuzno u intertrabekularnim prostorima tek mjestimice u manjim nakupinama (slučaj 3, 4 i 6). U većini slučajeva uz megakariocite uredne morfološke prisutni su i krupni oblici, dok su u četiri slučaja prisutni i sitni megakariociti (slučaj 2, 6, 8 i 9). Svi megakariociti su zrele morfološke jezgara, dok je maturacijski defekt s baloniranjem jezgara bio prisutan u dijelu megakariocita (slučaj 7 i 9).

U tablici 2. prikazani su osnovni laboratorijski i klinički nalazi, te rezultati citogenetske analize, određivanja *BCR-ABL1* i mutacije V617F *JAK2* gena analizirane skupine bolesnika. U tri bolesnika (slučaj 4, 5 i 9) nađene su povišene vrijednosti broja eritrocita u perifernoj krvi, od kojih su u dva (slučaj 5 i 9) prisutne i povišene vrijednosti hemoglobina i hematokrita. Leukocitoza je bila prisutna u šest bolesnika (slučajevi 3, 4, 5, 7 i 10), dok su ostali bolesnici imali normalan broj leukocita. Trombocitoza je bila prisutna u četiri bolesnika (slučaj 1, 4, 6 i 7). Iz opisane skupine bolesnika s obzirom na laboratorijske nalaze izdvaja se slučaj 10 s prisutnom anemijom, trombocitopenijom i blagom leukocitozom u perifernoj krvi.

U tri bolesnika (slučaj 1, 3 i 10) prilikom postavljanja dijagnoze prisutna je blaga splenomegalija, u ostalih bolesnika veličine slezene i jetre bile su uredne.

Citogenetska analiza aspirata koštane srži napravljena je u sedam bolesnika. U slučajevima 4, 6, 7, 8 i 9 nađen je uredan kariotip. U jednog bolesnika (slučaj 2) nađen je kariotip 47,xy,t(6;12)(q12;p13),+8[10],46,xy[2], klon s t(6;12)(q12;p13) i trisomijom 8 u 10 metafaza. U jednog bolesnika (slučaj 10) kariotip 47,xy,+8,inv(9)c[10]/46,xy,inv(9)c[5], klon s trisomijom 8 u 10 metafaza i konstitucijom inverzijom (9) u svim metafazama.

Ni u jednom ispitivanom slučaju nije nađen fuzijski prijepis gena *BCR-ABL1*. Točkasta mutacija V617F *JAK2* gena nađena je u šest ispitivanih bolesnika (slučajevi 3, 4, 5, 6, 7 i 8), dok su dva bolesnika (slučaj 9 i 10) bili negativni na ispitivanu mutaciju. Klinički je u bolesnika 1, 5, 6 i 9 postavljena dijagnoza PV, u bolesnika 7 i 10 MPN,U, u bolesnika

3 prefibrotična faza PMF i u bolesnika 4 dijagnoza ET. Za bolesnike 2 i 8 klinička dijagnoza nije dostupna.

RASPRAVA

Osnovu nove klasifikacije SZO kroničnih MPN osim kliničkih i laboratorijskih karakteristika čini veće značenje analize morfoloških karakteristika koštane srži, koje su postale sastavni dio dijagnostičkih kriterija, te otkriće novih genetičkih promjena uključenih u patogenezu *BCR-ABL1* negativnih MPN.

Sažimajući opisane morfološke karakteristike u deset analiziranih slučajeva MPN,U prisutna je hipercelularna koštana srž bez fibroze, najčešće s trilinijskom proliferacijom eritropoeze, granulopoeze i megakariocita, uz negativno ekstrahemoglobinsko željezo. Megakariociti su smješteni difuzno, blago do umjereno pleomorfnih, dijelom normalne veličine i dijelom krupni s jezgrama zrelog izgleda. Opisane promjene najsličnije su dijagnostičkim morfološkim kriterijima za PV, iako morfološka megakariocita ne zadovoljava (1,12).

Osim toga, u šest od osam analiziranih bolesnika prisutna je V617F *JAK2* mutacija. Navedena mutacija dovodi do trajne aktivacije *JAK2* tirozin kinaze uključene u prijenos signala receptora eritropoetina, trombopoetina, granulocitno-makrofagnog i granulocitnog stimulirajućeg faktora s posljedicom proliferacije morfološki normalnih stanica hemocitopoeze (6). S obzirom da je navedena mutacija prisutna u gotovo svim slučajevima PV, koja je i najčešća MPN, PV se smatra ultimativnim kliničkim fenotipom bolesti s V617F *JAK2* mutacijom. Slučajevi 5 i 9 s povišenom vrijednosti hemoglobina, od kojih samo slučaj 5 s dokazanom V617F *JAK2* mutacijom, uz odsutnost tipične morfološke slike u koštanoj srži ne zadovoljavaju dijagnostičke kriterije za PV. Nađena visoka učestalost V617F *JAK2* mutacije u analiziranim slučajevima MPN,U potvrđuje da prisutnost mutacije nije vezana uz određeni fenotip. Morfološka i klinička heterogenost MPN ukazuje na postojanje razlike u izražaju

V617F *JAK2* mutacije te prisutnosti drugih molekularnih promjena odgovornih za fenotipske karakteristike bolesti, te se V617F *JAK2* mutacija smatra kasnim klonalnim događajem u patogenezi (6).

Slučajevi 1, 4, 6 i 7 karakterizirani su trombocitozom od kojih je u tri analizirana i dokazana V617F *JAK2* mutacija. Izolirana trombocitoza nije specifična klinička karakteristika te se osim u ET, može javiti u PV, PMF, te rjeđe u bolesnika s atipičnom prezentacijom KML (3). S obzirom da je *JAK2* obligatna tirozin kinaza receptora za eritropoetin i trombomodulin, u mnogih bolesnika s PV se na početku bolesti nalazi izolirana trombocitoza, a bolesnici s ET i prisutnom V617F *JAK2* mutacijom imaju učestalije povišene vrijednosti hematokrita (3).

Citogenetskom analizom u slučajevima 2 i 10 nađena je trisomija 8, jedna od čestih opisanih citogenetskih promjena u MPN (6).

U slučaju 10 morfološka slika u koštanoj srži odgovara MPN,U, uz negativan nalaz *BCR-ABL1* i mutacije V617F *JAK2* gena, dokaz klonalnosti promjene je nalaz klona s trisomijom 8 u kariotipu. Posebnost slučaja je i nalaz abdominalne limfadenopatije, citološkom punkcijom i imunofenotipizacijom punktata abdominalnih limfnih čvorova postavljena je dijagnoza difuznog B velikostaničnog limfoma (DLBCL) imunofenotipa CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD38+, CD5-, CD23-, CD10-, CD11c-, CD138-, s klonalnim izražajem λ lakih lanaca imunoglobulina, te je bolesnik liječen COP-R protokolom. U bolesnika s neHodginovim i Hodginovim limfomom i nezahvaćenom koštanom srži, reaktivne morfološke promjene u koštanoj srži mogu odgovarati morfološkim promjenama MPN,U (13).

U zaključku, analizirani slučajevi MPN,U morfološki su karakterizirani trilinijskom proliferacijom u koštanoj srži s morfologijom megakariocita koja ne odgovara ni jednom podtipu MPN. Nađena visoka učestalost mutacije V617F *JAK2* gena u MPN,U utvrđuje nepovezanost mutacije sa specifičnim fenotipom, te ukazuje na definiranje novih molekularnih promjena specifičnih za pojedini podtip *BCR-ABL1* negativne MPN.

L I T E R A T U R A

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, ur. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms. Order out of chaos. *Cancer* 2009; 115: 3842-7.
3. Spivak JL. Narrative review: thrombocytosis, polycythemia vera and *JAK2* mutations: the phenotypic mimicry of chronic myeloproliferation. *Ann Intern Med* 2010; 152: 300-6.
4. Delhommeau F, Jeziorowska D, Marzac C, Casadevall N. Molecular aspects of myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* 2010; 91: 165-73.
5. Tefferi A. Mutational analysis in BCR-ABL-negative classic myeloproliferative neoplasms: impact on prognosis and therapeutic choices. *Leukemia Lymphoma* 2010; 51: 576-82.
6. Smith CA, Fan G. The saga of *JAK2* mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Human Pathol* 2008; 39: 795-810.
7. Hagemeijer A, Smit EME, Bootsma D. Improved identification of chromosomes of leukemic cells in methotrexate treated cultures. *Cytogenet Cell Genet* 1979; 23: 208-12.
8. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science* 1976; 191: 1268-70.
9. Mitelman F. ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel: S. Karger, 1995.
10. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ i sur. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-61.
11. van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA i sur. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.
12. Stein BL, Moliterno AR. Primary myelofibrosis and the myeloproliferative neoplasms. The role of individual variation. *JAMA* 2010; 303: 2513-18.
13. Foucar K, ed. Bone Marrow Pathology. 2nd ed. Chicago: ASCP Press, 2001.

S U M M A R Y

THE UNCLASSIFIABLE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM – MORPHOLOGICAL, CYTOGENETIC AND CLINICAL FEATURES

A. BOROVEČKI¹, A. ŠKRTIĆ^{1,4}, M. M. KARDUM PARO², R. LASAN³ and M. DOMINIS^{1,4}

¹*Merkur University Hospital, Department of Pathology and Cytology*, ²*Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, ³*Zagreb University Hospital Center, Department of Genetics* and ⁴*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable (MPN,U) has clinical, laboratory and morphological features of an MPN but fails to meet the criteria for any of the specific MPN entities. Because overlapping features, morphological findings in bone marrow, BCR-ABL1 fusion gene, V617F JAK2 mutation and cytogenetic abnormalities were analyzed in ten patients diagnosed with MPN,U. Bone marrow biopsy showed hypercellularity with trilineage myeloproliferation, dispersed megakaryocytes with mild pleomorphism and mature nuclei, and absence of reticulin fibrosis. All patients were *BCL-ABL1* negative, while V617F *JAK2* mutation was found in 6 of 8 patients. Trisomy 8 was found in two patients and t(6;12)(q12;p13) in one patient. Morphological features of MPN,U are nonspecific, however, in study cases they were most similar to diagnostic morphological features of polycythemia vera. The high frequency of V617F *JAK2* mutation in MPN,U cases analyzed revealed that its presence does not confirm a specific type of MPN.

Key words: MPN,U, V617F *JAK2*, cytogenetic abnormalities

POST-TRANSPLANTACIJSKA LIMFOPROLIFERATIVNA BOLEST U BOLESNIKA S TRANSPLANTACIJOM JETRE – ISKUSTVO KB MERKUR

TAJANA FILIPEC-KANIŽAJ^{1,7}, JELENA BUDIMIR², VESNA ČOLIĆ-CVRLJE^{1,7}, IKA KARDUM-SKELIN^{3,7},
DUNJA ŠUŠTERČIĆ³, SLAVICA NAUMOVSKI-MIHALIĆ¹, ANNA MRZLJAK¹, SLOBODANKA OSTOJIĆ
KOLONIĆ^{4,7}, NIKOLA SOBOČAN¹, TIHOMIR BRADIĆ¹, ZRINKA MIŠETIĆ DOLIĆ¹, BRANISLAV
KOCMAN⁵, MIROSLAVA KATIČIĆ^{1,7}, SNJEŽANA ŽIDOVEC-LEPEJ⁶ i ADRIANA VINCE^{2,7}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutrašnje bolesti, Zavod za gastroenterologiju, ²Klinika za infektivne bolesti
"Dr. Fran Mihaljević", Odjel za virusne hepatitis, ³Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i
citogenetiku, ⁴Klinika za unutrašnje bolesti, Zavod za hematologiju, ⁵Zavod za kirurgiju, ⁶Klinika za infektivne
bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Laboratorij za molekularnu dijagnostiku i protočnu citometriju
i ⁷Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Post-transplantacijski limfoproliferativni poremećaj (PTLD) je sve češće prepoznata bolest nakon transplantacije solidnih organa i koštane srži. Može biti za život opasna komplikacija koja se pojavljuje u približno 8% primatelja. Infekcija Epstein Barrovim virusom (EBV) usko je povezana s patogeneзом PTLD i u većini slučajeva PTLD nastaje kao odgovor na primarnu infekciju ili re-aktivaciju prethodno stečene infekcije. Glavni faktori rizika za razvoj PTLD su i stupanj ukupne imunosupresije te EBV serološki status primatelja. Najčešće korištena patološka klasifikacija PTLD-a je klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), koja dijeli PTLD u tri kategorije: rane lezije, polimorfni PTLD i monomorfni PTLD. Rane lezije su obilježene reaktivnom hiperplazijom plazma stanica. Polimorfni PTLD može biti poliklonski ili monoklonski. Kod monomorfnog u najvećem broju slučajeva tumorske stanice nastaju iz B stanica. Najčešći podtip je difuzni B velikostanični limfom. Rijetke varijante T-staničnog podrijetla uključuju limfom perifernih T stanica i rjeđe druge vrste, a Hodgkinova bolest je vrlo rijetka. Postavljanje dijagnoze PTLD zahtijeva visok indeks sumnje: liječenje PTLD-a veliki je izazov jer je bolest i nadalje povezana s visokom razinom smrtnosti (do 50%). Ovim je radom prikazano iskustvo KB Merkur u dijagnostici i liječenju bolesnika s transplantacijom jetre i PTLD-om.

Ključne riječi: post-transplantacijski limfoproliferativni poremećaj, transplantacija jetre, Epstein Barrov virus

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Tajana Filipec Kanižaj, dr. med.
Zavod za gastroenterologiju, Klinika za unutrašnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Medicinski fakultet
Sveučilište u Zagrebu
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 22 53 390
E-pošta: tajana_filipec@yahoo.com

UVOD

Post-transplantacijska limfoproliferativna bolest (PTLD) je potencijalno za život opasna komplikacija imunosupresivne terapije nakon transplantacije solidnih organa. Ne postoji univerzalno prihvaćena definicija pojma PTLD. Najčešće se koristi za opisivanje širokog spektra limfoproliferativnih poremećaja nakon transplantacije solidnih organa ili

hematopoetskih stanica. Spektr poremećaja kreće se od bolesti nalik infektivnoj mononukleozi, limfoidne hiperplazije do visoko agresivnih malignih limfoma. PTLD nakon transplantacije solidnih organa gotovo uvijek potječe od primateljevih limfoidnih stanica, dok je nakon transplantacije koštane srži ili matičnih stanica PTLD obično donatorskog podrijetla. Većina slučajeva PTLD-a povezana je s infekcijom Epstein Barrovim virusom (EBV), koja

dovodi do nekontrolirane proliferacije B limfocita. Incidencija EBV infekcije u bolesnika s PTLD vrlo je varijabilna i kreće se između 0,8 do 10% u različitim skupinama bolesnika s transplantatom (1-4). Nakon malignih tumora kože, PTLD je druga najčešća maligna bolest nakon transplantacije solidnih organa. Incidencija PTLD u bolesnika s transplantiranim solidnim organom iznosi do 10%. Češći je u djece zbog primarne infekcije EBV putem transplantata i kod transplantacije solidnih organa s intenzivnijim immunosupresivnim protokolima (npr. transplantacija crijeva, pluća, srca) (5). Kod bolesnika s transplantiranom jetrom je niža i iznosi do 2%. Učestalost PTLD opada vremenom nakon provedene transplantacije.

U Europi i SAD 85% PTLD-a odnosi se na B staničnu liniju i u više od 80% slučajeva povezana je s EBV infekcijom (6). Ostali slučajevi odnose se na T staničnu liniju koji su u 10-15% slučajeva povezani s EBV infekcijom (7). Vrlo rijetko, PTLD je podrijetlom od NK (engl. *Natural Killer*) stanične linije (8). Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) temelji se na histološkom izgledu tumora (9,10). Prema navedenoj klasifikaciji PTLD je podijeljena u tri skupine: rane promjene, polimorfni PTLD i monomorfni PTLD (tablica 1).

Prva skupina odnosi se na B staničnu hiperplaziju obilježenu diferenciranim plazma stanicama i održanom arhitekturom limfnog tkiva. Javljaju se rano nakon transplantacije i uspješno se liječe redukcijom doze immunosupresivne terapije. Drugu skupinu čini polimorfni PTLD obilježen staničnom atipijom, nekrozom stanica i destrukcijom arhitekture limfnog tkiva. Promjene u toj skupini izrazito su polimorfne, uglavnom monoklonalne i uključuju plazmocyte i blastične oblike. Ovaj tip PTLD je najzastupljeniji i javlja se u bilo koje doba nakon transplantacije solidnih organa. Treću skupinu čine monomorfni PTLD i uključuje invazivne visoko maligne limfome B i T staničnog porijekla. Monomorfni B stanični PTLD može se podijeliti u difuzni B velikostanični limfom i Burkittov/Burkittu nalik limfom koji je obilježen specifičnom translokacijom. Monomorfni T stanični limfom može se podijeliti na velikostanični, anaplastični ili nespecificiranog podtipa. Monomorfni PTLD obično se javljaju više godina nakon transplantacije i nalik su ne-Hodgkinovim limfomima u općoj populaciji.

Patogeneza PTLD-a u većine je bolesnika povezana s infekcijom EBV u okolnostima dugotrajne immunosupresije. EBV pripada skupini gama herpes virusa i više od 95% svjetske populacije EBV infekciju

Tablica 1

*Klasifikacija PTLD prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji
(engl. World Health Organization Classification)*

Kategorije PTLD	Podtip		Imunofenotip
Rane promjene	1	Reaktivna plazmocitna hiperplazija	Poliklonalne B stanice, plazma stanice i T stanice, imunoblasti EBV pozitivni
Polimorfni PTLD	1	Poliklonalni	Mješavina B i T limfocita, površinski i citoplazmatski Ig politipski i monotipski, većinom EBV pozitivni
	2	Monoklonalni	
Monomorfni PTLD	1	B stanični limfom Difuzni B velikostanični limfom Burkitt/Burkittu nalik limfom Plazma stanični mijelom	CD19, 20, 79a pozitivne, monotipska ekspresija Ig u 50%, mnogi ekspresija CD43, CD45RO, često CD30, većinom EBV pozitivni
	2	T stanični limfom Periferni T stanični limfom Rijetki tipovi (gama-delta, hepatosplenični, T/NK stanični)	T stanice mogu biti CD4 ili CD8 pozitivne, CD56, CD30, alfa, beta ili gama-delta T stanični receptori
	3	Ostali tipovi Hodgkinu nalik bolest Plazmocitomu nalik bolest	CD 15, CD30 pozitivni, uglavnom B stanični fenotip, EBV pozitivni

stječe se u djetinjstvu ili ranoj mladosti. Infekcija je u imunološki kompetentnih bolesnika uglavnom bez simptoma ili s kliničkom slikom spontano limitirajućeg benignog limfoproliferativnog sindroma - infekciozne mononukleoze. U imunološki kompromitiranih bolesnika sa smanjenom funkcijom citotoksičnih limfocita T ograničeno je uništavanje EBV inficiranih B limfocita i njihova diferencijacija u memorijske stanice. Zbog nekontrolirane replikacije virusa dolazi do dodatne infekcije drugih stanica (stanica germinativnog centra i drugih B memorijskih stanica). Nekontrolirana diferencijacija inficiranih stanica uzrokom je njihove podložnosti mutacijama i promociji nastanka PTLD. Ostali faktori ključni za nastanak PTLD-a slabo su definirani. Povezuju se sa specifičnom citokinskom i alogenom antigenom stimulacijom. Aktivna replikacija virusa u imunosuprimiranih bolesnika povezana je s promijenjenom ekspresijom EBV kodiranih gena uključujući onkogene u B stanicama (EBNA-1, LMP-1). Rezultirajuća PTLD je inicijalno poliklonalna, a dodatne mutacije (npr. BCL6 mutacija, *c-myc* preslagivanje ili disrupcija p53,...) potiču prelazak u agresivni monoklonalni limfom. Patogeneza PTLD nepovezanog s EBV slabo je poznata i mogla bi biti jednaka onoj ne-Hodgkin limfoma u općoj populaciji (11). Osim infekcije, EBV rizik pojave PTLD povezan je s vrstom presatka, intenzitetom i tipom imunosupresivne terapije, serološkom negativnošću primatelja na EBV, mlađom dobi, vremenom nakon transplantacije i genetskim parametrima kao što je polimorfizam gena za citokine.

Klinička prezentacija bolesti je varijabilna. Bolest je uglavnom (u 30-70% slučajeva) smještena ekstranodalno, najčešće u probavnom traktu, plućima, koži, jetri, središnjem živčanom sustavu (30% bolesnika). U 2/3 bolesnika promjena je solitarna. Infiltracija transplantiranog organa može dovesti do njegove disfunkcije. U postavljanju dijagnoze potrebna je velika doza kliničke sumnje. Osim pojave žarišnih promjena i/ili limfadenopatije u polovice bolesnika prisutan je febrilitet i gubitak tjelesne težine. U laboratorijskim nalazima povišen je LDH. Metoda izbora u procjeni proširenosti bolesti je PET CT. Dijagnoza se potvrđuje citološkom analizom aspirata i/ili patohistološkom analizom bioptata tumorskog tkiva. Analiza uključuje morfološke promjene, procjenu klonalnosti, prisutnosti citogenetskih abnormalnosti, preslagivanja gena za imunoglobuline, promjene arhitekture hemato-

poetskog tkiva i dokazivanje EBV u tkivu tumora (hibridizacijom EBV RNA *in-situ*). Smatra se da se praćenjem razine viremije u bolesnika s transplantiranim organom može predvidjeti rana faza PTLD-a (12). Prisutnost EBV virusa dokazuje se mjerenjem viremije PCR metodom. Kod bolesnika s PTLD-om razina viremije uvijek je visoka.

Liječenje PTLD-a razlikuje se prema tipu PTLD-a i ovisno o protokolima pojedinih institucija. Uglavnom, u većini se centara prvenstveno zasniva na redukciji razine imunosupresivne terapije (u 71-93% bolesnika). Kod PTLD promjena tipa benigne poliklonalne limfoproliferacije i poliklonalne proliferacije B limfocita navedeno dovodi do regresije u većine bolesnika (13). Osim navedenog, primjenjuje se antiviralna terapija (u 13-51% bolesnika), ali s ograničenim učinkom i/ili anti-CD20 monoklono antitijelo - rituksimab (33%). U bolesnika s višestrukim rizičnim faktorima i monomorfnim PTLD primjenjuje se dodatno kemoterapija (u 28-59% bolesnika), kirurška resekcija (20%) i terapija zračenjem (14%) ili interferonom (IFN- α , 12%) (14,15). *Prognoza* ovisi o klonalnosti i proširenosti bolesti. Smrtnost općenito iznosi i do 50%, a u bolesnika s monomorfnom bolesti do 80% (16-18).

REZULTATI KB MERKUR

U Kliničkoj bolnici Merkur od 1998. do početka 2011. godine učinjeno je više od 430 transplantacija jetre u 410 bolesnika. PTLD je utvrđen u 6 bolesnika (1,46%). Pet bolesnika bilo je muškog spola. Raspon dobi 31-61 godine. U polovice bolesnika osnovna indikacija za transplantaciju jetre je alkoholom uzrokovana ciroza jetre, a ostale indikacije su kriptogena ciroza i ciroza jetre uzrokovana infekcijom hepatitisom C. Vrijeme od transplantacije do postavljanje dijagnoze bilo je u rasponu od 2 do 54 mjeseci (srednja vrijednost 24,4 mjeseca, medijan 9 mjeseci). Svi bolesnici liječeni su ciklosporinom, dva u kombinaciji s azatioprinom, a jedan s mikofenolat mofetilom. U tablici 2 prikazane su osnovne karakteristike bolesnika.

Dijagnoza je postavljena na osnovi kliničke slike, radiološki prisutne tumorske mase i citološkom i/ili histološkom analizom uzoraka tumorskog tkiva,

Tablica 2

Osnovne osobine bolesnika s PTLD-om u KB Merkur

Bolesnik	Osnovna bolest	Imunosupresivna terapija	Vrijeme od transplantacije do PTLD-a	EBV PCR viremija prije i nakon terapije
1. Muškarac, 61 godina	HCV	azatioprin ciklosporin prednisolon	2 mjeseca	negativan
2. Muškarac, 43 godine	Alkoholna bolest jetre	ciklosporin prednisolon	3 mjeseca	pozitivan 58,6x10 ³ /0
3. Muškarac, 31 godina	Kriptogena ciroza jetre	azatioprin ciklosporin	54 mjeseca	pozitivan 601x10 ³ /8,15x10 ³
4. Muškarac, 61 godina	Alkoholna bolest jetre	ciklosporin prednisolon	9 mjeseca	pozitivan 19x10 ³ /3,8 x10 ³
5. Muškarac, 53 godine	Alkoholna bolest jetre	ciklosporin prednisolon mikofenolat-mofetil	54 mjeseca	pozitivan 10,75x10 ³ /4,69 x10 ³
6. Žena, 55 godina	Kriptogena ciroza jetre	ciklosporin mikofenolat-mofetil	42 mjeseca	pozitivan 4,86x10 ³ /0

Tablica 3

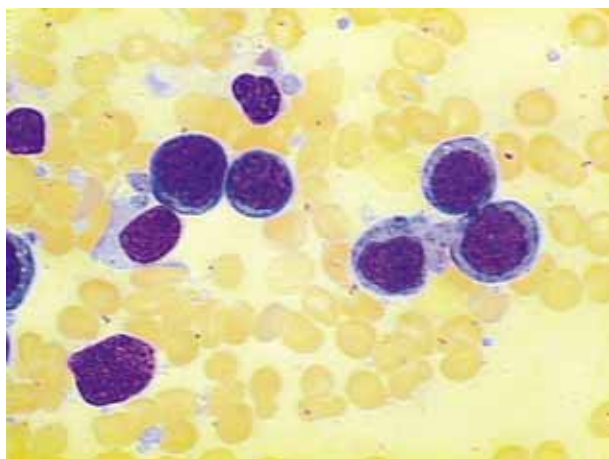
Obilježja post transplantacijske limfoproliferativne bolesti (PTLD)

Bolesnik	Klinička slika	Lokalizacija	PTLD morfologija	Imunohistokemija i analiza rekombinacije gena za imunoglobulin	Terapija
1. Muškarac, 61 godina	Žutica Febrilitet	Trbušni LČ	Monomorfni (difuzni B velikostanični)	CD 19+, CD 20+, CD 38+, CD 23+, CD 5+/-, monoklonalna ekspresija kappa lanaca	Rituximab 4 doze
2. Muškarac, 43 godine	Febrilitet Dispneja	Trbušni LČ	Polimorfni PTLD	CD 20+, CD 79 a+, rijetko CD 3+, rijetko ekspresija EBV-LMP.	Rituximab 4 doze
3. Muškarac, 31 godine	Febrilitet	Trbušni LČ Terminalni ileum	Polimorfni PTLD	CD 19+, CD79alfa+, HLA D/DR+, CD 38+, poliklonalna ekspresija lakih lanaca reaktivnih B limfocita (CD 20+), rijetko CD 3+, EBV-LMP neg.	Rituximab 8 doza Aciklovir 6 tjedana
4. Muškarac, 61 godina	Febrilitet	Trbušni LČ	Polimorfni PTLD	CD 20+i CD 79a+, in situ hybridizacija intranuklearna ekspresija EBV	Rituximab 8 doza
5. Muškarac, 53 godine	Febrilitet	Vratni i trbušni LČ	Hodgkinov limfom	R-S stanice : CD 30+, CD 15+, EBV- LMP+, EMA -, ALK 1-; populacija limfocita CD 3+, CD 20+; ISH EBV +	Zračenje ABVD 2 ciklusa Ganciklovir
6. Žena, 55 godina	Mršavljenje Bol u abdomenu	Trbušni LČ jetra	Monomorfni difuzni B velikostanični DLBCL – T rich	CD3+, CD 20+	Rituximab 4 ciklusa CHOP 1 ciklus

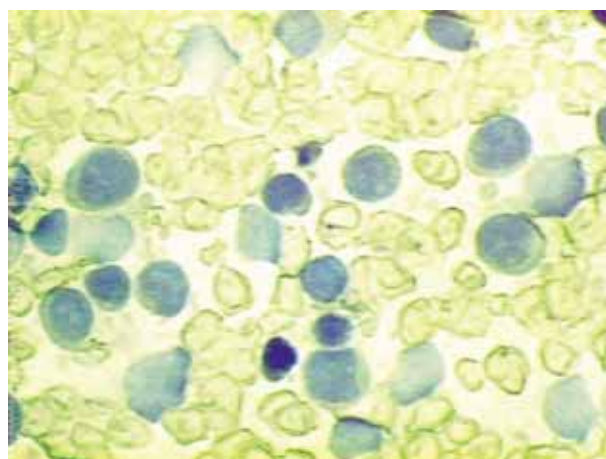
imunohistokemijom, analizom rekombinacije gena za imunoglobulin i imunofenotipizacijom. Većina (5/6) bolesnika je u trenutku dijagnoze PCR EBV pozitivna, raspon broja kopija virusa u trenutku dijagnoze 10,75x10³ – 6,01x10⁵ (srednja vrijednost 172,38x10³). U 5 bolesnika bolest je otkrivena u limfnim čvorovima trbuha, u jednog od njih s infiltracijom jetre, a drugog terminalnog ileuma. U bolesnika s Hodgkinovom bolešću otkrivena je u limfnim čvorovima vrata, a relapsu bolesti u limfnim

čvorovima trbuha i sredoprja. Prema morfološkim kriterijima najčešće je bio prisutan B stanični polimorfni limfom (4/6). U dva slučaja B velikostanični monomorfni limfom (sl. 1-3) te u jednog bolesnika Hodgkinov limfom. U tablici 3 prikazana su obilježja PTLD-a kod bolesnika s transplantiranom jetrom u KB Merkur.

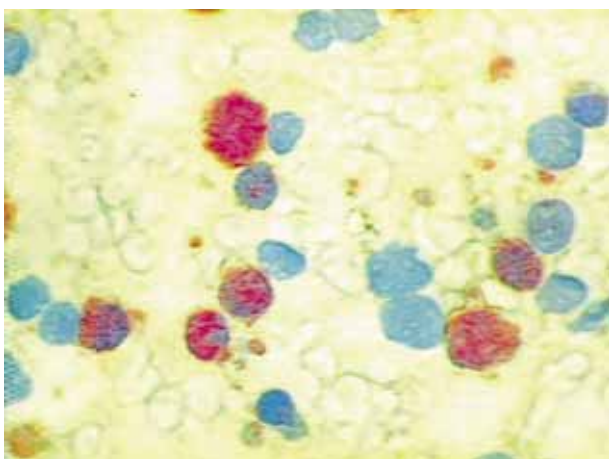
Terapija je u svih bolesnika bazirana na redukciji razine imunosupresiva. U bolesnika s Hodgki-



Sl. 1. Difuzni B velikostanični limfom, May-Grünwald Giemsa, x1000 (1. bolesnik).



Sl. 3. Difuzni B velikostanični limfom – imunocitokemijski CD 30 negativne limfatične stanice (LSAB, x1000) (1. bolesnik).



Sl. 2. Difuzni B velikostanični limfom - imunocitokemijski CD 20 pozitivne limfatične stanice (LSAB, x1000) (1. bolesnik).

novom bolesti provedena je radioterapija limfnih čvorova vrata, a radi povrata bolesti nakon godine dana provedena je kemoterapija po protokolu ABVD. U ostalih 5 bolesnika, 3 s polimorfnim i 2 s monomorfnim PTLD primijenjeno je antiCD20 antitijelo–rituksimab u 4-8 doza. U jednog bolesnika s monomorfnim limfomom primijenjena je i kemoterapija (po CHOP protokolu). Kirurška resekcija učinjena je u bolesnika s tumorskim promjenama utvrđenim na tankom crijevu i simptomima opstrukcije. Sveukupno preživljenje iznosi 33,33%. Pri tome su dva bolesnika preminula zbog posljedica progresije PTLD, a dva zbog infektivnih komplikacija.

RASPRAVA

Prospektivnim praćenjem bolesnika s transplantacijom jetre u našem centru utvrđen je PTLD u 1,46 % bolesnika. Prema literaturi, prijavljena učestalost PTLD u bolesnika s transplantacijom vrlo je varijabilna i kreće se između 0,8 i 10%, ovisno o vrsti presatka, imunosupresivnom liječenju, dobi, EBV serološkom statusu itd.(1). Incidencija PTLD u našoj skupini bolesnika bila je slična ostalim skupinama bolesnika podvrgnutih transplantaciji jetre.

U većini naših bolesnika pojava bolesti povezana je porastom viremije EBV. Najčešće je utvrđen polimorfni podtip PTLD-a s prisutnošću CD20 pozitivnih stanica. Za razliku od literaturnih podataka (11) u našoj populaciji u većine bolesnika radilo se o bolesti prisutnoj u limfnom čvorovima, a u dva bolesnika bolest je dodatno prisutna i ekstrapodularno (jetra, terminalni ileum).

Protokoli liječenja bolesnika s PTLD-om razlikuju se među ustanovama. Prema našem iskustvu primjenom redukcije doze imunosupresije i rituksimaba postignuta je inicijalna regresija bolesti u većine bolesnika, a kompletna remisija u 3/5 bolesnika. U jednog bolesnika s monomorfnim PTLD primijenjena je i kemoterapija, ali uz značajan rizik nuspojava.

Analizom kliničkih, viroloških i imunoloških parametara u bolesnika s EBV povezanom PTLD pokazala se važnost čestih određivanja viremije EBV, poglavito u bolesnika s povećanim rizikom i ranom primjenom rituksimaba za povoljan ishod bolesti. Opetovano utvrđivanje viremije EBV u perifernoj krvi kod bolesnika podvrgnutih transplantaciji jetre sa standardiziranim testovima molekularne dijagnostike može omogućiti rano dijagnosticiranje i liječenje PTLD-a. Ipak, varijacije u EBV viremije tijekom praćenja treba tumačiti u kontekstu drugih kliničkih i laboratorijskih dijagnostičkih postupaka i opažanja.

Sukladno ranijem iskustvu, EBV-povezane limfoproliferativne bolesti su značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta u bolesnika podvrgnutih transplantaciji jetre. Mortalitet u našoj populaciji je usprkos liječenju visok i iznosio je 33,33%. U polovici bolesnika on se odnosio na nekontroliranu progresiju bolesti, a u druge polovice na infektivne komplikacije.

L I T E R A T U R A

1. Kremers WK, Devarbhavi HC, Wiesner RH i sur. Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders Following Liver Transplantation: Incidence, Risk Factors and Survival. *Am J Transpl* 2006; 6: 1017-24.
2. D'Antiga L, Del Rizzo M, Mengoli C i sur. Sustained Epstein-Barr Virus Detection in Paediatric Liver Transplantation. Insights Into the Occurrence of Late PTLD. *Liver Transpl* 2007; 13: 343-8.
3. Timuragaoglu A, Ugur-Biling A, Colak D i sur. Posttransplant lymphoproliferative disorders in transplant recipients. *Transplant Proc* 2006; 38: 641-5.
4. Merlino C, Giacchino F, Bergallo M i sur. Epstein Barr viral monitoring in mononuclear lymphocytes and serum of renal transplant recipients using a quantitative PCR protocol. *G Ital Nefrol* 2003; 20: 170-5.
5. Burns DM, Crawford DH. Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy of post-transplant lymphoproliferative disease. *Blood Rev* 2004; 18: 193-209.
6. Morrison VA, Dunn DL, Manivel JC i sur. Clinical characteristics of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Am J Med* 1994; 97: 14-24.
7. Hoshida Y, Li T, Dong Z i sur. Lymphoproliferative disorders in renal transplant patients in Japan. *Int J Cancer* 2001; 91: 869-75.
8. Kwong YL, Lam CC, Chan TM. Post-transplantation lymphoproliferative disease of natural killer cell lineage: a clinicopathological and molecular analysis. *Br J Haematol* 2000; 110: 197-202.
9. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J i sur. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 2000; 36: 69-86.
10. Harris NL, Ferry JA, Swerdlow SH. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of society for hematopathology workshop. *Semin Diagn Pathol* 1997; 14: 8-14.
11. Taylor AL, Marcus R, Bradley JA. Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 155-67.
12. Preiksaitis JK. New developments in the diagnosis and management of posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1016-23.
13. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA i sur. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation* 1999; 68: 1517-25.
14. Allen U, Hubert D, Moore D i sur. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease in solid organ transplant recipients, 1988-97: a Canadian multi-centre experience. *Pediatr Transplant* 2001; 5: 198-203.
15. Gonzalez-Barca E, Domingo-Domenech E, Gomez-Codina J i sur. First-line treatment with rituximab improves survival of patients with post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) (abstract). *Blood* 2004; 104: 39a.
16. Leblond V, Sutton L, Dorent R i sur. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation: a report of 24 cases observed in a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13: 961-8.
17. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004; 4: 222-30.
18. Newell KA, Alonso EM, Whittington PF i sur. Post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplantation. Interplay between primary Epstein-Barr virus infection and immunosuppression. *Transplantation* 1996; 62: 370-5.

S U M M A R Y

POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASE IN LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS – MERKUR UNIVERSITY HOSPITAL SINGLE CENTER EXPERIENCE

T. FILIPEC-KANIŽAJ^{1,7}, J. BUDIMIR², V. ČOLIĆ-CVRLJE^{1,7}, I. KARDUM-SKELIN^{3,7}, D. ŠUŠTERČIĆ³, S. NAUMOVSKI-MIHALIĆ¹, A. MRZLJAK¹, S. OSTOJIĆ KOLONIĆ^{4,7}, N. SOBOČAN¹, T. BRADIĆ¹, Z. MIŠEĆIĆ DOLIĆ¹, B. KOCMAN⁵, M. KATIČIĆ^{1,7}, S. ŽIDOVEC-LEPEJ⁶ and A. VINCE^{2,7}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology,*

²*University Hospital for Infectious Diseases “Dr. Fran Mihaljevic”, Department of Viral Hepatitis,*

³*University Hospital Merkur, Institute of Cytology and Cytogenetics,* ⁴*Department of Internal*

Medicine, Division of Hematology, ⁵*Department of Surgery,* ⁶*University Hospital for Infectious*

Diseases “Dr. Fran Mihaljevic”, Laboratory of Molecular Diagnostics and Flow Cytometry

and ⁷*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) is an increasingly recognized condition as the number of solid organ and bone marrow transplant recipients increases. It can be a life threatening fulminant disorder and affects approximately 8% of solid organ transplant recipients. Epstein-Barr virus (EBV) is closely involved in the pathogenesis of PTLD and the majority of PTLD cases arise in response to primary infection with EBV or to re-activation of previously acquired EBV. The principal risk factors underlying the development of PTLD are the degree of overall immunosuppression and EBV serostatus of the recipient. The most commonly used pathologic classification of PTLD is the World Health Organization classification, which divides PTLD into three categories: early lesions, polymorphic PTLD, and monomorphic PTLD. Early lesions are characterized by reactive plasmacytic hyperplasia. Polymorphic PTLD may be either polyclonal or monoclonal and is characterized by destruction of the underlying lymphoid architecture, necrosis, and nuclear atypia. In monomorphic PTLD, the majority of cases (>80%) arise from B cells, similar to non-Hodgkin's lymphoma in immunocompetent hosts. The most common subtype is diffuse large B-cell lymphoma, but Burkitt's/Burkitt's-like lymphoma and plasma cell myeloma are also seen. Rarely T-cell variants occur, which include peripheral T-cell lymphomas and, rarely, other uncommon types, including gamma/delta T-cell lymphoma and T-natural killer (NK) cell varieties. Hodgkin's disease-like lymphoma is very unusual. An accurate diagnosis of PTLD requires a high index of suspicion, since the disorder may present subtly and/or extranodally. Radiologic evidence of a mass or the presence of elevated serum markers (such as increased LDH levels) are suggestive of PTLD, with positive finding on ultrasonography, computed tomography, magnetic resonance and/or positron emission tomography scanning (possibly indicating metabolically active areas) also favoring the diagnosis. The management of PTLD poses a major therapeutic challenge and although there is reasonable agreement about the overall principles of treatment, there is still considerable controversy about the optimal treatment of individual patients. EBV-related PTLDs are a significant cause of mortality in patients undergoing orthotopic liver transplantation with the observed mortality rate of up to 50%. This paper presents the experience acquired at Merkur University Hospital in the diagnosis and treatment of patients with liver transplantation and PTLD.

Key words: post-transplant lymphoproliferative disease, liver transplantation, Epstein-Barr virus

DIJAGNOSTIČKO I PROGNOСТИČKO ZNAČENJE IZRAŽAJA BILJEGA CD45 U HEMATOLOŠKIM ZLOĆUDNIM BOLESTIMA S POSEBNIM OSVRTOM NA AKUTNE LEUKEMIJE

NJETOČKA GREDELJ-ŠIMEC¹, BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ², ALEN OSTOJIĆ¹, ZORAN ŠIFTAR³,
DUNJA FIALA⁴, IKA KARDUM-SKELIN^{2,5}, RADOVAN VRHOVAC^{1,5} i BRANIMIR JAKŠIĆ^{1,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju, ²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, ³Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, ⁴Opća bolnica Zadar, Odjel za transfuzijsku medicinu, Zadar i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

CD45 je transmembranski protein s aktivnošću tirozin kinaze koji se nalazi isključivo na hematopoetskim stanicama, izuzev eritrocita i trombocita, te praktički na svim njihovim razvojnim oblicima. Monoklonalna protutijela usmjerena na CD45 su neophodnu pomoć pri diferencijalnoj dijagnozi hematoloških zloćudnih bolesti i slabo diferenciranih zloćudnih nehematoloških tumora, naročito ako se radi o ekstranodalnoj lokalizaciji limfoma, odnosno nodalnim ili koštanim lokalizacijama nehematoloških tumora ili njihovih metastaza. Ovaj biljeg ima važnost i pri subtipizaciji limfoproliferativnih bolesti. Izražaj CD45 je značajan pri definiranju zloćudnog klonal pri imunofenotipizaciji akutnih leukemija, kao i pri određivanju minimalne ostatne bolesti, posebno ako se radi o CD45 negativnim akutnim leukemijama. Učestalost CD45 negativnih akutnih limfoblastičnih leukemija (ALL) u djece je nešto viša od 10%. Djeca oboljela od ALL s blastima koji imaju niži izražaj biljega CD45 u načelu imaju bolju prognozu od onih s višim izražajem tog biljega, naročito ako izražaj prelazi 90%. Analizirani su i podaci o izražaju CD45 biljega u 28 konsekutivnih bolesnika kojima je dijagnoza akutne limfoblastičke leukemije postavljena u našoj ustanovi tijekom petogodišnjeg razdoblja. U navedenom uzorku 7,1% bolesnika imalo je CD45 negativnu ALL. Utvrđena je pozitivna korelacija izražaja biljega CD45 i biljega CD20 te negativna korelacija između izražaja biljega CD45 i biljega CD34. Intenzitet izražaja biljega CD45 nije imao utjecaja na preživljenje naših bolesnika.

Ključne riječi: CD45, akutna leukemija

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Njetočka Gredelj Šimec, dr. med.
Klinička bolnica Merkur
Klinika za unutarnje bolesti
Zavod za hematologiju
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: njetocka.gredelj@zg.t-com.hr

UVOD

CD45 ili LCA (*Leukocyte Common Antigen*) je transmembranski glikoprotein s aktivnošću tirozin kinaze koji prekriva do 10% površine stanice i time ulazi u kategoriju najzastupljenijih molekula na staničnoj površini. Nalazi se na svim hematopetskim stanicama i njihovim prekursorima osim zrelih eritrocita i trombocita. Kao i drugi transmembranski proteini sastoji se od intracelularnog, transmembranskog i ekstracelularnog dijela. Glukoziatna ekstracelularna domena sadrži 300-500

aminokiselina dok veliki citoplazmatski dio sadrži niz od oko 700 aminokiselina podijeljen u dvije domene (1). Kodiran je jednim genom koji se nalazi na 1q32 kromosomu. Gen sadrži 34 eksona od kojih eksoni primarne transkripcije (ekson 4/A, 5/B, 6/C i 7) kombiniranjem stvaraju 8 različitih mRNA odnosno 8 različitih izoformi CD45 molekule. Transkripcijom različitih eksona kodirana je NH2 terminalna domena (ekstracelularni dio). Izoforme su CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RAB, CD45RAC, CD45RBC, CD45RO, CD45R (ABC). CD45 molekula je odgovorna za regulaciju sazri-

jevanja, rasta i aktivacije hematopoetskih stanica te stoga izoforme ne ovise samo o vrsti stanice, već i o njenom stupnju aktivacije i diferencijacije. Stoga se, na primjer, tip izražaja CD45 može koristiti za razlikovanje "djevičanskih" (CD45RB) i "memorijskih" (CD45RO) T limfocita, uz napomenu da je CD45RO, "memorijski fenotip" reverzibilan. T stanični izražaj CD45, osim što je vezan uz stupanj aktivacije i diferencijacije stanice, u direktnoj je ovisnosti i o signalnom putu s B staničnim receptorom. B limfociti izražavaju protein velike molekularne težine 220kDa (nazvan B220) koji sadrži sve dijelove CD45 eksona (CD45RABC). Tijekom normalnog sazrijevanja na B limfocitima dolazi do postupnog sniženja izražaja CD34 i povećanja CD45, CD20 i imunoglobulina (2-7). Opisane su razlike i u intenzitetu izražaja CD45, tako da zreli T limfociti (CD3+) i NK stanice (CD16+, CD11b+) izražavaju CD45 u najvećem intenzitetu, dok je izražaj na B limfocitima ovisno o stupnju zrelosti moguć u tri intenziteta (jaki izražaj u zrelih B stanica CD19+,CD20+; slabiji izražaj u prekursorskim stanicama CD19+,CD10+; i vrlo slab u vrlo ranim B limfocitnim prekursorima CD19+, CD10+, CD34+). Što se monocitne loze tiče, intenzitet CD45 raste kako loza sazrijeva, dok je među granulocitima u koštanoj srži tijekom sazrijevanja nepromijenjen. Najranije stanice eritrocitne loze su slabo CD45 pozitivne, intenzitet se pojačava tijekom sazrijevanja da bi onda potpuno nestao kod zrelih eritrocita (8). Uz navedeno, smatra se i da je intenzitet izražaja CD45 na zdravim stanicama individualan, odnosno da je broj antigenskih mjesta za CD45 na zdravim leukocitima, monocitima i granulocitima konstantan i specifičan za jedinku, te da stoga pri određivanju intenziteta izražaja na promatranoj populaciji patoloških stanica, kao mjera može poslužiti intenzitet izražaja vlastitih zdravih limfocita (9).

DIJAGNOSTIČKO I PROGNOŠTIČKO ZNAČENJE

Budući da je CD45 biljeg koji se nalazi isključivo na hematopoetskim stanicama, osim eritrocita i trombocita, te praktički na svim njihovim razvojnim oblicima, njegova najveća dijagnostička vrijednost je u razlikovanju hematopoetskog od nehematopoetskog tkiva. Monoklonalna protutijela usmjerena

prema CD45 su neophodna pomoć pri diferencijalnoj dijagnozi hematoloških neoplazmi (CD45+) i zloćudnih slabo diferenciranih nehematoloških tumora (CD45-), naročito ako se radi o ekstranodalnoj lokalizaciji limfoma, odnosno nodalnim ili koštanim lokalizacijama nehematoloških tumora ili njihovih metastaza.

Tumori malih plavih stanica

Važan diferencijalno dijagnostički problem u dječjoj populaciji je skupina vrlo slabo diferenciranih zloćudnih tumora različitog podrijetla koja se naziva tumorima malih plavih stanica kao što su neuroblastom, Ewingov tumor/PNET-primitivni neuroektodermalni tumor, Wilmsov tumor, rhabdomiosarkom, limfoblastični limfom/leukemija, anaplastični velikostanični limfom (*Anaplastic Large-Cell Lymphoma* - ALCL) i Burkittov limfom. Za njihovu točnu subtipizaciju potrebno je morfološku analizu upotpuniti dodatnim tehnologijama (imunocitokemija, protočna citometrija, molekularna dijagnostika, citogenetika, elektronska mikroskopija). Međutim, postoji mali postotak slabo diferenciranih neoplazmi kod kojih je postavljanje dijagnoze teško i unatoč imunocitokemijskoj analizi. Značajan dio takvih tumora čine CD45 negativni limfomi/leukemije. Delos i suradnici su prikazali da je od 165 pacijenata s ALCL-om 63 bilo CD45 negativno, što im je znatno otežalo dijagnostiku zahtijevajući dodatnu obradu, te zaključuju da je za postavljanje ispravne dijagnoze kod dvojbenih slučajeva neophodno istodobno korištenje monoklonskih antitijela na CD30, CD45RO, CD45RA, CD20 i citokeratin (10). Ozdemirli i sur. također ističu važnost imunocitokemijskog panela u razlikovanju Ewingovog sarkoma odnosno tumora malih plavih stanica i limfoma, te predlažu inicijalnu imunocitokemijsku obradu na CD45, vimentin, keratin, desmin, sinaptofizin, CD57, S-100, NSE, kromogranin i CD99 (11). Kao poseban dijagnostički problem izdvajaju se B limfoblastični limfomi/leukemije koji mogu biti CD45 i CD20 negativni te mogu iskazivati antigene specifične za Ewingov sarkom/PNET kao što je CD99, naročito ako se radi o prekursorskom B-limfoblastičnom limfomu/leukemiji ekstranodalne lokalizacije (12). U skladu s navedenim, autori se slažu da je u slučaju CD45 negativnosti potrebno učiniti TdT, CD79a i CD43, odnosno CD43 i CD10 da bi se potvrdilo dijagnozu

limfoblastičnog limfoma. Lini i sur. upozoravaju i na moguće greške pri dijagnozi CD45 negativnih, a CD99 i FLI-1 pozitivnih limfoblastičnih limfoma/leukemija te preporučuju u imunocitokemijski panel uključiti TdT i/ili CD43 (13). Dijagnostički problem mogu predstavljati limfomi NK/T staničnog porijekla koji su često ekstranodalne lokalizacije, imunocitokemijski pozitivni na CD2 i CD56, a negativni na CD3 (14). DiGiuseppe i sur. nalaze pozitivnost na CD45, CD2, CD34, uz varijabilnu CD7 pozitivnosti (15), dok su Liu i suradnici pokazali da niti pozitivnost na CD2, CD34, CD4 i CD7 nije konstantna, te s obzirom na činjenicu pozitivnosti CD56 na stanicama nehematoloških tumora (rabdiosarkoma, PNET-a itd.) (16). CD45 je važan biljeg pri postavljanju definitivne dijagnoze.

Limfomi

CD45 je prisutan na stanicama svih ne-Hodgkinovih limfoma (NHL). Postoje brojni radovi (17-20) koji ukazuju na različit intenzitet izražaja CD45 kod različitih tipova ne-Hodgkinovih limfoma. Intenzitet izražaja CD45 na stanicama kronične limfocitne leukemije (KLL) je niži nego na stanicama NHL-a, dok je na stanicama leukemije vlasastih stanica niži nego na stanicama KLL-a. Maljaei i sur. smatraju da je intenzitet izražaja CD45 koristan pri diferencijalnoj dijagnostici B limfoproliferativnih bolesti, te da se prema njegovom intenzitetu jasno mogu razlikovati tipičan KLL od atipičnog KLL/PLL-a (prolimfocitna leukemija) i NHL-a (20). Leukociti u limfomu plaštene zone (MCL - *Mantle Cell Lymphoma*) pokazuju nešto viši intenzitet izražaja CD45 u odnosu na folikulani limfom, limfoplazmocitoidni limfom i limfom marginalne zone. Ta tri podtipa limfoma imaju podjednak izražaj CD45. Autori smatraju da intenzitet izražaja CD45 može poslužiti i kao dijagnostički alat pri razlikovanju limfoma marginalne zone i leukemije vlasastih stanica, kao i pri diferencijalnoj dijagnostici CD23 pozitivnih limfoma plaštene zone i CD5 pozitivnih folikularnih limfoma (19).

Plazmastične neoplazme

Dijagnostičko i prognostičko značenje CD45 pozitivnosti kod multiplih mijeloma (MM) treba gledati u svjetlu promjene intenziteta CD45 pozitivnosti pri normalnom sazrijevanju i diferencijaciji tijekom

kojeg plazma stanice postepeno gube biljeg CD45. U zdravoj koštanoj srži dominiraju CD45 pozitivne plazma stanice što se tumači kontinuiranim procesom sazrijevanja i apoptoze. U ranim stadijima plazmastičnih proliferativnih bolesti kao što su monoklonska gamopatija neutvrđenog značenja (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* - MGUS) i šuljajući multipli mijelom (*smoldering MM-SMM*) postoji podjednaka proporcija CD45 pozitivnih i CD45 negativnih plazma stanica, dok kod novodijagnosticiranih MM-a i MM-a u relapsu dominira populacija CD45 negativnih plazma stanica što se povezuje s povišenim izražajem antiapoptotičkog proteina bcl2. CD45 pozitivne stanice imaju viši proliferativni indeks i osjetljivije su na stimulaciju interleukinom 6 (IL-6), koji je važan faktor rasta plazma stanica u MM, dok su CD 45 negativne stanice povezane s povećanom produkcijom vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF). Smatra se da zloćudne plazma stanice gube biljeg CD45 u korelaciji s gubitkom izražaja nekih adhezijskih molekula (CD56, CD11a, CD49f), te da se gubitkom CD45 formiraju dvije fenotipski i funkcionalno različite populacije zloćudnih plazma stanica od kojih je CD45 negativna populacija a kasniji stadij zloćudnih plazma stanica (21), Kumar i sur. su pokazali da je dominacija populacije CD45 negativnih plazma stanica jasno povezana s kasnijim stadijem bolesti i lošijom prognozom, što je u skladu s rezultatima Moreaua i suradnika koji su pokazali da pacijenti s MM-om nakon intenzivne kemoterapije žive kraće ako na plazma stanicama nemaju izražaj CD45 (22).

Akutne leukemije

Pri imunofenotipizaciji leukemija, CD45 služi kao biljeg kojim se obilježava tražena populacija blasta koja se razlikuje od limfocita, monocita i zrelih granulocita po niskom izražaju biljega CD45 i umjerenom do višem izražaju postraničnog raspršenja (SSC). Protočnom citometrijom određen intenzitet izražaja određenog biljega viši od 20% smatra se pozitivnim, pa se dakle akutne leukemije s intenzitetom CD45 manjim od 20% smatraju negativnima (23, 24). Vormoor i sur. nalaze da je kod CD45 negativnih ALL, prisutnost CD45 na matičnim stanicama dobar model za razlikovanje zdravih od leukemijskih matičnih stanica, te da je CD45 negativnost indirektni dokaz da se leukemijska transformacija

zbiva na razimi progenitorne stanice s limfoidnom restrikcijom (25). Zbog navedenog treba istaknuti dijagnostičko značenje CD45 pri određivanju minimalne ostatne bolesti, odnosno kompletne remisije kod CD45 negativnih ALL (26, 27).

Rezultati o učestalosti CD45 negativnih B-ALL u djece su relativno konzistentni. Rate i sur. (7) nalaze 12,9%, Behm i sur. (28) 13%, Nakumara i sur. (29) 14%. Ako se promatraju subtipovi B-ALL, čini se da je učestalost značajno veća kod *common* ALL (15,1%), dok rane pro-B-ALL i pre-B-ALL imaju podjednaku učestalost (7,2% odnosno 7,8%). CD45 negativne ALL T fenotipa javljaju se znatno rjeđe (od 3,7% do manje od 1%) (7, 28, 29).

Podaci o učestalosti CD45 negativnih akutnih leukemija odraslih su znatno oskudniji. Iz dostupnih podataka vjerojatno se radi o postotku nalik onom kod dječjih leukemija (11,1%) (30). Postoji više radova o prognostičkom značenju CD45 kod dječjih ALL-a. Behm nalazi jasnu povezanost odsustva ili niskog izražaja CD45 s drugim pozitivnim prognostičkim parametrima kao što su niži broj leukocita, niže vrijednosti laktat dehidrogenaze i hiperploidija (28), dok Nakumara nalazi povezanost nižeg izražaja CD45 samo s hiperploidijom (29). Sukladno tome, autori nalaze značajno bolji ishod liječenja u djece s CD45 negativnim ALL (28, 29). Čini se da bi intenzitet izražaja CD45 na blastima mogao imati veću prognostičku vrijednost od kategorizacije leukemija u CD45 pozitivne ili negativne (uz granicu od 0,20), naročito ako se kao zaseban entitet promatra izrazito jak intenzitet CD45. Behm nudi model s tri skupine u zavisnosti o intenzitetu izražaja CD45 (<20%, 20-89%, >90%) te nalazi statistički značajno lošije preživljenje u skupini s izražajem višim od 90% (28). Te rezultate potvrđuju Borowic i sur. koji su na velikom uzorku dječjih ALL-a pokazali da su izrazit intenzitet izražaja CD45 (veći od 75%) i srednji intenzitet CD20 (veći od 20%) nezavisni prognostički faktori u djece s ALL (31). Autori nalaze i značajnu povezanost jakog izražaja CD45 s t (4,11), te smatraju da bi intenzitet izražaja CD45 mogao biti i bolji pokazatelj t (4,11) od ranije etabliranih pokazatelja kao što su CD10, CD24 i CD15 (32). Na kraju autori zaključuju da bi bolesnici u kojih je izražaj CD45 na limfoblastima veći za 8% od izražaja na vlastitim zrelim limfocitima B trebali biti liječeni agresivnije od onih koji ne zadovoljavaju te kriterije (31). Možda u svjetlu te činjenice kao i svjetlu činjenice o postojanju različitih izoformi CD45 koje su različite molekularne mase što može imati ulogu u imunofenotipizaciji (33),

treba promatrati rezultate pojedinih studija koje ne nalaze značajnu razliku u kliničkom tijeku bolesti ili odgovoru na terapiju između CD45 negativnih i pozitivnih ALL-a (7).

Za razliku od navedenog, podaci o prognostičkom značenju CD45 kod akutnih leukemija u odraslih su vrlo oskudni (34-37). Caldwell u studiji o prognostičkom značenju CD45 negativnih ALL u djece i odraslih nalazi povoljniji odgovor na terapiju u bolesnika s CD45 negativnim ALL (33), dok Inab u analizi malog broja CD45 negativnih ALL u odraslih ostavlja otvoreno pitanje o njegovom prognostičkom značenju (30).

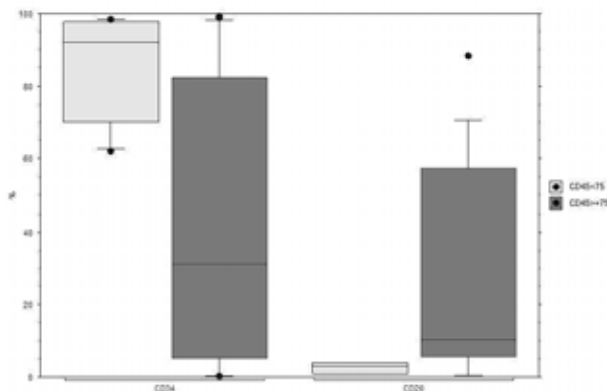
CD45 NEGATIVNE LEUKEMIJE - ISKUSTVA JEDNOG CENTRA

Analizirali smo akutne leukemije odraslih dijagnosticirane na Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur u razdoblju od 5 godina (od 01. 01. 2005. do 31. 01. 2010.). Osim metoda deskriptivne statistike korišten je i neparametrijski Mann-Whitneyev test za usporedbu kontinuiranih varijabli u ispitivanim skupinama. Ukupno preživljenje je mjereno od dana postavljanja dijagnoze do dana smrti ili zadnje kontrole, a izračunato je pomoću Kaplan-Meierove metode. Za usporedbu krivulja preživljenja rabljen je *log-rank* test. Za statističku je analizu korišten program *StatView*TM, *SAS Institute Inc*, v. 5,0, a statistički se značajnom smatrala P-vrijednost <0,05.

Dijagnoza akutne leukemije postavljena je citološkom analizom i imunofenotipizacijom punktata koštane srži u ukupno 136 bolesnika. U 28 (20,6%) radilo se o akutnoj limfatičnoj leukemiji. Među bolesnicima s ALL bilo je 13 (46,4%) žena i 15 (53,6%) muškaraca. Medijan dobi je iznosio 53,5 godina (18-74, ±18.1), za žene 55 (21-74, ±18.1) i 52 (18-72, ±18.6) za muškarce.

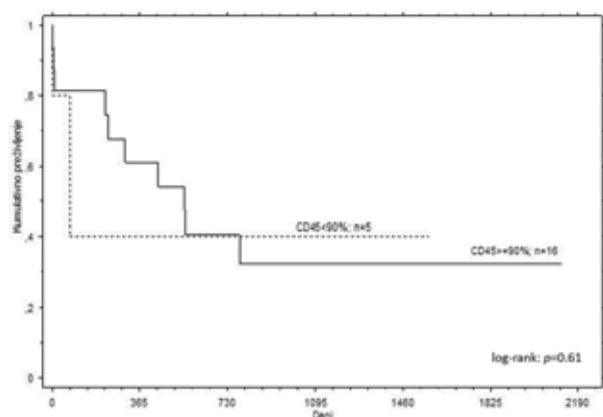
Zabilježena su dva slučaja (7,4%, n=2/27) ALL s niskim izražajem CD45 (3,3% i 11,9% pozitivnih blasta). U još četiri slučaja, što čini ukupno 22,2%, nađen je niski intenzitet izražaja (20,7%, 33,8%, 38,4% i 39%). U 16 pacijenata (59,3%) registriran je vrlo visoki izražaj biljega (viši od 95%). Svi su slučajevi bili ALL-B fenotipa.

Analizirali smo povezanost intenziteta izražaja CD45 s intenzitetom izražaja CD34 i CD20 na blastima. U našoj skupini pacijenata, visoki izražaj CD45 (veći od 75%) bio je povezan s jačim izražajem CD20 biljega, iako se ta povezanost nije pokazala statistički značajnom ($p=0,08$). Pacijenti s visokim izražajem CD45 (većim od 75%) imali su statistički značajno ($p=0,04$) niži izražaj CD34 (sl. 1).



Sl. 1. Izražaj CD34 i CD20 među skupinama pacijenata grupiranih na temelju izražaja CD45

Nakon razdoblja praćenja od 2121 dana, kumulativno preživljenje svih bolesnika s ALL iznosilo je 30,9%, s medijanom preživljenja od 551 dan. Očekivano, bolesnici mlađi od 45 godina imali su statistički značajno bolje preživljenje (kumulativno preživljenje 48%, s medijanom preživljenja 783 dana) od onih starijih (kumulativno preživljenje 31,7%, s medijanom preživljenja od 74 dana). Od bolesnika s CD45 negativnom ALL, jedan je umro 3 mjeseca, a drugi gotovo 3 godine nakon postavljanja dijagnoze. Neovisno o odabiru granične vrijednosti pri



Sl. 2. Usporedba kumulativnog preživljenja na temelju izražaja CD45

kojoj bi se bolesnici svrstali u CD45 „pozitivne“ ili „negativne“ (95%, 90% ili 75%) na tom uzorku bolesnika nije utvrđeno da izražaj CD45 ima statistički značajan utjecaj na njihovo preživljenje (sl. 2).

RASPRAVA

Na analiziranom uzorku odraslih bolesnika s ALL, a prema smjernicama za imunofenotipizaciju akutnih leukemija (23, 24), registrirano je 7,4% CD45 negativnih ALL, što predstavlja nižu učestalost od opisane učestalosti CD45 negativnih ALL u djece, te nižu od očekivane učestalosti u odraslih (4,28-30). Ako se pak primijeni kriterij intenziteta izražaja biljega, kojem većina autora pridaje veću prognostičku važnost od same pozitivnosti blasta (7,28,31,33), u našem uzorku nalazimo 22,2% bolesnika u kojih je intenzitet izražaja CD45 niži od 75%, odnosno 59,3% bolesnika s vrlo visokim izražajem CD45 (višim od 95%).

Iz naših podataka o preživljenju bolesnika ovisno o intenzitetu izražaja CD45 vrlo je teško donijeti čvrste zaključke, ali se registrira nešto bolje kumulativno preživljenje bolesnika s nižim intenzitetom izražaja CD45. Taj nalaz treba promatrati u zavisnosti o dobivenim rezultatima o odnosu izražaja CD45 i CD20, te odnosa izražaja CD45 i CD34, koji su u skladu s ranijim radovima na dječjim ALL (3,31-38). Našli smo povezanost u intenzitetu izražaja CD20 i CD45. Za ta oba biljega je od ranije poznato da su pri jakom intenzitetu izražaja nezavisni prediktori lošeg ishoda, te da je njihovo prognostičko značenje još veće ako postoji zajednički intenzivni izražaj (31,35). Nažalost, zbog malog uzorka nije bilo moguće odrediti ni prognostičko značenje intenzivnog izražaja CD20. Jednako tako, obrnuto proporcionalna povezanost intenziteta izražaja CD45 i CD34 koja je vjerojatni prediktor pozitivne prognoze (3,38), ostavlja mogućnost za pretpostavku da CD45 i u odraslih s ALL može imati i prognostičku važnost.

Za potpuniju analizu prognostičnog značenja izražaja CD45 bilo bi neophodno u analizu uključiti veći broj bolesnika uzimajući u obzir i ostale faktore rizika, kao i njihovu povezanost s intenzitetom izražaja CD45.

ZAKLJUČAK

CD45 biljeg ima važnu ulogu u dijagnostičkom postupku pri razlikovanju hematoloških od nehematoloških zloćudnih bolesti te pri subtipizaciji limfoproliferativnih bolesti. Rezultati nekih istraživanja ukazuju i na moguće prognostičko značenje izražaja CD45 u toj skupini bolesti. Uzorak naših bolesnika ograničene je veličine pa je teško donijeti čvršće zaključke. Ipak, može se zaključiti da je zamijećena nešto niža učestalost CD45 negativnih ALL od očekivane, kao i da se nije uspjelo utvrditi prognostičku važnost izražaja tog biljega na preživljenje.

LITERATURA

1. Okumura M, Matthews RJ, Robb B, Litman GW, Bork P, Thomas ML. Comparison of CD45 extracellular domain sequences from divergent vertebrate species suggests the conservation of three fibronectin type III domains. *J Immunol* 1996; 157: 1569-75.
2. Pericolini E, Gabrielli E, Bistoni G i sur. Role of CD45 signaling pathway in galactoxylomannan-induced T cell damage. *PLoS One* 2010; 5: e12720.
3. Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 343-62.
4. Mustelin T, Coggeshall KM, Altman A. Rapid activation of the T-cell tyrosine protein kinase pp56lck by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6302-6.
5. Donovan JA, Koretzky GA. CD45 and the immune response. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 976-85.
6. Janeway A, Travers P, Walport M, Shlomchik J. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York: Garland Science, 2001, 416-7.
7. Ratei R, Sperling C, Karawajew L i sur. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1998; 77: 107-14.
8. Shah VO, Civin CI, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol* 1988; 140: 1861-7.
9. Bikoue A, George F, Poncelet P, Mutin M, Janossy G, Sampol J. Quantitative analysis of leukocyte membrane antigen expression: normal adult values. *Cytometry* 1996; 26: 137-47.
10. Falini B, Pileri S, Stein H i sur. Variable expression of leucocyte-common (CD45) antigen in CD30 (Ki1)-positive anaplastic large-cell lymphoma: implications for the differential diagnosis between lymphoid and nonlymphoid malignancies. *Hum Pathol* 1990; 21: 624-9.
11. Ozdemirli M, Fanburg-Smith JC, Hartmann DP i sur. Precursor B-Lymphoblastic lymphoma presenting as a solitary bone tumor and mimicking Ewing's sarcoma: a report of four cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 795-804.
12. Hsiao CH, Su IJ. Primary cutaneous pre-B lymphoblastic lymphoma immunohistologically mimics Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *J Formos Med Assoc* 2003; 102: 193-7.
13. Lin O, Filippa DA, Teruya-Feldstein J. Immunohistochemical evaluation of FLI-1 in acute lymphoblastic lymphoma (ALL): a potential diagnostic pitfall. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17: 409-12.
14. Jaffe ES, Chan JK, Su IJ i sur. Report of the Workshop on Nasal and Related Extranodal Angiocentric T/Natural Killer Cell Lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 103-11.
15. DiGiuseppe JA, Louie DC, Williams JE i sur. Blastic natural killer cell leukemia/lymphoma: a clinicopathologic study. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 1223-30.
16. Liu Q, Ohshima K, Sumie A, Suzushima H, Iwasaki H, Kikuchi M. Nasal CD56 positive small round cell tumors. Differential diagnosis of hematological, neurogenic, and myogenic neoplasms. *Virchows Arch* 2001; 438: 271-9.
17. Hendrickx A, Bossuyt X. Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. *Cytometry* 2001; 46: 336-9.
18. Lavabre-Bertrand T, Duperray C, Brunet C i sur. Quantification of CD24 and CD45 antigens in parallel allows a precise determination of B-cell maturation stages: relevance for the study of B-cell neoplasias. *Leukemia* 1994; 8: 402-8.
19. Carulli G, Cannizzo E, Zucca A i sur. CD45 expression in low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res* 2008; 32: 263-7.
20. Maljaei SH, Asvadi EKI, Eivazi EZJ, Nikanfar A, Vaez J. Usefulness of CD45 density in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Indian J Med Sci* 2005; 59: 187-94.
21. Kumar S, Rajkumar SV, Kimlinger T, Greipp PR, Witzig TE. CD45 expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma: clinical and biological correlations. *Leukemia* 2005; 19: 1466-70.
22. Moreau P, Robillard N, Avet-Loiseau H i sur. Pa-

- tients with CD45 negative multiple myeloma receiving high-dose therapy have a shorter survival than those with CD45 positive multiple myeloma. *Haematologica* 2004; 89: 547-51.
23. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haematol* 2002; 24: 1-13.
24. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996; 10: 877-95.
25. Vormoor J, Baersch G, Baumann M, Ritter J, Jurgens H. Flow cytometric identification of candidate normal stem cell populations in CD45-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 100: 501-8.
26. Schabath R, Ratei R, Ludwig WD. The prognostic significance of antigen expression in leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16: 613-28.
27. Moon H, Huh J, Cho MS, Chi H, Chung WS. A case of CD45-, CD19- precursor B cell acute lymphoblastic leukemia with an atypical morphology. *Korean J Lab Med* 2007; 27: 253-6.
28. Behm FG, Raimondi SC, Schell MJ, Look AT, Rivera GK, Pui CH. Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. *Blood* 1992; 79: 1011-6.
29. Nakamura A, Tsurusawa M, Kato A i sur. Prognostic impact of CD45 antigen expression in high-risk, childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 393-8.
30. Inaba T, Shimazaki C, Sumikuma T i sur. CD45-negative acute leukemia in adulthood. *Eur J Haematol* 2000; 64: 66-7.
31. Borowitz MJ, Shuster J, Carroll AJ i sur. Prognostic significance of fluorescence intensity of surface marker expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1997; 89: 3960-6.
32. Pui CH, Frankel LS, Carroll AJ i sur. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* 1991; 77: 440-7.
33. Caldwell CW, Patterson WP, Hakami N. CD45 expression and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 81: 562-3.
34. De Rossi G, Grossi C, Foa R i sur. Immunophenotype of acute lymphoblastic leukemia cells: the experience of the Italian Cooperative Group (Gimema). *Leuk Lymphoma* 1993; 9: 221-8.
35. Chang H, Jiang A, Brandwein J. Prognostic relevance of CD20 in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010;95:1040-2; author reply 2.
36. Maury S, Huguet F, Leguay T i sur. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95: 324-8.
37. Czuczman MS, Dodge RK, Stewart CC i sur. Value of immunophenotype in intensively treated adult acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia Group B study 8364. *Blood* 1999; 93: 3931-9.
38. Pui CH, Hancock ML, Head DR i sur. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82: 889-94.

S U M M A R Y

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF CD45 CELL SURFACE ANTIGEN EXPRESSION IN HEMATOLOGIC MALIGNANCIES WITH MAIN FOCUS ON ACUTE LEUKEMIAS

NJ. GREDELJ ŠIMEC¹, B. JELIĆ-PUŠKARIĆ², A. OSTOJIĆ¹, Z. ŠIFTAR³,
D. FIALA⁴, I. KARDUM-SKELIN^{2,5}, R. VRHOVAC^{1,5} and B. JAKŠIĆ^{1,5}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Division of Hematology*, ²*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*, ³*Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, ⁴*General Hospital Zadar, Department of Transfusion Medicine, Zadar* and ⁵*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

CD45 cell surface antigen is a transmembrane protein with tyrosine phosphatase activity, expressed by all nucleated cells of hematopoietic origin, except erythrocytes and platelets. Monoclonal antibodies directed against CD45 represent irreplaceable

tool in differential diagnosis of hematologic and other, non-hematologic low differentiated malignancies, primarily in cases of: extranodal lymphomas, non-hematologic malignancies with nodal or bone marrow localization or their metastases in mentioned sites. As cell surface immunophenotype marker, CD45 is of great value in differentiation of lymphoproliferative diseases subtypes. By flow cytometry, based on CD45 expression, the malignant cell population is being identified and that fact is used in, not only diagnosis, but also in detection of minimal residual disease, especially in cases of CD45 negative acute leukemias. Incidence of childhood CD45 negative acute lymphoblastic leukemias (ALL) is about 10%. Children diagnosed with low CD45 expression ALL generally have better prognosis than those with high CD45 expression, especially when cut-off value for CD45 expression is set on 90%.

We have analyzed CD45 expression by flow cytometry in 28 consecutive patients diagnosed with ALL in our institution during a 5-year period. Among these patients 7.1% were CD45 negative. A positive correlation between CD45 and CD20 expression was found, and a negative correlation between CD45 and CD34. In our group of patients, CD45 expression did not have any influence on survival.

Key words: CD45, acute leukemia

EKSPRESIJA STANIČNOG PROTEINA P16INK4A KOD PREMALIGNIH PROMJENA VRATA MATERNICE

INES KRIVAK BOLANČA¹, SUZANA KATALENIĆ SIMON¹, KARMELA ŠENTIJA¹,
ŽELJKO DUIĆ^{2,4}, VLASTIMIR KUKURA^{2,5}, GOJKO ZOVKO², JOSIP VALETIĆ² i JASMINA VRANEŠ^{3,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku, ²Klinika za ženske bolesti i porode, ³Zavod za javno zdravstvo „Dr. A. Štampar“, ⁴Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Humani papiloma virus ima nezaobilaznu ulogu u karcinogenezi karcinoma vrata maternice, uglavnom zbog djelovanja dvaju viralnih onkoproteina E6 i E7. Njihova pojačana ekspresija unutar stanica domaćina je vidljiva povećanjem ekspresije staničnog proteina p16INK4a, koji može služiti kao biljeg za displastične i neoplastične stanice epitela vrata maternice. Cilj istraživanja je procijeniti ekspresiju proteina p16INK4a u različitim stupnjevima citološke abnormalnosti u korelaciji s dokazanom infekcijom visoko onkogenih tipova humanog papiloma virusa kako bi se pokazala njegova vrijednost kao dijagnostičkog biljega. U istraživanje smo uključili obriske cerviksa 371 pacijentice u kojih je rađena tipizacija virusa. Simultano, uz uzimanje razmaza VCE (vagina, cerviks, endocerviks) uzet je 171 dodatni uzorak vrata maternice za imunocitokemijsko bojanje i 200 uzoraka uzetih i obrađenih metodom jednog sloja stanica (LBC). Svi su uzorci analizirani citološki i obojani imunocitokemijskom metodom monoklonalnim protutijelom na p16INK4a protein. Bojanje se pokazalo vrlo upješnim kod težih displastičnih promjena i kod karcinoma, dok je kod blažih displastičnih promjena ili urednih nalaza manje uspješno dokazujući time dijagnostičku vrijednost biljega za teže displastične promjene. Zbog mogućnosti reproducibilnosti, metoda bojanja na p16 može poslužiti kao metoda u postizanju opetovanosti rezultata i kontrole kvalitete rada.

Ključne riječi: Papa test, tumorski marker, p16INK4a, cervikalna displazija

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Ines Krivak Bolanča, dr. med
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku
Klinička bolnica „Merkur“
10 000 Zagreb, Zajčeva 19
Tel. 01 22 53 419
E-pošta: ibolanca@inet.hr, ines.krivak@kb-merkur.hr

UVOD

Činjenica da je genom humanog papiloma virusa (HPV) pronađen u 99,7% karcinoma vrata maternice (1), dopušta da ga se proglasi uzročnikom tog karcinoma. Međutim, ako izdvojimo stotinu žena u kojih je dokazana infekcija HPV-om, među njima je eventualno jedna žena u koje će zaista doći do razvoja kliničke bolesti (2). To znači da nije svaka infekcija virusom nužno povezana s kliničkom bolešću, niti da je HPV jedini uzročnik karcinoma cerviksa. Karcinogeneza karcinoma vrata maternice može trajati i do 15-tak godina.

Tragedija je utoliko veća što se radi o bolesti koja je

izuzetno pogodna za probir: poznat joj je uzrok, bolest ima dugačku predkliničku fazu s postepenim razvojem premalignih promjena koje se relativno lagano identificiraju i tretiraju čime se postiže potpuno izlječenje. Sve se događa na organu koji je relativno lagano dostupan kliničkom pregledu. Najučinkovitija metoda detekcije cervikalnih lezija je morfološka metoda citodijagnostike poznata pod imenom Papa test. Papa test je od vremena njegovog predstavljanja do današnjeg dana pokazao izuzetnu vrijednost u otkrivanju premalignih i malignih promjena prvotno na epitelu vrata maternice. Zbog kontinuirane deskvamacije stanica vrata maternice veće su mogućnosti prepoznavanja morfoloških promjena na stanicama pločastog

epitela vrata maternice te otkrivanja premalighnih promjena na cervixu. Papa test nije pogodan za dijagnosticanje premalighnih promjena materija ili drugih ekstrauterinih lokalizacija. On je pogodan primarno za detekciju cervikalnih lezija i još danas predstavlja osnovu gotovo svih programa probira protiv karcinoma vrata maternice. Osnovni nedostatak metode je njezina subjektivnost i otežana reproducibilnost nalaza. Radi se o metodi čija je točnost i specifičnost ovisna o znanju i iskustvu stručnjaka te postoji visoki stupanj nepodudarnosti rezultata među dijagnostičarima što dovodi do nejednolike opetovanosti dobivenih rezultata. Naime, na svakom stupnju obrade uzorka, od načina uzimanja, obrade i bojanja i na kraju analize moguće su pogreške (3,4). U nastojanju da se povisi ukupna osjetljivost probira, zadnjih desetljeća razvijeno je nekoliko novih tehnika uzimanja, obrade i analize cervikalno-endocervikalnih uzoraka, koje se predlažu kao dopunske metode za konvencionalni Papa test u cilju popravljivanja negativnosti i postizanja zadovoljavajuće osjetljivosti metode.

Virusna etiologija karcinoma cerviksa je pretpostavljena 70-tih godina prošlog stoljeća u istraživanjima zur Hausena (5,6), a konačna potvrda o ulozi HPV-a u nastanku vrata maternice su dala istraživanja Walboomersa i Boscha (1,2). Od brojnih tipova HPV-a alfa roda samo 20-tak tipova spada u skupinu tipova visoko onkogenog potencijala kojima je zajednička karakteristika afinitet prema epitelu anogenitalne regije i mogućnost uzrokovanja premalighnih i malignih promjena na epitelu (7). Značenje i važnost perzistirajuće infekcije istaknuo je Kjaer i pokazao da žene s verificiranom dugotrajnom infekcijom HPV-om imaju preko 20 puta veći rizik nastanka nekog od stupnja teže displastične promjene (HSIL, od engl. *High Squamous Intraepithelial Lesion*), a time i karcinoma (8).

Kada virus uđe u stanicu domaćina stanični ciklus se mijenja kao posljedica djelovanja viralnih onkoproteina, osobito E6 i E7. Svaki od njih djeluje na produkte tumor supresorskog gena stanice domaćina: E6 djeluje preko p53 proteina, a E7 preko proteina Rb (retinoblastoma gena) i tako utječu na kontrolu stanične proliferacije. Kada se onkoprotein E7 veže na protein Rb, onemogućava stvaranje kompleksa s komponentom citoplazme koji pak drži u negativnoj sprezi inhibitor kinaze (stanični

protein p16INK4a). Kao posljedica stvaranja kompleksa E7 i Rb ukida se inhibitorno djelovanje na p16INK4a, i on se počinje ekscesivno nakupljati u citoplazmama i u jezgrama stanica zaraženih HPV-om. Upotrebom imunocitokemijskog bojanja monoklonalnim antitijelom može se vizualizirati ekscesivno nakupljanje p16 proteina (9,10).

MATERIJALI I METODE

U istraživanje su uključeni uzorci cerviksa 371 pacijentice kojima je uzet razmaz VCE (vagina, cerviks, endocervikalni razmaz) u citološkoj ambulanti Jedinice za ginekološku citologiju i citogenetiku Zavoda za kliničku citologiju Kliničke bolnice „Mercur“ tijekom dvije godine. Sve su pacijentice testirane na prisustvo HPV-a. Dvije stotine uzoraka razmaza VCE je prikupljeno četkicom *Cervex-Brush (Rovers Medical Devices)*, nakon čega se četkica isprala u epruveti s otopinom za fiksiranje stanica (*PreserveCyT*). Na način i po preporuci proizvođača na aparatu ThinPrep 2000 napravljena su dva razmaza od uzorka svake pacijentice. Jedan je obojan i pripremljen za citološku analizu, a drugi je razmaz pripremljen i obojan imunocitokemijskom metodom s monoklonalnim antitijelom klona E6H4 (CINTec, Heidelberg, Njemačka). Od ostatnog materijala u epruveti uzet je uzorak za dokazivanje visoko onkogenih tipova virusa metodom *Amplicor HPV Test (Roche Molecular Systems)*. Kod ostale 171 pacijentice verificirana je infekcija visoko onkogenim tipovima HPV-a istom metodom, prije kontrolnog razmaza VCE, te su od njih stotinu uzeti uzorci cerviksa za imunocitokemijsko bojanje simultano s uzimanjem kontrolnog razmaza, a od 71 pacijentice uzet je uzorak iz arhive laboratorija. Ti su uzorci dekolrirani u 0,5% HCl, isprani destiliranom vodom te imunocitokemijski obojani.

Po preporuci proizvođača pozitivitet reakcije se proglasilo ako su zapažene smeđe-žuto do tamno smeđe granule u citoplazmi i/ili jezgri barem u 4% morfološki promijenjenih stanica.

Citološka je analiza uključivala klasifikaciju promjena po zagrebačkoj modifikaciji iz 2002. god. klasifikacije citoloških promjena na epitelu vrata

maternice Bethesda. Po toj su klasifikaciji uključeni razmazi kod kojih nisu nađene citološke abnormalnosti, kod kojih je dijagnosticiran ASCUS (engl. *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*), blaže displastične promjene (LSIL, engl. *Low Squamous Intraepithelial Lesion*), teže displastične promjene i cervikalni karcinom (Ca).

REZULTATI

U našem je istraživanju bilo ukupno 60,4% (224/371) pacijentica u kojih je verificirana infekcija HPV-om. U odnosu na citološku dijagnozu, u skupini HSIL promjena i kod karcinoma sve su pacijentice bile pozitivne na neke od tipova HPV-a, dok je kod LSIL-a i ASCUS-a bilo 64 odnosno 10 pacijentica

(15%) p16 pozitivno obojenih uzoraka. Među njima kod tri pacijentice je citološka dijagnoza bila ASCUS -H, te je pozitivitet p16 bio razlog da se te pacijentice upute na kolposkopiju (sl. 3). Kod te tri pacijentice je patohistološka verifikacija potvrdila dijagnozu HSIL-a, kao u svih slučajeva citološke dijagnoze HSIL-a i Ca. U skupini blažeg stupnja displazije rezultati su obrnuto proporcionalni rezultatima za HSIL. Većina blažih displastičnih promjena je negativna na p16, a pozitivitet je nađen u 35% slučajeva. U sl. 1 prikazan je međusoban odnos citoloških abnormalnosti u odnosu na pozitivitet biljega te se vidi statistički značajna razlika LSIL/HSIL ($\chi^2=64,38$; $p<0,01$); ASCUS +LSIL/HSIL ($\chi^2=81,97$; $p<0,01$) kako između blaže i teže displazije tako i između ASCUS-a i displazija, bez obzira na to koji se citološki nalaz odredio kao granična („cut off“) vrijednost, bilo LSIL, bilo ASCUS.

Tablica 1.

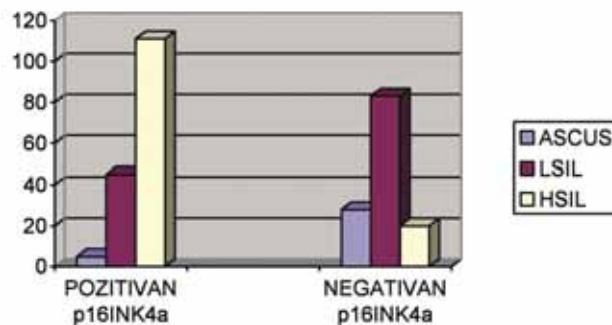
Pozitivitet p16INK4a u citološkim dijagnozama

P16INK4a	BO	ASCUS	LSIL	HSIL	CA	Ukupno
Pozitivan	6 (8,22%)	5 (15,15%)	45 (35,15%)	111 (84,73%)	6 (100%)	172 (46,36%)
Negativan	67 (91,78%)	28 (84,85%)	83 (64,84%)	20 (15,27%)	0	199 (53,64%)
Ukupno	73	33	128	131	6	371 (100%)

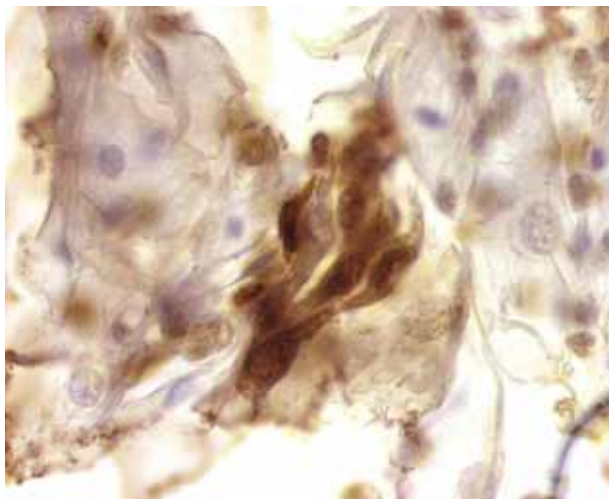
$\chi^2=146,48$; D.F.=4; $p<0,01$

pozitivno na HPV infekciju. U skupini bez citoloških abnormalnosti nije bilo pacijentica s dokazanim HPV-om.

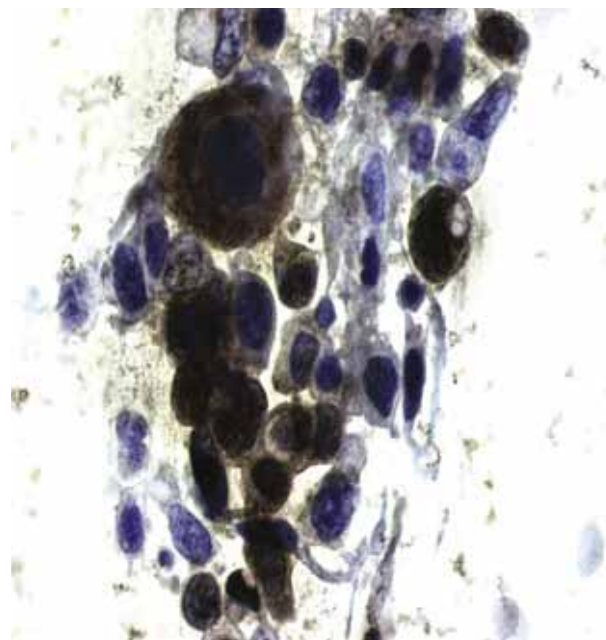
Distribucija pozitivne reakcije bojanja p16INK4a u citološkim dijagnozama prikazana je u tablici 1. U slučaju citološki i HPV negativnih uzoraka pozitivna su bila 6 uzoraka, dok u 90% uzoraka nije zapaženo bojanje na p16. Vidljiva je značajna razlika između pozitiviteta p16 kod citološke dijagnoze HSIL-a i skupine blaže displazije ($\chi^2=146,48$; D.F.=4; $p<0,01$). U slučajevima citološke dijagnoze HSIL-a bojanje na p16 je bilo pozitivno u 85% (sl. 2.), što je potvrdilo citološku dijagnozu i riješilo dilemu citologa kod diskutabilnih slučajeva. U skupini ASCUS dijagnoza bilo je pet uzoraka



Sl. 1. Odnos citoloških abnormalnosti s obzirom na pozitivitet p16INK4a LSIL/HSIL ($\chi^2=64,38$; $p<0,01$); ASCUS +LSIL/HSIL ($\chi^2=81,97$; $p<0,01$)



Sl. 2. Pozitivna reakcija p16 kod citološke dijagnoze ASC-H



Sl. 3. Pozitivna reakcija p16 kod citološke dijagnoze Ca in situ

RASPRAVA

Tijekom karcinogeneze karcinoma vrata maternice postoje dva ključna momenta. Na prvom je mjestu trenutak inicijalne infekcije kod kojega je od velike važnosti tip virusa kojim je došlo do infekcije i trajanje infekcije. Naime, od stotinjak tipova i njihovih inačica samo nekoliko tipova pripada skupini visoko onkogenih tipova koji su direktno povezani s razvojem bolesti. Stoga je od kliničke važnosti znati koji je tip virusa odgovoran za infekciju. Kod mladih osoba, vjerojatno zbog dobrog imunološkog odgovora, veliki dio infekcija HPV-a spontano regredira, bez pojave kliničke bolesti i bez značajnijih, pratećih morfoloških promjena na stanicama (11). Utjecaj, važnost i značenje perzistentne, dugotrajne infekcije je pokazao Kjaer u prospektivnoj studiji iz 2002. godine gdje je pokazao da je u pacijentica kod kojih je verificirana dugotrajna infekcija humanim papiloma virusom i do 30 puta veći rizik nastanka nekog od stupnja HSIL-a a time i karcinoma (8,12-13).

Metodama molekularne dijagnostike moguće je dokazati prisutnost viralnog genoma kratko vrijeme nakon inicijalne infekcije. Isto tako je moguće pokazati prisustvo genoma tijekom svih razvojnih stupnjeva displazije i cijelog procesa karcinogeneze, što dokazuje visoku osjetljivost molekularnih metoda tipizacije virusa (13,14). S druge strane,

upravo ta činjenica da je moguće dokazati prisustvo tijekom cijelog procesa karcinogeneze ukazuje da specifičnost molekularnih metode u probiru nije na zavidnoj razini kao osjetljivost. Na tom se području pokazuje značenje citodijagnostike. Naime, morfološke promjene na stanicama postaju vidljive nešto kasnije, ali kako razvoj bolesti napreduje, one postaju očitije, izraženije i progrediraju pokazujući specifičnost i do 95%, ovisno o autorima (15). Međutim, poznato je i dokazano da morfološke promjene mogu regredirati, ali na temelju isključivo morfologije nije moguće procijeniti koje će od promijenjenih stanica progredirati do karcinoma.

Drugi važan moment u karcinogenezi je trenutak kada se regulacija staničnog ciklusa toliko promijeni da reparatorni mehanizmi stanice više nisu sposobni popraviti nastalu štetu. Kao posljedica toga se događa da je stanici otvoren put u neoplastičnu i malignu proliferaciju. Zapravo bi idealan test probira bio onaj koji ima sposobnost izabrati slučajeve kod kojih se promijenjena regulacija staničnog ciklusa više ne može popraviti. Prilog tome su brojni radovi koji istražuju i dokazuju ulogu različitih tumorskih biljega (16-19). Naime, HPV infekcija uzrokuje promjene u ekspresiji proteina koji reguliraju stanični ciklus stanica domaćina. Ti regulatorni proteini mogu poslužiti kao tumorski biljezi

za displastične promjene. Brojni su biljezi koji su pretpostavljeni, ali s različitim uspjehom i ograničenjima: Ki67 kao proliferativni biljeg i DNA telomeraza su pokazali limitirani potencijal, za razliku od MCM (engl. *Minichromosome Maintenance Protein*) i inhibitora ciklin-ovisne kinaze p16INK4a (20). Istraživanja i studije su pokazale ulogu i mogućnost upotrebe p16INK4a kao markera za infekciju HPV visokog rizika time i da bi p16INK4a mogao biti biljeg za cervikalne intraepitelne lezije, jer je relativno dobro i uspješno identificirao displastične stanice svih stupnjeva promjena od ASCUS-a do karcinoma (21,22). Puno je više uspjeha bilo u identifikaciji HSIL lezija i karcinoma pa je to dovelo do pomisli da bi ga se moglo upotrijebiti kao detektora HSIL promjena u citološkim preparatima (19,23). Naši se rezultati podudaraju s rezultatima sličnih istraživanja. Statistički je značajna razlika među pozitivitetom p16 kod HSIL-a i LSIL-a ($\chi^2=64,38$; $p<0,01$). Teže displastične promjene i karcinomi su u velikom postotku pozitivniji od blažih promjena ili urednih nalaza dokazujući dijagnostičku vrijednost biljega za promjene HSIL-a.

Rezultati pozitiviteta na citološkim dijagnozama LSIL-a od 35% je naizgled veliki postotak, ali on odgovara rezultatima prethodnih istraživanja (18). Naime, oni su rezultat integracije virusa u genom domaćina, što bi označilo promjene koje su u velikoj opasnosti daljnje progresije dokazujući potencijal i vrijednost p16INK4a i kao prognostičkog, a ne samo dijagnostičkog faktora. Osim toga, zbog mogućnosti reproducibilnosti metoda bojanja na p16 može poslužiti kao metoda u postizanju opetovanosti rezultata i kao metoda kontrole i mogućnost usporedbe citoloških rezultata (16,17).

Za potpunu integraciju u rutinsku upotrebu svakako su potrebna opsežnija istraživanja koja neizostavno moraju uključiti i višegodišnje praćenje istraživanih pacijentica radi detaljne procjene prognostičke vrijednosti proteina p16INK4a.

L I T E R A T U R A

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM i sur. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.

2. Bosh FX, Manos MM, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244-65.

3. Davey E, Barratt A, Irwing L, Chan SF, Macaskill P, Mannes P, Saville AM. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet* 2006; 367: 122-32.

4. Pajtler M, Audy-Jurković S, Kardum-Skelin I, Mahovlić V, Mozetić-Vrdoljak D, Ovanin-Rakić A. Organisation of cervical cytology screening in Croatia: past, present, future. *Coll Antropol* 2007; 31(Suppl.2): 47-54.

5. zur Hausen H. Condyloma accuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976; 36: 794.

6. zur Hausen H. Papilloma causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92: 690-8.

7. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 518-27.

8. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow-up study. *BMJ* 2002; 325: 572.

9. von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229-42.

10. Vinokurova S, Wentzensen N, von Knebel Doeberitz, M. Analysis of p16INK4a and integrated HPV genomes as progression markers. *Methods Mol Med* 2005; 119: 73-83.

11. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Incidence and duration of cervical human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 infections in young women: an evaluation from multiple analytic perspectives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 709-15.

12. Khan MJ, Castle PE, Lorinz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1072-9.

13. Castle PE, Solomon D, Schiffm NM, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1066-71.

14. Vince A, Židovec Lepej S. Diagnostic methods and techniques in cervical cancer prevention Part II: Molecular diagnostics of HPV infection. *Med Glas* 2010; 7: 18-25.

15. Cuzick J. HPV testing versus routine cervical screening. *HPV today* 2007; 10: 5.

16. Klaes R, Benner A, Friedrich T. P16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 1389-99.

17. Krivak Bolanča I, Vraneš J. Diagnostic methods and techniques in preventing cervical carcinoma Part I: Conventional cytology and new cytological methods. *Med Glas* 2010; 7: 12-7.

18. Krivak Bolanča I, Ciglar S. Evaluation of p16INK4a in cervical lesion of premenopausal and postmenopausal women. *Coll Antropol* 2007; 31(Supl 2): 107-11.

19. Wentzensen N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinkourova S, von Knebel Doeberitz. Evaluation of a nuclear score for p16INK4a stained cervical squamous

cells in liquid-based cytology samples. *Cancer Cytopathol* 2005; 105: 461-7.

20. Murphy N, Ring M, Sheils O, O'Leary J. Molecular marker in cervical dyskaryosis. U: Prendiville W, Davies P, ur. *Human papillomavirus and cervical cancer*. London, New York: Taylor&Francis, 2004, 72.

21. Nieh S, Chen SF, Chu TY, Lai HC, Fu E. Expression of p16INK4a in Papanicolaou smears containing atypical squamous cells of undetermined significance from uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91: 201-8.

22. Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16INK4a in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002; 27: 365-70.

S U M M A R Y

P16INK4A EXPRESSION IN PREMALIGNANT CERVICAL LESIONS

I. KRIVAK BOLANČA¹, S. KATALENIĆ SIMON¹, K. ŠENTIJA¹, Ž. DUIĆ^{2,4},
V. KUKURA^{2,5}, G. ZOVKO², J. VALETIĆ² and J. VRANEŠ^{3,5}

¹*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics, Division for Gynaecologic Cytology and Cytogenetics*, ²*Department of Gynaecology and Obstetrics*, ³*Dr. A. Štampar Institute of Public Health*, ⁴*University of Rijeka, School of Medicine, Rijeka* and ⁵*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Increased expression of viral E6 and E7 oncoproteins within the host cells results in an increase in cellular protein p16INK4a expression. That increase may serve as a marker for dysplastic and neoplastic cells of the uterine cervical epithelium. The aim of this study is to assess the p16INK4a protein expression in different stages of cytological abnormality in correlation with the proven high oncogenic risk human papillomavirus infection in order to demonstrate its value as the diagnostic marker.

The study included cervical smear samples of 371 patient in whom the viral typization was done. In 171 patient, during their regular gynaecological examination, along with conventional Pap smear sampling an additional smear was taken. Two hundred cervix brush (Rovers Medical DevicesOss, the Netherlands) samples were obtained and analyzed by the LBC method and the ThinPrep2000 machine. All samples were analyzed cytologically, classified according to the Bethesda system, and immunostained with the p16INK4a-specific monoclonal antibody E6H4 (MTM Laboratories, Heidelberg, Germany). A significant difference is seen in p16 positivity between the cytological diagnosis of a high grade cervical squamous intraepithelial lesion and the group with mild dysplasia ($\chi^2=146,48$; D.F.=4; $p<0,01$) while most of the mild dysplastic lesions were p16 negative. In cases of p16 positive mild dysplastic lesions, that positivity is the result of viral integration into the host genome, which would imply lesions at high risk of further progression. The potential and value of p16INK4a protein not only as a prognostic, but also as a diagnostic factor is proved in this way. Reproducibility of the p16 staining technique renders it suitable for follow-up monitoring as well as for comparison of the cytological results.

Key words: Pap test, tumor marker, p16INK4a, cervical dysplasia

STANDARDIZACIJA U LABORATORIJSKOJ HEMATOLOGIJI SUDJELOVANJEM U PROGRAMIMA VANJSKE PROCJENE KVALITETE

AIDA NAZOR¹, ZORAN ŠIFTAR¹ i ZLATA FLEGAR-MEŠTRIĆ^{1,2}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
i ²Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur sudjeluje u međunarodnoj sponzoriranoj kontroli iz područja laboratorijske hematologije – Shema za internacionalnu vanjsku procjenu kvalitete iz hematologije – engl. *International External Quality Assessment Scheme for Haematology* (IEQAS-H) pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije od 1985. g. šest puta godišnje (neparni mjeseci). Temeljem vrlo dobrih rezultata Zavod je 1987. g. dobio certifikat o sudjelovanju u IEQAS-H. Zavod za kliničku kemiju Kliničke bolnice Merkur u suradnji s Hrvatskim društvom medicinskih biokemičara i Zavodom za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta 1986. g. pokreće vanjsku procjenu kvalitete rada iz područja laboratorijske hematologije u Republici Hrvatskoj kojom je danas obuhvaćeno 186 laboratorija tri puta godišnje. Zavod sudjeluje i u međunarodnim projektima u organizaciji Europskog odbora za vanjsku procjenu kvalitete rada u laboratorijskoj medicini (EQALM).

Adresa za dopisivanje: Aida Nazor, dipl. ing. biokemije
Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
Klinička bolnica Merkur
I. Zajca 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: aida.nazor@gmail.com

UVOD

Organizirana vanjska procjena kvalitete rada u laboratorijskoj hematologiji započinje 1974. g. pri *North Manchester General Hospital* (NMGH), kada je inicijativu za pokretanje na lokalnoj razini dao dr. D. W. Dawson. Godine 1977. uspostavljena je međuregionalna shema koja je obuhvaćala sjeverozapadnu Englesku i zapadni Midlands. Iste godine NMGH se povezuje s *Good Hope Hospital* (GHH) u Sutton Colfieldu. S vremenom je u vanjsku procjenu kvalitete rada uključeno čitavo Ujedinjeno Kraljevstvo i uspostavljena je shema za nacionalnu vanjsku procjenu kvalitete rada u laboratorijskoj hematologiji (UK NEQAS). Godine 1995. uslijedila je akreditacija za osiguranje kvalitete od strane *Joint Working Group*, a 2000. g. akreditirani su kod *CPA External Quality Assessment Ltd.*

Na Svjetskom kongresu hematologa u Londonu 1985. g. inicijativom međunarodno vrlo cijenjenog i uvažavanog hematologa, profesora dr Erika Hauptmanna i dr. sc. Doroteje Juričić, specijalistice medicinske biokemije iz Kliničke bolnice Merkur Zagreb, te dr. S. M. Lewisa, direktora Suradnog centra za osiguranje kvalitete u hematologiji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i predsjednika Međunarodnog vijeća za standardizaciju u hematologiji, prihvaća se prijedlog da se Zavod za kliničku kemiju Kliničke bolnice Merkur uključi u redovitu sponzoriranu vanjsku procjenu kvalitete rada iz područja laboratorijske hematologije IEQAS (H) u okviru UK NEQAS. Nekoliko godina kasnije Zavod se uključuje i u redovitu sponzoriranu vanjsku procjenu kvalitete iz područja laboratorijske koagulacije - IEQAS (C). Suradnja traje do danas.

PROVOĐENJE VANJSKE PROCJENE KVALITETE RADA - IEQAS (H)

Vanjskom procjenom kvalitete rada obuhvaćeno je sedamdesetak laboratorija diljem Europe. Cilj vanjske procjene kvalitete rada je usklađivanje rezultata u laboratorijskoj hematologiji neprekidnom edukacijom zasnovanom na povratnim informacijama o rezultatima svakog pojedinog ciklusa kontrole. Kontrolni uzorci dostavljaju se avionskom poštom. Vanjska procjena kvalitete rada provodi se šest puta godišnje iz sljedećih uzoraka:

- za kontrolu broja leukocita, trombocita i hemoglobina na hematološkom analizatoru koriste se pripravci hemolizata u koji su dodani leukociti (pileći eritrociti) i trombociti ili lateks čestice koje po svojim fizikalnim osobinama odgovaraju trombocitima (2 uzorka)
- za mikroskopsko diferenciranje leukocita (DKS) i morfološku analizu krvnih stanica koristi se razmaz venske krvi obojen metodom May-Grunwald Giemsa (2 uzorka)
- za retikulocite koristi se razmaz iz vitalno obojene krvi briljant krezil modrilom ili Azur B (2 uzorka)
- za mikroskopsku analizu krvnih parazita koristi se razmaz venske krvi obojen metodom May-Grunwald Giemsa (2 uzorka od 1992. g.)

Uzorci za hemoglobin i broj stanica analiziraju se najmanje tri puta na hematološkom brojaču i tretiraju se kao uzorci pacijenata. Rezultat analize je prosječna vrijednost svih mjerenja. Uzorke za retikulocite, diferencijalnu krvnu sliku i parazite analiziraju svi laboratorijski djelatnici čiji je to svakodnevni posao. Rezultat analize je srednja vrijednost za retikulocite i diferencijalnu krvnu sliku.

Za parazite, kao rezultat šalje se dogovoreno, usklađeno mišljenje svih osoba koje su analizirale preparate.

Svaki ciklus vanjske procjene kvalitete rada sadrži šest uzoraka. U svaki ciklus obavezno su uključeni uzorci za analizu hemoglobina i krvnih stanica – dakle ukupno 12 uzoraka godišnje. Uzorci za provjeru diferencijalne krvne slike, retikulocita i krvnih parazita se međusobno izmjenjuju, tako da se

godišnje kontroliraju četiri puta, odnosno u osam uzoraka za svaku vrstu pretrage. Svi uzorci su popraćeni odgovarajućim opisom uzorka, uputama za rukovanje i preporukama za analizu. Rezultati se upisuju u definirane obrasce koji prate uzorke. U obrascima je potrebno naznačiti učesnički broj, šifru laboratorija, datum kada je uzorak primljen, rezultate analiza, komentare o kvaliteti pojedinog uzorka, datum analize i potpis odgovorne osobe - voditelja odjela za laboratorijsku hematologiju. Analiza kontrolnih uzoraka istovjetna je s analitičkim postupcima u humanim uzorcima u kojima se svakodnevno određuju parametri krvne slike na analizatoru, diferenciraju leukociti, analizira morfologija krvnih stanica i broje retikulociti (1,2).

Preduvjet za uspješno sudjelovanje u vanjskoj procjeni rada je kontinuirano dnevno provođenje unutarnje kontrole kvalitete rada pomoću komercijalnih kontrolnih uzoraka u sva tri koncentracijska područja za sve parametre krvne slike. Rezultati se statistički obrađuju i mjesečno iskazuje preciznost kao koeficijent varijacije (KV%) za svaki pojedini mjereni parametar, a procjenjuje prema vrijednosti biološke varijacije za preciznost. Analiza točnosti provodi se izračunavanjem odstupanja prema deklariranoj srednjoj vrijednosti za svaki pojedini mjereni parametar krvne slike (BIAS %), a procjenjuje prema dozvoljenoj biološkoj varijaciji za točnost. To je najvažniji segment unutarnje kontrole kvalitete rada, koji kontinuirano provjerava analitički sustav i na temelju kojih rezultata se provode eventualne korekcije analitičkog sustava.

Obrada i kriteriji prihvatljivosti IEQAS (H) rezultata

Rezultati IEQAS (H) vanjske procjene kvalitete rada za hemoglobin, leukocite, trombocite i retikulocite uspoređuju se sa ciljnim vrijednostima i deklariranim intervalima, a iskazuju kao indeks odstupanja (DI) koji se dobiva statističkom obradom rezultata svih učesnika kontrolne sheme. DI za pojedini parametar je rezultat pojedinog učesnika umanjen za ciljnu vrijednost organizatora te podijeljen sa standardnom devijacijom.

Rezultat za pojedini parametar vrednuje se prema indeksu odstupanja DI:

- DI < 0,5 odličan
- DI ± (0,6 – 1,0) dobar
- DI ± (1,1 – 2,0) zadovoljavajući ali granični
- DI ± (2,1 – 3,0) nezadovoljavajući i zahtijeva provjeru
- DI >3,0 ozbiljan problem

Rezultati za diferencijalnu krvnu sliku uspoređuju se s deklariranim intervalima eksperta i svih učesnika. Nađene morfološke promjene na krvnim stanicama daju se opisno pod šifrom - do 5 najbitnijih morfoloških obilježja u razmazu.

Poželjno je postaviti dijagnozu, ali nije obvezno. Organizator nakon obrađenih rezultata kontrole daje detaljan opis i dijagnozu kliničkog slučaja sa svim relevantnim hematološkim i nehematološkim nalazima.

Treba posebno naglasiti da se svi preparati čuvaju i koriste u edukaciji uz objektivne nalaze i komentare eksperta kao člana organizacijskog tima UK IEQAS (H) sheme.

Da bi se priznalo točan nalaz krvnih parazita potrebno je definirati vrstu i podvrstu parazita.

Rezultati vanjske procjene kvalitete - IEQAS (H)

U tablicama 1-7 prikazani su dvadesetogodišnji rezultati vanjske procjene kvalitete rada iz područja laboratorijske hematologije tijekom sudjelovanja u IEQAS-H. Treba naglasiti da se uzorci analiziraju unutar dva dana od primitka. Rezultati se šalju u najkraćem mogućem roku, a najkasnije deset dana nakon primljenih uzoraka. Bilo je problema u redovitom dostavljanju uzoraka tijekom 1991. i 1992. godine, dok su neki uzorci bili neadekvatni za analizu.

U dvadesetpetogodišnjem razdoblju, u Zavodu za kliničku kemiju promijenila su se tri analitička sustava za određivanje hematoloških parametara: Coulter S-Plus (1981.-1991.), Coulter STKS (1991.-2002.) i Sysmex XE-2100 (od 2002. g.). Prema prikazanim rezultatima može se zaključiti da su najveća odstupanja, ali u prihvatljivim granicama, zabilježena na leukocitima. Istodobno su rezultati unutar-

Tablica 1.

Rezultati za hemoglobin prikazani prema indeksu odstupanja DI

Indeks odstupanja DI	Broj kontrolnih uzoraka za hemoglobin	Postotak kontrolnih uzoraka
0,0	26	12,4
± (0,0 – 0,5)	52	24,8
± (0,6 – 1,0)	50	23,8
± (1,1 – 1,5)	38	18,1
± (1,6 – 2,0)	23	10,9
± (2,0 – 3,0)	11	5,2
> 3,0	10	4,8
Ukupno	210	100,0

Tablica 2

Rezultati za leukocite prikazani prema indeksu odstupanja DI

Indeks odstupanja DI	Broj kontrolnih uzoraka za leukocite	Postotak kontrolnih uzoraka
0,0	22	10,5
± (0,0 – 0,5)	36	17,1
± (0,6 – 1,0)	48	22,9
± (1,1 – 1,5)	24	11,4
± (1,6 – 2,0)	22	10,5
± (2,0 – 3,0)	17	8,1
> 3,0	41	19,5
Ukupno	210	100,0

Tablica 3

Rezultati za trombocite prikazani prema indeksu odstupanja DI

Indeks odstupanja DI	Broj kontrolnih uzoraka za trombocite	Postotak kontrolnih uzoraka
0,0	9	4,3
± (0,0 – 0,5)	69	32,9
± (0,6 – 1,0)	54	25,7
± (1,1 – 1,5)	31	14,8
± (1,6 – 2,0)	19	9,0
± (2,0 – 3,0)	15	7,1
> 3,0	13	6,2
Ukupno	210	100,0

Tablica 4

Rezultati za retikulocite prikazani prema indeksu odstupanja DI

Indeks odstupanja DI	Broj kontrolnih uzoraka za retikulocite	Postotak kontrolnih uzoraka
0,0	15	10,3
± (0,0 – 0,5)	39	26,7
± (0,6 – 1,0)	44	30,2
± (1,1 – 1,5)	21	14,3
± (1,6 – 2,0)	8	5,5
± (2,0 – 3,0)	10	6,8
> 3,0	9	6,2
Ukupno	144	100,0

Tablica 5

Rezultati IEQAS (H) izraženi kao prosječni DI za hemoglobin, leukocite, trombocite i retikulocite tijekom 20-godišnje kontrole

Pretraga (mjera)	Broj uzoraka	Prosječni indeks odstupanja DI
Hemoglobin (g/L)	210	0.33
Leukociti (x10 ⁹ /L)	210	0.81
Trombociti (x10 ⁹ /L)	210	- 0.18
Retikulociti (na 1000 eritrocita)	144	0.22

Tablica 6

Rezultati IEQAS (H) za diferencijalnu krvnu sliku - DKS i morfološku analizu krvnih stanica

Pretraga	Broj uzoraka	Prihvatljivi rezultati	Neprihvatljivi rezultati
Diferencijalna krvna slika	141	138	3

Tablica 7

Rezultati IEQAS (H) za krvne parazite

Pretraga	Broj uzoraka	Prihvatljivi rezultati	Neprihvatljivi rezultati
Krvni paraziti vrsta	100	99	1
Krvni paraziti podvrsta	100	76	24

nje kontrole kvalitete korištenjem odgovarajućih kontrolnih uzoraka pokazivali visoki stupanj točnosti i preciznosti. Ta činjenica otvara pitanje korištenja jedinstvenog kontrolnog uzorka koji se može primijeniti na različitim analitičkim sustavima koji se trenutno primjenjuju u laboratorijskoj hematologiji. Idealan bi bio uzorak svježe humane krvi, bez konzervansa, distribuiran unutar 6 sati u sve laboratorije koji sudjeluju u vanjskoj procjeni kvalitete rada što je praktički neizvedivo. No, i primjenom konzerviranih komercijalnih kontrolnih uzoraka, rezultati su dokaz kontinuirane vrlo dobre kvalitete rada. Naime, u Zavodu za kliničku kemiju, više od 30 godina, sustavno se provodi unutarnja kontrola kvalitete rada, bez koje nije moguće sudjelovanje u bilo kojoj vanjskoj procjeni kvalitete i postizanju sukladnih rezultata. Godinama se na tim rezultatima prati trend promjena kvalitete koji ukazuje na stabilnost analitičkih sustava.

Dobri rezultati analize diferencijalne krvne slike (DKS), morfologije krvnih stanica i krvnih parazita isključivo su rezultat znanja i iskustva pojedinog analitičara. Analize provode mikroskopski sve osobe koje se time bave u svakodnevnom radu u Jedinici laboratorijske hematologije Zavoda za kliničku kemiju. Rezultat koji se šalje predstavlja prosječan broj pojedinih vrsta leukocita svih analiza. Morfologija krvnih stanica je opisna i nastaje kao rezultat mišljenja svih analitičara u jedinici za laboratorijsku hematologiju. Uz uzorak se dobivaju podaci o bolesniku iz čijeg je uzorka krvi napravljen preparat – razmaz. To su: dob, spol, broj leukocita, broj trombocita i koncentracija hemoglobina. Rezultati analize retikulocita, DKS i morfološki opis krvnih stanica dobrim dijelom ovise o kvaliteti razmaza, posebno o bojenju.

Rezultati vanjske procjene kvalitete rada – IEQAS (H) pokazuju da samo u jednom preparatu nije uočena i definirana vrsta parazita. U 24 preparata nije prepoznata podvrsta parazita. Dakle, i ti se rezultati mogu prihvatiti kao vrlo dobri. Parazitologija nije područje kojim se Zavod za kliničku kemiju bavi, te je u svakodnevnom radu moguć nalaz parazita kao usputni nalaz tijekom analize krvnog razmaza. U tridesetgodišnjoj praksi u Zavodu za

kliničku kemiju, Jedinici za laboratorijsku hematologiju, otkrivena su dva slučaja malarije i jedan slučaj lišmanioze.

ORGANIZACIJA VANJSKE PROCJENE KVALITETE RADA U REPUBLICI HRVATSKOJ

Zavod za kliničku kemiju Kliničke bolnice Merkur od 2007. g. akreditiran po HRN EN ISO 15189 – Medicinski laboratoriji – Posebni zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost (3), u suradnji sa Zavodom za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko biokemijskog fakulteta, a u organizaciji Povjerenstva za kontrolu kvalitete rada Hrvatskog društva medicinskih biokemičara (HDMB) 1986. g. pokreće, po uzoru na IEQAS, vanjsku procjenu kvalitete rada iz područja laboratorijske hematologije u Hrvatskoj. O toj aktivnosti redovito se izvještava na stručnim skupovima i u stručnim publikacijama (4-9). Vanjska procjena kvalitete rada započela je analizom hemoglobina iz pripravka hemolizata u stotinjak medicinsko biokemijskih laboratorija (MBL) diljem Hrvatske. Ubrzo je proširena s kontrolom retikulocita i diferencijalne krvne slike iz obojenih razmaza. Kontrola DKS iz obojenih razmaza napuštena je zbog nemogućnosti standardizirane pripreme i bojenja razmaza.

Kako dio laboratorija diljem Hrvatske nije posjedovao hematološke brojače, analize krvnih slika rađene su manualnim metodama; hemoglobin spektrofotometrijski ili čak na kolorimetrima, hematokrit u mikrohematokritskim centrifugama, a krvne stanice brojanjem u hemocitometrima pod mikroskopom. Preciznost brojanja krvnih stanica u hemocitometrima kretala se unutar koeficijenta varijacije oko 10%. Komercijalni kontrolni uzorci postojali su samo za hemoglobin.

Logično je da su te činjenice a i rezultati nacionalne procjene kvalitete rada postavili imperativ da se u sve medicinsko-biokemijske laboratorije uvede odgovarajuća raspoloživa tehnologija. Doprinijeli su da danas u Republici Hrvatskoj svih 186 medicinsko biokemijskih laboratorija, koji sudjeluju u nacionalnoj vanjskoj procjeni kvalitete, posjeduju hematološke brojače.

U svakom ciklusu vanjske procjene kvalitete, šalje se komercijalni uzorak krvi i analizira 16 hematoloških parametara dobivenih na analizatorima uključujući indeks raspodjele eritrocita po volumenu (RDW) i trodijelnu diferencijalnu krvnu sliku, što su noviji parametri u procjeni.

Od 2010. godine u suradnji s Hrvatskim zavodom za transfuzijsku medicinu, a poštujući zakonsku regulativu, uvodi se jednom godišnje kao kontrolni uzorak konzervirana humana svježa krv. Uzorci su stabilni pet dana i distribuiraju se na dan proizvodnje brзом poštom u sve medicinsko-biokemijske laboratorije diljem Hrvatske. Prvi su rezultati analizirani i predstavljeni na 6. kongresu medicinskih biokemičara u Supetru u rujnu 2009. godine (10). Za kontrolu retikulocita priređuju se razmazi iz vitalno obojenog uzorka krvi pomoću briljant-krezil modrila. Vanjska se procjena kvalitete provodi tri puta godišnje. Statistički obrađeni rezultati procjenjuju se prema kriterijima prihvatljivosti po uzoru na IEQAS-H, a prema akreditacijskim zahtjevima za organizatore vanjske procjene kvalitete.

Hrvatska komora medicinskih biokemičara dala je preporuke za provođenje stručnog nadzora nad radom medicinsko-biokemijskih laboratorija i medicinskim biokemičarima, gdje je definirana zakonska obaveza sudjelovanja u vanjskoj procjeni kvalitete rada. Vanjska procjena kvalitete rada je jedan od najvažnijih segmenata u ispunjavanju stručnog programa rada svakog medicinsko biokemijskog laboratorija. (11). Redovite i izvanredne nadzore nad radom MBL-a financira Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, temeljem godišnjih izvještaja za svaki laboratorij o rezultatima provedene vanjske procjene kvalitete u RH.

STANDARDIZACIJA IZVANANALITIČKE FAZE U LABORATORIJSKOJ HEMATOLOGIJI - MEĐUNARODNI PROJEKTI

Programi vanjske procjene kvalitete danas sve više obuhvaćaju i izvananalitičku fazu laboratorijskog rada (prijeanalitičku i poslijeanalitičku fazu). U području laboratorijske hematologije u organizaciji Europskog odbora za vanjsku procjenu kvalitete rada u laboratorijskoj medicini - *European Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine* (EQALM)

provedena su dva projekta u području laboratorijske hematologije koje je u Hrvatskoj koordiniralo Povjerenstvo za vanjsku procjenu kvalitete Hrvatskog društva medicinskih biokemičara i time omogućilo sudjelovanje najvećih medicinsko-biokemijskih laboratorija u Hrvatskoj (12-14). U području predanalitičke faze proveden je projekt: *Standardization in haematology: Effect of EDTA-anticoagulated whole blood storage on blood cell morphology examination*. Dobiveni rezultati ukazali su na utjecaj antikoagulansa i temperature u korelaciji s vremenom na morfološke promjene, odnosno stupanj oštećenja krvnih stanica u razmazu. Ispitivanje je provedeno na sedam uzoraka tijekom 5 dana.

Za analizu je poslano 35 kodiranih razmaza koje je trebalo diferencirati i u postotku izraziti različite, definirane morfološke promjene i oštećenja na leukocitima, eritrocitima i trombocitima. Uzorci su podijeljeni na dvije skupine: skupina A skladištena je na 4°C, a skupina B na 25°C. Od svake skupine napravljena po 2 razmaza nakon 6 sati, 24 sata i 48 sati. Konačni su rezultati pokazali da je za točno diferenciranje leukocita i morfološku analizu krvnih stanica presudno da se razmaz iz EDTA-uzorka krvi učini unutar 6 sati od vađenja krvi.

U području poslijeanalitičke faze proveden je projekt: *Post-Analytical External Quality Assessment Scheme for Automated Haematology*. U programu je sudjelovao 151 laboratorij iz 8 europskih zemalja sa 4 analitička sustava koja koriste različitu tehnologiju (ABX, ADVIA, CELL-DYN i SYSMEX). Iz Hrvatske, u projektu je sudjelovalo 8 laboratorija sa 3 različita analitička sustava (ADVIA, CELL-DYN i SYSMEX). Svakom učesniku kontrole predstavljen je hematološki nalaz istog pacijenta na pripadajućem analitičkom sustavu. Zadatak analitičara bio je da kroz jasno postavljena pitanja odgovori kako bi stručno postupio u interpretaciji nalaza, koje bi dodatne analitičke postupke proveo da bi upotpunio i pojasnio rezultate s hematološkog analizatora, odnosno korigirao analitičke izvedbe na pojedinom analitičkom sustavu.

Rezultati su pokazali da postoji prilično velika usklađenost postupaka unutar istog analitičkog sustava, ali da postoje razlike s obzirom na različite medicinske sustave u kojima laboratorij djeluje.

Proširenje programa vanjske procjene kvalitete na područja izvananalitičke faze daju značajan doprinos standardizaciji u području laboratorijske hematologije na globalnoj razini.

ZAKLJUČAK

Različiti analitički sustavi koji se koriste u laboratorijskoj hematologiji postavljaju apsolutni zahtjev za usklađivanjem rezultata. To se može postići kroz nekoliko stupnjeva. U prvom koraku to je redovito, svakodnevno provođenje unutarnje kontrole kvalitete rada i praćenje trenda promjena kvalitete, što podrazumijeva statističku obradu rezultata preciznosti i točnosti i prema potrebi odgovarajuću korekciju analitičkog sustava. Ako laboratorij koristi dva ili više analitičkih sustava, obavezno mora dokazati stupanj usporedivosti nalaza. Drugi korak je svakako sudjelovanje u dobro organiziranoj nacionalnoj vanjskoj procjeni kvalitete rada i usklađivanje rezultata među laboratorijima. U takvom ustroju mora se predvidjeti i sudjelovanje u međunarodnim procjenama u okviru ponuđenih i dostižnih programa vanjske procjene kvalitete rada. IEQAS, pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije, je svakako jedna od najvažnijih. Harmonizacija laboratorijskih pretraga tj. analitičkih metoda i primjena referentnih intervala (15) je jednako važan dio strategije u postizanju sukladnih rezultata među medicinsko-biokemijskim laboratorijima. Ali ipak najvažniji cilj svake dobro organizirane vanjske procjene kvalitete rada treba biti učenje i stručno usavršavanje laboratorijskih stručnjaka na svim razinama. Znanje pridonosi većoj odgovornosti, a odgovornost jamči bolje rezultate rada.

LITERATURA

1. Lewis SM. Quality Assurance in Haematology. Geneva: WHO LBS, 1992.
2. Van Blerk M, Libeer JC. Difference in Evaluation Procedures Between External Quality Assessment Scheme Organizers for Haematology, EQAnews, 2003; 14: no. 4.
3. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Perkov S i sur. Accreditation of medical laboratories in Croatia - experiences of the Institute of clinical chemistry, University

Hospital Merkur, Zagreb. Coll Antropol 2010; 34: 181-6.

4. Juretić D, Čepelak I, Nazor A. External quality control for clinical laboratories in Croatia: General scheme and method for data processing. EQAnews 1991; 2: no. 4,

5. Juretić D, Flegar-Meštrić Z, Čepelak I, Nazor A, Parag G, Sikirica M. Pravila i zadaci vanjske procjene kakvoće rada medicinsko-biokemijskih laboratorija. U: Organizacija, poslovanje i upravljanje u medicinsko-biokemijskom laboratoriju. Zagreb: Hrvatska komora medicinskih biokemičara; 1998, 16-19.

6. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Parag G, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. Ciljevi analitičke kvalitete u vanjskoj procjeni kvalitete rada medicinsko-biokemijskih laboratorija u Republici Hrvatskoj. Biochemia Medica 2005;15: 15-25.

7. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. The external quality assessment schemes for medical biochemical laboratories in Croatia (abstract). 3rd Slovenian Congress of Clinical Chemistry, Ljubljana, Slovenia, Nov.13-15, 2008. Clin Chem Lab Med 2008; 46(10):A249.

8. Juretić D, Flegar-Meštrić Z. Značenje nacionalnog programa vanjske procjene kvalitete u poboljšanju usporedivosti i racionalnoj primjeni medicinsko-biokemijskih pretraga. U: Stavljenić-Rukavina A. Organizacija i poslovanje medicinsko-biokemijskih laboratorija u kontekstu reforme zdravstvenog sustava. Zagreb: Medicinska naklada i Hrvatska komora medicinskih biokemičara, 2009, .21-37.

9. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Nazor A, Sikirica M, Juretić D. Long -Term Evaluation of EQA Data in Croatia. EQA news 2010, no. 1 16 Abstract EQALM Symposium, 2010

10. Nazor A, Juretić D. Humana svježa krv kao uzorak u vanjskoj procjeni rada. 6. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem. 30.9.-4.10.2009. Supetar, Brač. Biochemia Medica 2009; 19 supplement 1: 89.

11. Nazor A., Šiftar Z., Flegar-Meštrić Z. Doprinos vanjske procjene kvalitete (IEQAS) standardizaciji u području laboratorijske hematologije (sažetak). 4. hrvatski kongres hematologa i transfuziologa s međunarodnim sudjelovanjem, 16.-20.5.2007.; Opatija, Hrvatska. Lijec Vjesn 2007; 129 suppl 3:86:HP-35

12. De la Salle B, McTaggart B, Briggs C, Mahon A, Hyde K. Discrepancies observed in Automated Counting EQA: what do they mean? EQA News 2010; no. 1 16. Abstract EQALM Symposium, 2010.

13. Christin Breivik A. Post-Analytical Automated Haematology Survey Organized by EQALM, NOKLUS, Bergen, Norway. EQA News 2010; no. 1 16. Abstract EQALM Symposium, 2010

14. Van Blerk M, Albarède S, Deom A i sur. Comparison of evaluation procedures used by European external quality assessment scheme organizers for haemoglobin concentration and leukocyte concentration. Accred Qual Assur 2009; 13: 145-8.

15. Flegar-Meštrić Z, Juretić D, Čvorišćec D. Harmonizacija laboratorijske medicine u Hrvatskoj. Lijec Vjesn 2006; 128: 183-8.

S U M M A R Y

STANDARDIZATION IN LABORATORY HEMATOLOGY BY PARTICIPATING IN EXTERNAL QUALITY ASSURANCE PROGRAMS

A. NAZOR¹, Z. ŠIFTAR¹ and Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ^{1,2}

¹*Merkur University Hospital, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*
and ²*Univeristy of Zagreb, Faculty of Farmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia*

Since 1985, Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Merkur University Hospital, Zagreb, has been participating in the International External Quality Assessment Scheme for Hematology (IEQAS-H) organized by the World Health Organization (WHO). Owing to very good results, in 1987 the Department received a certificate of participation in this control scheme. Department has been cooperating in the external quality assessment program in laboratory hematology which has been continuously performed in Croatia since 1986 by the Committee for External Quality Assessment Schemes under the auspices of the Croatian Society of Medical Biochemists and School of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb. Nowadays, 186 medical biochemical laboratories are included in the National External Quality Assessment program, which is performed three times per year. Our Department has participated in the international projects of the European Committee for External Quality Assurance Programs in Laboratory Medicine (EQALM).

Key words: hematology, standardization, quality assessment

POVEZANOST IZRAŽAJA BILJEGA CD34 S MORFOLOŠKIM ZNAČAJKAMA BLASTA U AKUTNOJ PROMIJELOCITNOJ LEUKEMIJI I KLINIČKIM ZNAČAJKAMA OBOLJELIH: ISKUSTVO JEDNOG CENTRA

ALEN OSTOJIĆ¹, MARINA PAŽUR², ZORAN ŠIFTAR³,
MIRJANA MARIANA KARDUM PARO³, BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ², NJETOČKA GREDELJ-ŠIMEC¹,
DELFA RADIĆ-KRIŠTO¹, IKA KARDUM-SKELIN^{2,4}, RADOVAN VRHOVAC^{1,4} i BRANIMIR JAKŠIĆ^{1,4}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju, ²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, ³Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu i ⁴Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Cilj rada bio je istražiti povezanost citomorfologije i imunofenotipskog izražaja CD34 antigena na blastima pacijenata oboljelih od akutne promijelocitne leukemije (APL), kao i kliničke te laboratorijske značajke oboljelih. Studijom je obuhvaćeno 16 konsekvativnih pacijenata s APL (69% muškaraca i 31% žena) u dobi od 18 do 78 godina (srednja vrijednost 43,9 ±14,9 godina) dijagnosticiranih u razdoblju od kolovoza 1998. do prosinca 2010. Analizirani su osnovni klinički i laboratorijski parametri te je proučena citomorfologija APL-blasta pri postavljanju dijagnoze kao i njihov imunofenotip. Pacijenti su grupirani prema izražaju CD34 biljega u dvije skupine, te su uspoređivane njihove karakteristike. Razlika u spolu, dobi, vrijednosti leukocita u perifernoj krvi nije ustanovljena. Usporedbom citomorfologije APL-blasta ustanovljeno je da je postotak hipogranularnih/agranularnih APL-blasta u CD34+ skupini (34% ±24,4) veći u odnosu na CD34- skupinu (11,5% ±13,7), uz graničnu razinu statističke značajnosti (p=0,055). Skupina CD34+ imala je znatno kraće preživljenje u odnosu na CD34- (P=0,02). Pacijenti u kojih nisu detektirani Auerovi štapići u blastima imali su viši izražaj CD34 biljega (69,4% ±33,8) u odnosu na skupinu pacijenata u kojih su Auerovi štapići detektirani (7,3% ±24,8), uz graničnu statističku značajnost (p =0,053). Naši su rezultati u skladu s rezultatima ostalih studija te ukazuju na to da su visoki izražaj biljega CD34 i hipogranularnost APL-blasta čimbenici koji definiraju podskupinu bolesnika s APL te da uz ostale suvremene dijagnostičke metode mogu biti važni u planiranju liječenja pacijenata s APL-om.

Cljučne riječi: akutna promijelocitna leukemija, citomorfologija, CD34

Adresa za dopisivanje: Alen Ostojić, dr. med.
Klinička bolnica Merkur
Klinika za unutarnje bolesti
Zavod za hematologiju
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: alen.ostojic@zg.t-com.hr

UVOD

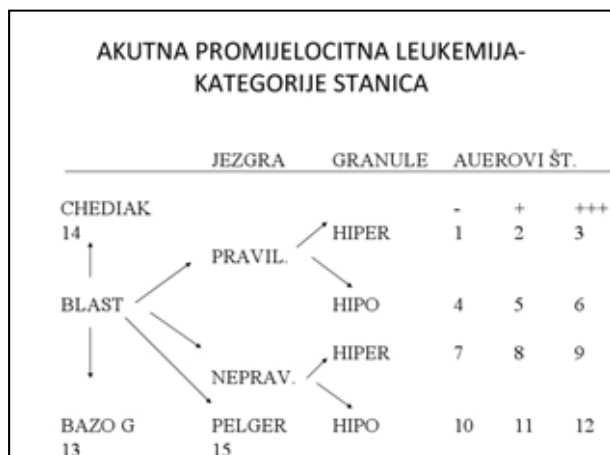
Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije, akutna promijelocitna leukemija (APL) je akutna mijeloična leukemija (AML) s karakterističnom kromosomskom translokacijom t(15;17) (q22;q12) i genskom preuredbom PML-RAR α (1). U manjem broju slučajeva moguće su i druge RAR α translokacijske varijante sa: ZBTB16 na mjestu 11q23, NUMA1 na mjestu 11q13, NPM1

na mjestu 5q35, ili STAT5B na mjestu 17q11,2 (2). Leukemijske stanice APL-a (APL-blasti) su stanice granulocitopoeze zaustavljene u stadiju promijelocita. Prema Francusko-Američko-Britanskoj (FAB) klasifikaciji, citomorfološki razlikujemo dva pod-tipa APL-a: klasičnu hipergranularnu APL (M3) i mikrogranularnu APL varijantu (M3v) (3-5). Na temelju izgleda jezgre, granularnosti citoplazme, te prisustva Auerovih štapića, APL-blaste možemo razvrstati u 15 kategorija (sl. 1) od kojih kategorije

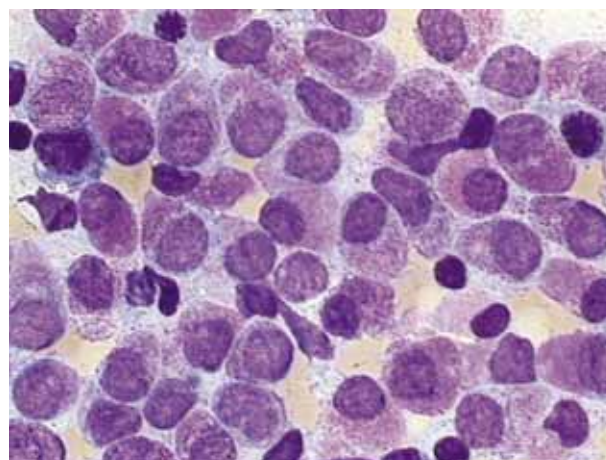
1 do 3 i 7 do 9 obuhvaćaju stanice s hipergranularnom citoplazmom, dok kategorije 4 do 6 i 10 do 12 obuhvaćaju stanice s hipogranularnom odnosno agranularnom citoplazmom. M3 je karakterizirana većinom APL-blasta u kategorijama 7 do 9, dok je M3v karakterizirana većinom APL-blasta u kategorijama 10 do 12. Kategorije 13, 14 i 15 obuhvaćaju tim redom APL-blaste s bazofilnim granulama, one s inkluzijama nalik na Chediakove stanice, odnosno blaste nalik na Pelgerove stanice (6). APL-blasti se, u odnosu na ostale AML-blaste, razlikuju prema visokom izražaju antigenskih biljega CD33 i CD13, negativnom HLA/DR antigenskom biljegu, te niskom izražaju CD34 antigenskog biljega (7-9). Povišen izražaj CD34 biljega povezan je s M3v APL-om i većim postotkom APL-blasta u perifernoj krvi (PK) pri dijagnozi (10), a jedna je studija pokazala i povezanost s lošim kliničkim ishodom (11, 12).

lovoza 1998. do prosinca 2010. godine u Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice Merkur. Dijagnoza je postavljena na temelju nalaza citološkog razmaza periferne krvi i koštane srži te nalaza fuzijskog transkripta PML/RARalfa iz navedenih uzoraka, metodom lančane reakcije polimeraze.

Prikupljeni su podaci o spolu, dobi, broju leukocita u PK pri postavljanju dijagnoze, te o statusu pacijenta i bolesti pri zadnjem pregledu. Nadalje, pregledani su citološki preparati punktata koštane srži pri dijagnozi, obojani po metodi May-Grünwald-Giemsa te analizirana citomorfologija APL-blasta. Izbrojan je postotak APL-blasta po kategorijama stanica od 1 do 15 na 100 APL-blasta. Za potrebe ove studije stanice su grupirane u dva tipa granularnosti: hipergranularne (sl. 2) i hipogranularne/agranularne (sl. 3).



Sl. 1. Kategorije APL-stanica prema Sainty D, Liso V, Cantu-Rajnoldi A i sur.



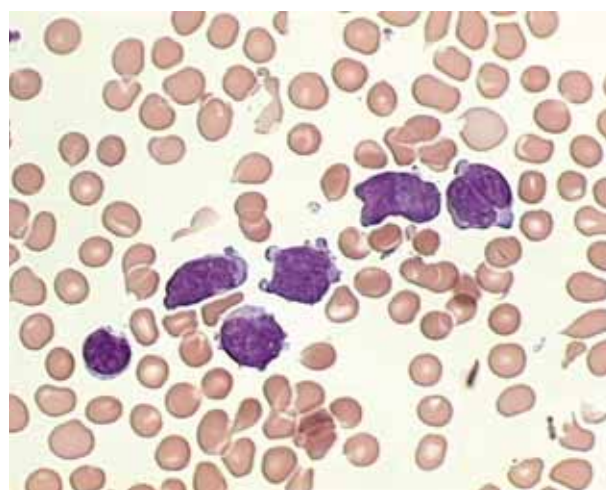
Sl. 2. Hipergranularni APL-blasti (May-Grünwald Giemsa, x1000)

CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je istražiti citomorfologiju i imunofenotipski izražaj CD34 antigenskog biljega APL-blasta, njihov međusobni odnos te odnos prema kliničkim i laboratorijskim značajkama bolesnika s APL-om.

PACIJENTI I METODE

U ovo je istraživanje uključeno 16 konsektivnih pacijenata s akutnom promijelocitnom leukemijom, kojima je dijagnoza postavljena u razdoblju od ko-



Sl. 3. Hipergranularni APL-blasti (May-Grünwald Giemsa, x1000)

Tablica 1.

Analiza imunofenotipa stanica protočnom citometrijom

	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)	12 (%)	13 (%)	14 (%)	15 (%)	hiper- APL [†] (%)	hipo- APL [‡] (%)	Auerovi štapići detektirani
1	59	0 ⁺	0 ⁺	4	0 ⁺	1	25	0 ⁺	0 ⁺	4	0 ⁺	0 ⁺	4	0 ⁺	3	84	9	Da
2	17	0 ⁺	0 ⁺	7	0 ⁺	1	20	0 ⁺	0 ⁺	55	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	37	63	Da
3	65	0 ⁺	29	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	3	1	2	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	100	0 ⁺	Da
4	72	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	5	0 ⁺	0 ⁺	2	0 ⁺	0 ⁺	21	0 ⁺	0 ⁺	77	2	Ne
5	17	0 ⁺	0 ⁺	8	0 ⁺	0 ⁺	45	0 ⁺	0 ⁺	30	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	62	38	Da
6	75	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	16	0 ⁺	0 ⁺	9	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	91	9	Ne
7	69	3	0 ⁺	3	0 ⁺	0 ⁺	21	0 ⁺	0 ⁺	4	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	93	7	Da
8	60	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	31	0 ⁺	0 ⁺	4	0 ⁺	0 ⁺	5	0 ⁺	0 ⁺	91	4	Da
9	72	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	27	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	1	0 ⁺	0 ⁺	99	0 ⁺	Ne
10*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	80	0 ⁺	0 ⁺	18	0 ⁺	0 ⁺	1	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	1	0 ⁺	81	18	Ne
12	68	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	1	15	0 ⁺	0 ⁺	12	0 ⁺	0 ⁺	3	1	0 ⁺	83	13	Da
13	78	0 ⁺	1	5	0 ⁺	0 ⁺	11	0 ⁺	0 ⁺	2	0 ⁺	0 ⁺	3	0 ⁺	0 ⁺	90	7	Da
14	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	1	0 ⁺	0 ⁺	17	0 ⁺	1	80	0 ⁺	0 ⁺	1	0 ⁺	0 ⁺	18	81	Da
15	9	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	42	0 ⁺	0 ⁺	49	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	51	49	Da
16	6	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	31	0 ⁺	0 ⁺	60	0 ⁺	0 ⁺	3	0 ⁺	0 ⁺	37	60	Da

†Zbroj hipergranularnih APL-blasta = 1+2+3+7+8+9; ‡Zbroj hipogranularnih/agranularnih APL-blasta = 4+5+6+10+11+12; +Nema ili <1%;
*Citološki preparati pri dijagnozi nisu bili dostupni za analizu.

Imunofenotip stanica (IF) analiziran je protočnom citometrijom pri čemu su korištena samo direktno obilježena protutijela anti-CD2, -CD3, -CD7, -CD14, -CD19, -CD33, -CD34, -CD56, -CD117, -CD45, anti-CD13, i anti-HLA D/DR, -CD64, -MPO, -Lizozim, -CD79a. Analiza je učinjena na protočnom citometru Cytomics FC500, Beckman Coulter, prema standardnom postupku identifikacije stanica preko izražaja biljega CD45 i postraničnog raspršenja, (engl. *Side Scatter Capability*, SSC).(13, 14) Blasti su karakterizirani niskim izražajem biljega CD45 i umjerenim do višim SSC, što ih razlikuje od limfocita, monocita i zrelih granulocita (tablica 1). Rezultati su iskazani kao postotak pozitivnih stanica na određivane biljege unutar populacije blasta. Za potrebe ove studije udio stanica od ≥20% uzet je kao pozitivan nalaz.

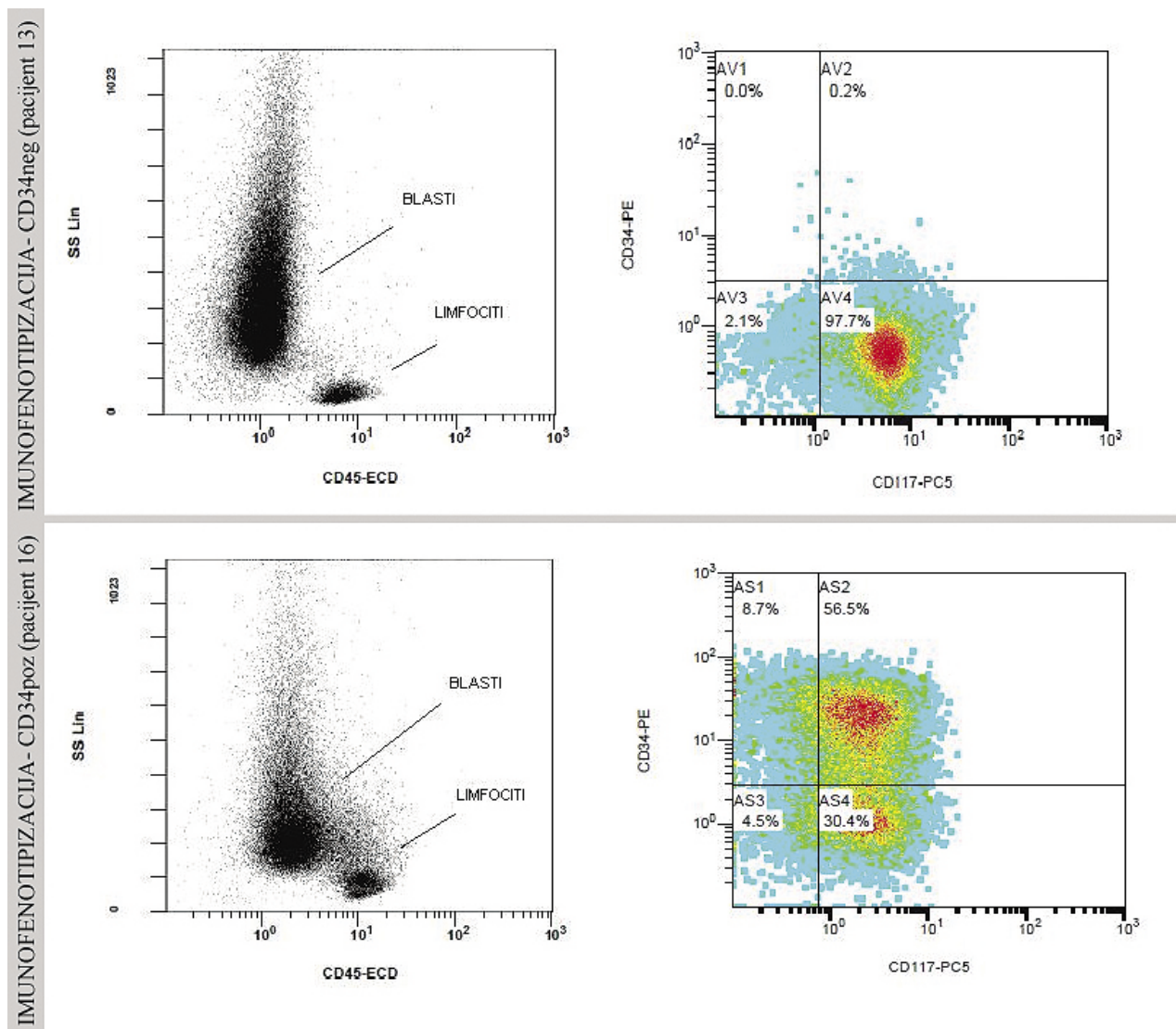
Za statističku analizu korišten je statistički program StatView™, SAS Institute Inc, v. 5.0. Osim metoda deskriptivne statistike korišten je i neparametrijski Mann-Whitneyev test za usporedbu kontinuiranih varijabli u ispitivanim skupinama. Kao statistički značajna vrijednost uzeta je P <0,05. Ukupno preživljenje je mjereno od dana postavljanja dijagnoze do dana smrti ili zadnje kontrole, a izračunato je

pomoću Kaplan-Meierove metode. Log-rank test korišten je za usporedbu krivulja preživljenja.

REZULTATI

Analizirana skupina pacijenata obuhvatila je 11 (69%) muškaraca i 5 (31%) žena. Srednja vrijednost dobi pri postavljanju dijagnoze iznosila je 43 godina (raspon 18-78, SD 14,9), pritom je za muškarce iznosila 41,4 (raspon 18-67, SD 14), a za žene 49,6 godina (raspon 38-78, SD 16,1). Nakon razdoblja praćenja od 4465 dana, ukupno je kumulativno preživljenje iznosilo 54%, odnosno medijan nije dosegnut.

Većinu APL-blasta bolesnika u kojih je analiza bila moguća (N=15) činili su blasti kategorija: 1 (srednja vrijednost 49,8%, raspon 0-80, SD 30,1), 10 (srednja vrijednost 20,7%, raspon 0-80, SD 26,9) i 7 (srednja vrijednost 20,%, raspon 1-45, SD 13,2). Odnos srednjih vrijednosti APL-blasta s pravilnom jezgrom prema APL-blastima s nepravilnom jezgrom bio je 55% (raspon 1-98, SD 32,9) prema 41,67% (raspon 1-98, SD 34). Tablica 1 prikazuje pojedinačne udjele



Sl. 4. Imunofenotipizacija - primjer pacijenta s niskim (gore) i visokim izražajem CD34 antigenskog biljega (dolje)

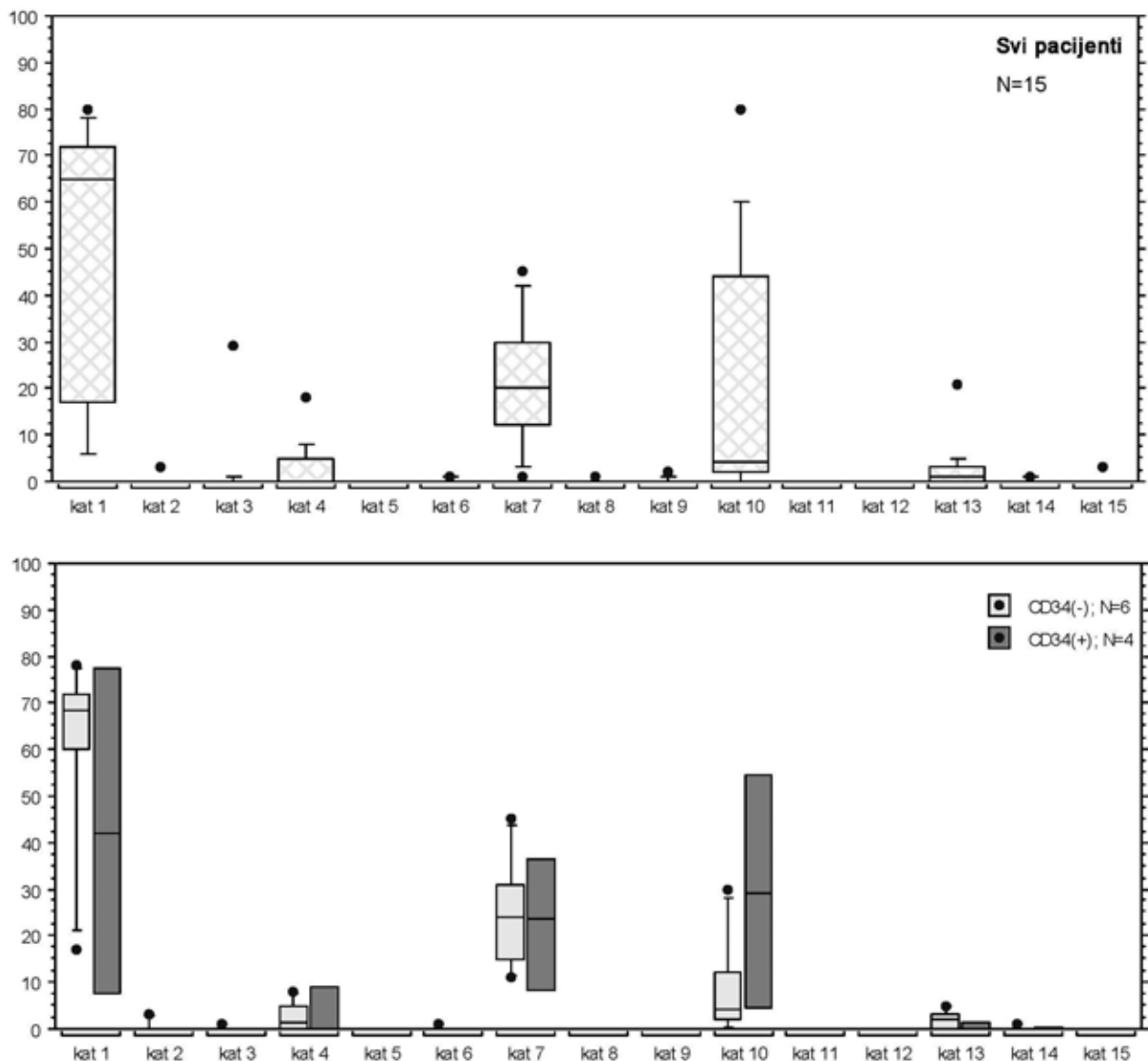
APL-blasta po kategorijama za svakog pacijenta.

Svi pacijenti s dostupnim nalazima IF (N=10) imali su visoki izražaj CD13 i CD33, te niski izražaj HLA/DR antigenskog biljega, osim jednog koji je imao viši izražaj DLA/DR antigenskog biljega (pacijent 11, udio APL-blasta s izraženim biljgom HLA/DR: 27,6%).

U skupini pacijenata s negativnim CD34 biljgom (N=6) većinu APL-blasta činili su blasti s hipergranularnom citoplazmom i to: kategorija 1 (srednja vrijednost 60,%, raspon 17-78, SD 22,), kategorija 7 (srednja vrijednost 25%, raspon 11-45, SD 12,), te kategorija 10 (srednja vrijednost 8,%, raspon 0-30,

SD 11,). Skupina pacijenata s CD34 pozitivnim biljgom (N=4) isticala se većinom APL-blasta kategorije 1 (srednja vrijednost 42,5%, raspon 6-80, SD 40,5), kategorije 10 (srednja vrijednost 29,5%, raspon 0-60, SD 29,5), te kategorije 7 (srednja vrijednost 22,5%, raspon 1-42, SD 17,9). Srednje vrijednosti udjela pojedine kategorije APL-blasta prikazane su na sl. 5.

Skupina pacijenata u kojih nije detektirano postojanje Auerovih štapića u APL-blastima (n=3) imala je višu srednju vrijednost izražaja biljega CD34 (medijan 69,4%, SD 33,8, raspon 19,9-84,5) u odnosu na skupinu pacijenata (n=7) u kojoj su Auerovi štapići detektirani (medijan 7,3%, SD 24,8, raspon 0-67,9),

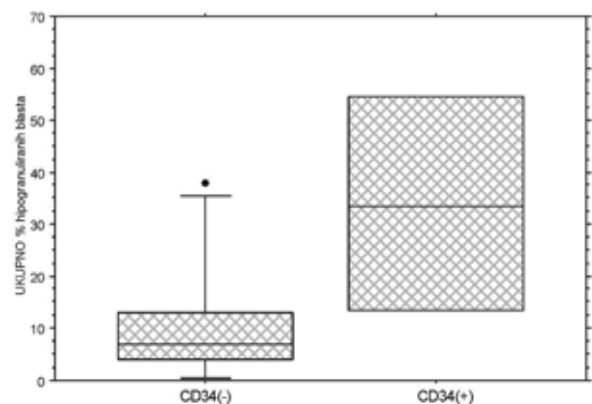


Sl. 5. Srednje vrijednosti udjela kategorija APL-blasta

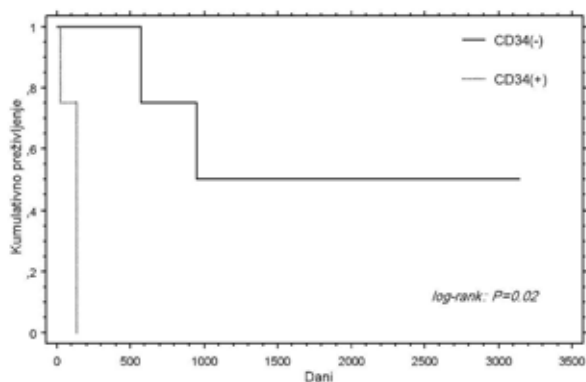
međutim statistička značajnost nije dosegnuta ($p=0,053$).

Skupina pacijenata s CD34 negativnim imunofenotipom imala je upadljivo manji postotak hipogranularnih/agranularnih APL-blasta (srednja vrijednost 11,5%, raspon 0-38, SD 13,7) u odnosu na pacijente s CD34 pozitivnim imunofenotipom (srednja vrijednost 34,0%, raspon 9-60, SD 24,4). Zamijećena razlika u postotku hipogranularnih/agranularnih blasta između skupina (sl. 6) nije dosegla razinu statističke značajnosti ($p=0,055$).

Statistički značajnom pokazala se razlika u ukupnom preživljenju između dviju skupina pacijenata.



Sl. 6. Udio hipogranularnih APL-blasta ovisno o izražaju biljega CD34



Sl. 7. Usporedba kumulativnog preživljenja skupina na temelju izražaja CD34 antigenskog biljega

Pacijenti s pozitivnim CD34 imunofenotipom imali su znatno kraće preživljenje u odnosu na one s negativnim CD34 imunofenotipom (*log-rank: p=0,02*). Sl. 7 prikazuje Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za navedene skupine pacijenata.

Statistički značajna povezanost izražaja biljega CD34 i vrijednosti leukocita u PK nije ustanovljena, kao ni veza između spola i dobi pri dijagnozi s CD34 izražajem i citomorfološkim karakteristikama APL-blasta.

RASPRAVA

Predmet ove studije bila je analiza citomorfoloških značajki blasta te izražaja CD34 antigenskog biljega na njima, u pacijenata kojima je akutna promijelocitna leukemija dijagnosticirana u našoj ustanovi.

Poznato je da je u APL izražaj CD33 biljega prisutan uvijek, dok je izražaj CD13 biljega varijabilan (9). Budući da su APL-blasti stanice koje su u diferencijaciji zaustavljene na razvojnoj razini promijelocita, za očekivati je da na njihovoj površini izostaje viši izražaj CD34 antigenskog biljega, koji je obilježje hematopoetskih progenitornih stanica. Tako je niski izražaj CD34 biljega zajedno s odsustvom HLA/DR biljega smatran paradigmom APL imunofenotipa (7). Međutim, nekoliko je različitih studija pokazalo da se u 20% do 34,5% bolesnika oboljelih od akutne promijelocitne leukemije nalazi pozitivan izražaj CD34 biljega (10-12,15-17). U seri-

ji pacijenata uključenih u ovo istraživanje, dodatno brojčano limitiranoj buduću da za 6 pacijenata nalaz IF pri dijagnozi nije bio dostupan, udio CD34 pozitivnih pacijenata iznosio je 40% ($n=4/10$). Usprkos navedenim ograničenjima i rezultati naše studije pokazuju negativan utjecaj višeg izražaja CD34 biljega na prognozu pacijenata oboljelih od akutne promijelocitne leukemije, što je konzistentno s rezultatima drugih studija u kojima je bio uključen znatno veći broj bolesnika (11,12).

U ovom smo istraživanju osobitu pozornost obratili na citomorfologiju APL-blasta. Za potrebe naše studije grupirali smo ih u dvije skupine s obzirom na granularnost citoplazme. Izražaj CD34 biljega u naših je bolesnika bio jasno povezan s granularnosti citoplazme APL-blasta. Naime, svi pacijenti s pozitivnim CD34 biljegom imali su viši ukupni postotak hipogranuliranih APL-blasta. Iako smo se u ovoj studiji usredotočili na citomorfologiju APL-blasta, a ne na klasifikaciju tipične M3 i varijante M3v, pojačan je izražaj CD34 biljega opisan u nekoliko studija kao jedno od obilježja M3v (6,11,15,16,18).

Iako je akutna promijelocitna leukemija bolest kod koje su zloćudne stanice prema definiciji zaustavljene pri diferencijaciji u stadiju promijelocita, naši rezultati idu u prilog činjenici da u toj bolesti mogu postojati i druge subpopulacije stanica koje su zaustavljene i u ranijim stadijima diferencijacije. Te je stanice s jedne strane moguće prepoznati prema njihovim citomorfološkim karakteristikama, budući da pokazuju hipogranularnost citoplazme, a s druge ih je strane moguće prepoznati prema karakterističnom imunofenotipu, odnosno izražaju CD34 biljega.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja, iako na ograničenom broju bolesnika, u skladu su s do sada poznatima. Visoki izražaj CD34 biljega i hipogranularnost APL-blasta čimbenici su koji definiraju posebnu skupinu bolesnika s akutnom promijelocitnom leukemijom te ih treba uvrstiti u rutinske pretrage koje se provode u dijagnostici bolesnika s APL. Budući da se čini kako bolesnici s tim citomorfo-

loškim i imunofenotipskim značajkama imaju lošiju prognozu, poznavanje tih karakteristika može eventualno biti i od koristi prilikom planiranja terapijskog pristupa pojedinim bolesnicima.

L I T E R A T U R A

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA i sur. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-51.
2. Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht J. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001; 20: 7186-203.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T i sur. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-8.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT i sur. A Variant Form of Hypergranular Promyelocytic Leukemia (M3). *Ann Intern Med* 1980; 92(2 Part 1): 261.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT i sur. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. *Ann Intern Med* 1985; 103: 620-5.
6. Sainty D, Liso V, Cantu-Rajnoldi A i sur. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLZF/RARA gene rearrangements. *Blood* 2000; 96: 1287-96.
7. De Rossi G, Avvisati G, Coluzzi S i sur. Immunological definition of acute promyelocytic leukemia (FAB M3): a study of 39 cases. *Eur J Haematol* 1990; 45: 168-71.
8. Lo Coco F, Avvisati G, Diverio D i sur. Rearrangements of the RAR-alpha gene in acute promyelocytic leukaemia: correlations with morphology and immunophenotype. *Br J Haematol* 1991; 78: 494-9.
9. Paietta E, Andersen J, Gallagher R i sur. The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia* 1994; 8: 1108-12.
10. Albano F, Mestice A, Pannunzio A i sur. The biological characteristics of CD34+ CD2+ adult acute promyelocytic leukemia and the CD34 CD2 hypergranular (M3) and microgranular (M3v) phenotypes. *Haematologica* 2006; 91: 311-6.
11. Foley R, Soamboonsrup P, Carter RF i sur. CD34-positive acute promyelocytic leukemia is associated with leukocytosis, microgranular/hypogranular morphology, expression of CD2 and bcr3 isoform. *Am J Hematol* 2001; 67: 34-41.
12. Lee J-J, Cho D, Chung I-J i sur. CD34 expression is associated with poor clinical outcome in patients with acute promyelocytic leukemia. *Am J Hematol* 2003; 73: 149-53.
13. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996; 10: 877-95.
14. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haematol* 2002; 24: 1-13.
15. Paietta E, Goloubeva O, Neuberg D i sur. A surrogate marker profile for PML/RARα expressing acute promyelocytic leukemia and the association of immunophenotypic markers with morphologic and molecular subtypes. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 59B: 1-9.
16. Guglielmi C, Paola Martelli M, Diverio D i sur. Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J Haematol* 1998; 102: 1035-41.
17. Lin P, Hao S, Medeiros LJ i sur. Expression of CD2 in Acute Promyelocytic Leukemia Correlates With Short Form of PML-RARα Transcripts and Poorer Prognosis. *Am J Clin Pathol* 2004; 121: 402-7.
18. Exner M, Thalhammer R, Kapiotis S i sur. The "typical" immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL-M3): Does it prove true for the M3-variant? *Cytometry* 2000; 42: 106-9.

S U M M A R Y

ASSOCIATION OF CD34 CELL SURFACE ANTIGEN EXPRESSION WITH CYTOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA BLASTS AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS: ONE CENTER EXPERIENCE

A. OSTOJČIĆ¹, M. PAŽUR², Z. ŠIFTAR³, M. M. KARDUM PARO³, B. JELIĆ-PUŠKARIĆ², NJ. GREDELJ-ŠIMEC¹, D. RADIĆ-KRIŠTO¹, I. KARDUM-SKELIN^{2,4}, R. VRHOVAC^{1,4} and B. JAKŠIĆ^{1,4}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Division of Hematology*, ²*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*, ³*Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and* ⁴*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

The aims of the study were to investigate the association between cytomorphology and immunophenotypic expression of CD34 cell surface antigen of blasts and their relationship with clinical and laboratory characteristics of patients with acute promyelocytic leukemia (APL). Sixteen consecutive patients (male 69% and female 31%) diagnosed with APL at Department of Hematology, Merkur University Hospital between August 1998 and December 2010 were included in the study. The mean age of patients was 43.9 (range: 18-78, SD 14.9). The patients' clinical and laboratory features, cytomorphological characteristics of APL-blasts and their immunophenotype determined by flow cytometry were analyzed. Patients were divided into two groups, CD34- and CD34+, and were then compared according to clinical and laboratory characteristics. There was no difference according to age, sex or white blood cell count between two groups. The mean value of hypogranular/agranular APL-blasts was markedly higher in CD34+ group than CD34- group (34%, range 9-60, SD 24.4 vs. 11.5%, range 0-38, SD 13.7), with borderline statistical significance ($P=0.055$). CD34- patients had significantly better overall survival than CD34+ ones ($P=0.02$). Patients without Auer rods detected in APL-blasts had higher CD34 expression ($69.4\% \pm 33.8$) compared to patients with detected Auer rods ($7.3\% \pm 24.8$), but statistical significance was not reached ($p=0.053$). Our results are consistent with the results of other published studies and point to the fact that higher CD34 expression and lower cytoplasmic granularity of APL-blasts are factors that seem to define a specific subgroup of APL patients. Together with other diagnostic tools currently available, they could be of value in planning treatment of APL patients.

Key words: acute promyelocytic leukemia, cytomorphology, CD34

PROTOČNA CITOMETRIJA I AKUTNO ODBACIVANJE BUBREGA DOKAZANO PATOHISTOLOŠKIM NALAZOM

ZORAN ŠIFTAR¹, IVICA SOKOLIĆ¹, MIRJANA MARIANA KARDUM PARO¹, AIDA NAZOR¹,
MLADEN KNOTEK^{2,4}, MIRJANA SABLJAR-MATOVINOVIĆ², ŽELJKO VIDAS³
i ZLATA FLEGAR-MEŠTRIC^{1,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, ²Klinika za unutarnje bolesti,
Zavod za nefrologiju, ³Služba za urologiju, ⁴Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet i
⁵Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Prosudba primijenjene doze imunosupresivne terapije i njene efektivnosti na kratko i dugotrajno preživljenje presatka, još uvijek je sigurno moguća samo PHD nalazom biopsije bubrega, koja nije bez rizika. U studiju su uključena 54 pacijenta koji su imali jednostruku ili multiorgansku implantaciju organa. Pacijenti su podijeljeni u 2 skupine prema histološkom nalazu inducirane biopsije bubrega tijekom prvih 6 mjeseci: 30 bez odbacivanja, i 24 s dokazanim odbacivanjem. U treću skupinu ispitanika je uključeno 15 visoko senzibiliziranih pacijenata u kojih je primijenjena terapija s anti-timocitnim globulinom. Imunološki profil je uključivao brojnost limfocitnih populacija u cirkulaciji, iskazan kao apsolutni broj stanica i relativni udio: T i B limfociti, NK stanice, CD4+ i CD8+ T limfociti, aktivirani T limfociti (CD25+, CD69+) i CD4+CD25+ u venskoj krvi, u definiranim vremenskim intervalima: prije transplantacije, te 7, 14, 21, 30, 60 i 90 dana posttransplantacijski. Mjerenje je urađeno na protočnom citometru EPICS XL, Coulter, prema CD45/SSC standardnom protokolu uz upotrebu *FlowCount beads* za kvantifikaciju stanica. Učestalo praćenje unutar 90 dana postratransplantacijskog razdoblja pokazalo je da za veliku većinu određivanih vrsta limfocita ne postoji značajna razlika između dviju definiranih skupina ispitanika s dokazanim odbacivanjem presatka i bez njega. Posebna skupina pacijenata, u kojih je primijenjena poliklonska, ATG terapija, rezultira u izrazitoj depleciji T limfocita i NK stanica, posredno imajući učinak na B limfocite, dovodeći do njihove međusobne preraspodjele unutar limfocitne populacije. Kontinuirano praćenje broja imunosnih stanica u cirkulaciji je korisno u procjeni efikasnosti imunosupresivne terapije na staničnoj razini i oporavka pacijenta, a bezuvjetno kod primjene ATG terapije.

Ključne riječi: transplantacija, presadak, protočna citometrija, imunosupresija, imunološko praćenje, odbacivanje

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Zoran Šiftar, mag. med. biokemije
Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
Klinička bolnica Merkur
I. Zajca 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: zoran.siftar@gmail.com

UVOD

Presadivanje organa, tkiva ili krvotvornih stanica je danas standard u liječenju bolesnika s terminalnim stadijem bolesti s ciljem izlječenja i poboljšanja kvalitete života. Prošlo je više od pola stoljeća od prve uspješne transplantacije bubrega koju je učinio Joseph Murray između jednojajčanih blizanaca, koja je širom otvorila vrata razvoju transplantacijske medicinske znanosti i prakse. Od tada je učinjeno mnogo napora na razvoju novih lijekova, spoznavanju humane imunologije i razmatranju

potencijalno učinkovitih parametara u predviđanju uspješnosti transplantacije, okupivši na tom putu različite profesije s istim ciljem (1). Danas gotovo da i nema organa ili tkiva koji se ne presaduje. Najveći broj transplantacija u svijetu i dalje pripada bubregu, a slijede jetra, srce, pluća, gušterača i kombinacije organa (2). Transplantacija organa ili tkiva između genetski neidentičnih osoba iste vrste povezana je s odbacivanjem i svim ostalim problemima. Glavni uzrok propasti presatka je odbacivanje, od niza mogućih kao što je opće stanje primatelja, funkcionalno stanje presatka, kirurškog postupka,

intraoperativnog vođenja primatelja i dr. (3,4). Membrana presatka sadrži antigene koje domaćin nema i prepoznaje ih kao strano. Na odbacivanje ili na razvoj tolerancije na presadak utječu i stanični, posredovan T limfocitima, kao i humoralni imuni sustav, preko protutijela koje proizvode B limfociti. Kako ne može biti eliminiran, alograft stalno aktivira imuni sustav primatelja, rezultirajući doživotnom prekomjernom proizvodnjom citokina, konstantnom citotoksičnom aktivnosti i sustavnom promjenom vaskulature presatka. Za toleranciju presađenog organa, imuni odgovor mora biti eliminiran ili u najmanju ruku minimaliziran. Zbog toga je da se osigura preživljenje presatka potrebna doživotna imunosupresija. Imunosupresivna terapija je dozirana prema empirijskim terapijskim protokolima baziranim na tjelesnoj težini ili razini lijeka u cirkulaciji, a koji uključuju rizik nedostatne ili prekomjerne imunosupresije što se manifestira odbacivanjem presatka, povećanom osjetljivosti na infekcije, nastankom tumora i drugim negativnim učincima lijeka kao što je nefrotoksičnost, ateroskleroza, hiperlipidemija i hipertenzija (1,5). Obično su primatelji tretirani kombinacijom imunosupresiva koja uključuje kalcineurinski inhibitor (ciklosporin, takrolimus), steroide, antimetabolite (mikofenolat, azatioprim), poliklonska (antitimocitni globulin, ATG) ili monoklonska protutijela (anti-CD3, anti-CD25), čije je djelovanje na imuni sustav različito, imajući kao posljedicu sinergistički učinak na supresiju enzima, citokina, gena za citokinske receptore, adhezijske molekule, ko-stimulirajuće molekule, broj T ili B limfocita i dr. Može se identificirati kao pad u broju krvnih stanica, u smanjenju količine cirkulirajućih imunoglobulina, promjeni u histologiji imunskog tkiva i dr. Određenom broju visoko senzibiliziranih pacijenata uvodno se daje poliklonska (antimocitni globulin, ATG) terapija.

U retrospektivnim studijama veliki broj imunoloških parametara je pokazao povezanost s kliničkim pokazateljima (1,6). Identifikacija imunoregulacijskih populacija T limfocita i njihova broja jedna je od važnijih uloga protočne citometrije u transplantaciji solidnih organa (7,8). Dvije su glavne populacije T limfocita koje se razlikuju izražajem na membrani molekula poznatih kao CD4 i CD8. CD4+ ili pomoćnički T limfociti se mogu podijeliti prema vrsti citokina, hormonskih glasnika, koje proizvo-

de na Th1 i Th2 stanice. Th1 stanice su karakterizirane proizvodnjom proupalnih citokina kao što je IFN γ , IL-2, TNF- β , i sudjeluju u staničnom tipu imunosti. Th2 stanice proizvode IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 citokine, i povezane su s alergijskim tipom odgovora. Odnos Th1-Th2 stanica je značajan za sudbinu presatka. Th1 odgovor je povezan s izazivanjem akutnog odbacivanja i reakcijom graft versus host, dok učinak Th2 odgovora nije do kraja razjašnjen (1,8). Danas je poznata i treća skupina T limfocita, koja se naziva i regulatornim T stanicama (Treg), za koje se zna da su povezane s inhibicijom imunog odgovora primatelja na presadak i razvojem tolerancije i za njih se misli da imaju ključnu ulogu u kontroli stanične imunosti (9).

Opisano je nekoliko skupina Treg stanica: prirodne regulatorne CD4+ T, inducirane regulatorne CD4+ (Th3, Tr1) i CD8+ Treg stanice, koje se svojim fenotipskim obilježjima vrlo teško mogu razlikovati od izvršnih stanica iste vrste (10). Za sada je najbolje fenotipski definirana skupina CD4+CD25^{high}Foxp3+CD127^{low} pomoćničkih T limfocita. Druga skupina stanica koji pripadaju citotoksičnim T limfocitima, definirana kao CD8+CD28-Foxp3+ T limfociti, također ima supresorsku ulogu na stanični odgovor (11). Mjerenjem brojnosti T regulatornih stanica tijekom vremena dobija se uvid u kapacitet inhibitorynog sustava i može predvidjeti razvoj tolerancije domaćina na presadak. Nadalje, praćenjem brojnosti stanica pozitivnih na određene biljege aktivacije, receptore ili ligande pokušavaju se predvidjeti učinci imunološkog odgovora domaćina. Pokazano je da porast broja stanica, CD3+ (T limfociti), HLA DR+ (T i B limfociti, monociti), CD64+ (monociti) u cirkulaciji i mokraći kao i brojnost aktiviranih stanica, CD25+, CD69+, HLA D/DR+, FAS-L+(CD178) korelira s razvojem akutnog odbacivanja (1,12,13,14,15).

CILJ RADA

Prosudba primijenjene doze imunosupresivne terapije i njena učinka na kratko i dugotrajno preživljenje presatka, još uvijek je sigurno moguća samo PHD nalazom biopsije bubrega, koja nije bez rizika. Cilj ovog istraživanja je pronalazak fenotipski određenih stanica ili promjena njihova sadržaja tijekom vremena.

METODE RADA

U studiju su uključena 54 pacijenta KB Merkur koji su tijekom 2007. i 2008. godine imali jednostruku ili multiorgansku implantaciju organa (41 bubreg, 9 bubreg/pankreas i 4 bubreg/jetra), od čega 23 muških i 31 žena prosječne dobi od 44 godine (raspon 16-68 godina). Pacijenti su podijeljeni u 2 skupine prema histološkom nalazu inducirane biopsije bubrega tijekom prvih 6 mjeseci: 30 bez odbacivanja, i 24 s dokazanim odbacivanjem (bubreg 20, bubreg/pankreas 2, bubreg/jetra 2). Svi su primili četverostruku kombinaciju immunosupresivne terapije tijekom induksijske faze i faze održavanja, koja se sastojala od kortikosteroida (prednisolon), kalcineurinskog inhibitora (ciklosporin ili takrolimus), monoklonskog protutijela anti-CD25 (Dacilizumab) i antimetabolita (mikofenolat-mofetil). U treću skupinu ispitanika uključeno je 15 visoko senzitiviranih pacijenata u kojih je primijenjena terapija s antitimocitnim globulinom (ATG) umjesto monoklonskog protutijela. Imunološki profil je uključivao brojnost limfocitnih populacija u cirkulaciji, iskazan kao apsolutni broj stanica i relativni udio: T i B limfociti, NK stanice, CD4+ i CD8+ T limfociti, aktivirani T limfociti (CD25+, CD69+) i CD4+CD25+ u venskoj krvi, u definiranim vremen-

skim intervalima: prije transplantacije, i 7, 14, 21, 30, 60 i 90 dana posttransplantacijski. Mjerenje je urađeno na protočnom citometru EPICS XL, Coulter, prema CD45/SSC standardnom protokolu uz upotrebu *FlowCount beads* za kvantifikaciju stanica (16-20). U radu su korištena samo direktno obilježena protutijela anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD19, -CD16, -CD56, -CD45, tvrtke Beckman-Coulter, i anti-CD25, -CD69, Ancell. Rezultati su iskazani kao medijan vrijednosti i 95 centilni raspon. Neparametrijska analiza Mann-Whitneyevim testom korištena je za usporedbu varijabli između skupina, a ANOVA Kruskal-Wallis analiza varijanci unutar skupina. P vrijednost manja od 0,05 uzeta je kao statistički značajna. Za rad je korišten MedCalc statistički program, verzija 11.5.

REZULTATI I RASPRAVA

Učestalo praćenje unutar 90 dana postratransplantacijskog razdoblja pokazalo je da za veliku većinu određivanih vrsta limfocita ne postoji značajna razlika između dviju definiranih skupina ispitanika, s dokazanim odbacivanjem presatka i bez odbaci-

Tablica 1

Statistički značajne razlike u brojnosti limfocitnih skupina unutar i između skupina ispitanika s dokazanim akutnim odbacivanjem i bez njega unutar prvih 90 dana posttransplantacijskog razdoblja

Ispitanici	Vrsta stanica	Vrijeme nakon transplantacije (dani)	Broj stanica (x106/L) Medijan (95 centilni interval)	p vrijednost
Unutar skupine				
Bez dokazanog akutnog odbacivanja (BEZ)	Podskupina	0	15 (8-21)	0,0066
	T limfocita (CD3+CD25+)	7	2 (1-14)	
	Podskupina pomoćničkih	0	10 (7-17)	
Sa dokazanim akutnim odbacivanjem (SA)	T limfocita (CD3+CD4+CD25+)	7	1 (0-4)	0,0011
	Podskupina	0	17 (8-33)	0,0002
	T limfocita (CD3+CD25+)	7	4 (2-8)	
Podskupina pomoćničkih	0	13 (6-28)		
Između skupina	T limfocita (CD3+CD4+CD25+)	7	2 (1-6)	0,0003
	Podskupina	30	BEZ 3 (2-14)	0,0436
	T limfocita (CD3+CD25+)	0	SA 1 (0-4)	
T limfociti (CD3+)	0	BEZ 808 (544-1023) SA 1183 (962-1331)	0,0161	
	NK stanice (CD3-CD16+CD56+)	0	BEZ 134 (68-188) SA 224 (154-256)	0,0305

* između skupina BEZ i SA ne postoji značajna razlika u u broju stanica ostalih ispitivanih vrsta limfocita

** unutar skupina ne postoji značajna razlika u broju broju stanica ostalih ispitivanih vrsta limfocita ovisna o vremenu

Tablica 2

Statistički značajne razlike u udjelu limfocitnih skupina unutar i između ispitanika s dokazanim akutnim odbacivanjem i bez njega unutar prvih 90 dana posttransplantacijskog razdoblja

Ispitanici	Vrsta stanica	Vrijeme nakon transplantacije (dani)	Broj stanica (%) Medijan (95 centilni interval)	p vrijednost
Unutar skupine				
Bez dokazanog akutnog odbacivanja (BEZ)	Podskupina T limfocita (CD3+CD25+)	0 7	1,5 (1,2-2,0) 0,5 (0,1-1,0)	0,0059
	Podskupina pomoćničkih T limfocita (CD3+CD4+CD25+)	0 7	1,21 (0,56-1,63) 0,17 (0,04-0,39)	0,0024
	T limfociti (CD3+)	60 90	80,5 (65,9-83,3) 84,6 (81,2-88,0)	0,0396
Sa dokazanim akutnim odbacivanjem (SA)	Podskupina T limfocita (CD3+CD25+)	0 7	1,3 (0,7-2,0) 0,5 (0,2-0,6)	0,0010
	Podskupina pomoćničkih T limfocita (CD3+CD4+CD25+)	0 7	0,76 (0,36-1,71) 0,20 (0,14-0,44)	0,0006
Između skupina				
	Pomoćnički T limfociti (CD3+CD4+)	30	BEZ 44,8 (39,5-51,0) SA 53,6 (42,8-71,0)	0,0352
	Pomoćnički T limfociti (CD3+CD4+)	60	BEZ 48,7 (39,9-54,3) SA 56,6 (50,0-72,7)	0,0473

* između skupina BEZ i SA ne postoji značajna razlika u u broju stanica ostalih ispitivanih vrsta limfocita

** unutar skupina ne postoji značajna razlika u broju stanica ostalih ispitivanih vrsta limfocita ovisna o vremenu

Tablica 3

Terapijski učinak poliklonske (ATG) terapije na brojnost i udio limfocitnih populacija u usporedbi sa standardnom imunosupresivnom terapijom (skupina BEZ i SA dokazanim odbacivanjem organa)

Vrsta stanica			
Udio stanica (x106/L) Medijan (95 centilni interval)			
	T limfociti (CD3+)	B limfociti (CD19+)	NK stanice (CD16+CD56+CD3-)
ATG*	114 (94-209)	58 (41-100)	9 (7-10)
BEZ	572 (280-981) *p<0,0001	144 (31-291) p=0,2078	53 (17-88) *p<0,0001
SA	791 (460-1181) *p<0,0001	186 (59-252) *p<0,0058	66 (44-89) *p<0,0001
Udio stanica (%) Medijan (95 centilni interval)			
ATG*	32,2 (23,2-42,3)	52,5 (46,5-62,1)	5,3 (4,5-7,5)
BEZ	73,0 (63,5-77,3) *p<0,0001	19,9 (8,8-30,7) *p<0,0001	4,8 (2,1-14,8) p=0,9409
SA	74,5 (63,1-80,0) *p<0,0001	15,6 (8,2-19,9) *p<0,0001	5,8 (3,2-7,8) p=0,6258

* za statistički značajne razlike p<0,05

vanja presatka (tablice 1 i 2). Pregledom apsolutnog broja stanica pokazalo se da su bazalne vrijednosti (dan 0) T limfocita i NK stanica bile više u pacijenata koji su kasnije doživjeli epizodu akutnog odbaciva-

nja (p= 0,0161 i 0,0305), ali tijekom razdoblja razlike su smanjene i postale statistički neznačajne. Razlika između skupina je nađena za apsolutan broj subpopulacije T limfocita (CD3+CD25+) u 30. danu,

ali ne i za njihov udio, i još važnije ne za podskupinu pomoćničkih T limfocita (CD3+CD4+CD25+) koja je glavni nositelj CD25+ stanica, što pripisujemo vrlo niskim nađenim vrijednostima. Relativni broj pomoćničkih T limfocita u skupini s dokazanim odbacivanjem je viši u odnosu na skupinu bez ($p=0,0352$ i $0,0473$) u 30. i 60. danu posttransplantacijski što nije uočeno u apsolutnom broju. CD4+ T limfociti su nositelji staničnog imunološkog odgovora, uključuju i pripadnike s aktivacijskim i inhibicijskim potencijalom, pri čemu njihova brojnost nije jedini čimbenik, već unutarnja preraspodjela subpopulacija. Značajan pad broja i udjela podskupine T limfocita (CD3+CD25+) kao i podskupine pomoćničkih T limfocita (CD3+CD4+CD25+) nađen je u obje skupine unutar prvih 7 dana, međusobno nediferentan, uz njihov postepeni oporavak tijekom vremena. Posebna skupina pacijenata, u kojih je primijenjena poliklonska, ATG terapija, umjesto monoklonske anti-CD25, dovodi do izrazite deplecije T limfocita i NK stanica (medijan: 114 i $9 \times 10^6/L$; odnosno $32,2$ i $5,3\%$ od limfocitne populacije) ($p < 0,0001$), posredno imajući učinak na B limfocite (medijan $58 \times 10^6/L$, $p=0,2078$ i $0,0058$), dovodeći do njihove međusobne preraspodjele unutar limfocitne populacije (tablica 3). Zbog vrlo velike potentnosti ATG-a pacijenti su izrazito imunokompromitirani, te je neophodno dnevno praćenje i moduliranje terapije održavajući broj T limfocita unutar terapijskih granica: $20-200 \times 10^6/L$.

ZAKLJUČAK

Kontinuirano praćenje broja imunskih stanica u cirkulaciji korisno je u procjeni učinkovitosti imunosupresivne terapije na staničnoj razini i oporavka pacijenta, a bezuvjetno kod primjene ATG terapije. U retrospektivnim studijama veliki broj imunoloških parametara pokazao je povezanost s kliničkim pokazateljima, premda našom studijom to nismo uspjeli potvrditi. Individualizirani protokol imunosupresije koja se temelji na imunološkom praćenju mogao bi se pokazati uspješnim. Multiparametarski program imunološkog praćenja koji bi se provodio često i doživotno, mogao bi biti prihvatljiv pristup da se predvidi disfunkcija presatka prije nego što se pojave klinički simptomi, iako

PHD nalaz inducirane biopsije ostaje zasad jedinim vjerodostojnim pokazateljem. Imunološko praćenje mora biti inicirano prije transplantacije i praćeno kontinuirano i učestalo posttransplantacijski. Uvođenje dodatnog biljega (Foxp3) koji se danas koristi za identifikaciju T regulacijskih stanica i razlikovanje od efektorskih CD4+ T limfocita vjerojatno bi doprinijelo boljoj diskriminaciji stanica unutar odjeljka aktiviranih T limfocita i boljem dijagnostičkom razlikovanju pacijenata s odbacivanjem presatka.

L I T E R A T U R A

1. Volker D, Opelz G. Clinical Relevance of Immune Monitoring in Solid Organ Transplantation. *Int Rev Immunol* 2009; 28: 155-84.
2. CTS Collaborative Transplant Study. Accessed 1 April, 2010 at <http://ctstransplant.org>.
3. Agrawal S, Singh AK, Sharma RK Immune mechanisms involved in solid organ transplantation. *Indian J Nephrol* 2002; 12: 92-102.
4. Denecke C, Habicht A, Chandraker A, Tullius SG. The impact of donor age and recipient age on clinical course and immune response after organ transplantation. *Transpl Rev* 2006; 20: 179-88.
5. Wieërs G, Gras J, Bourdeaux C, Quang Truong D, Latinne D, Reding R. Monitoring tolerance after human liver transplantation. *Transpl Immunol* 2007; 17: 83-93.
6. Hawksworth JS, Leiser D, Jindal RM, Falta E, Tadaki DELster, EA. New directions for induction immunosuppression strategy in solid organ transplantation. *Am J Surg* 2009; 197: 515-24.
7. Castellaneta A, Thomson AW, Nayyar N, de Vera M, Mazariegos GV. Monitoring the operationally tolerant liver allograft recipient. *Curr Opin Organ Transpl* 2010; 15: 28-34.
8. Velásquez-Lopera MM, Eaton VL, Lerret NM i sur. Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Transplant Immunol* 2008; 19: 127-35.
9. Dijke IE, Weimar W, Baan CC. Regulatory T cells after organ transplantation: Where does their action take place? *Hum Immunol* 2008; 69: 389-98.
10. Volker D, Naujokat C, Sadeghi M i sur. Observational support for an immunoregulatory role of CD3+CD4+CD25+IFN-gamma+ blood lymphocytes in kidney transplant recipients with good long-term graft outcome. *Transpl Int* 2008; 21:646-60.

11. Sindhi R, Magill A, Manavalan S, Yost M, Haluszczyk C, Zeevi A. Peripheral lymphocyte markers as surrogate measures of immunosuppression and post-transplant clinical states. *Clin Applied Immunol Rev* 2004; 4: 225-38.
12. Fildes JE, Yonan N, Leonard CT. Natural killer cells and lung transplantation, roles in rejection, infection, and tolerance. *Transplant Immunol* 2008; 19: 1-11.
13. Macedo C, Donnenberg A, Popescu I i sur. EBV-specific memory CD8+ T cell phenotype and function in stable solid organ transplant patients. *Transplant Immunol* 2005; 14: 109-16.
14. Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. The CD154-CD40 Costimulation Pathway in Organ Transplantation. *Transpl Rev* 2004; 18: 10-9.
15. Cueto-Manzano AM, Morales-Buenrostro LE, González-Espinoza L i sur. Markers of inflammation before and after renal transplantation. *Transplantation* 2005; 80: 47-51.
16. Mandy FF, Nicholson JKA, McDougal JS. Guidelines for Performing Single Platform Absolute CD4+ T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. www.guideline.gov/VIEWS/summary.asp. 2003
17. Brando B, Barnett D, Janossy G i sur. Cytofluorometric Methods for Assessing Absolute Numbers of Cell Subsets in Blood. *Cytometry* 2000; 42: 327-46.
18. Šiftar Z, Kardum Paro MM, Sokolić I, Nazor A, Flegar-Meštrić Z. External quality assesment in clinical cell analysis by flow cytometry. Why is it so important? *Coll Antropol* 2010; 34: 207-17.
19. Šiftar Z, Kardum Paro MM. Imunofenotipizacija stanica protočnom citometrijom. U: Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinskobiochemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
20. Šiftar Z. Immune profile in solid organ transplantation. *Biochemia Medica* 2009; 19 Suppl 1: 58.

S U M M A R Y

FLOW CYTOMETRY AND ACUTE RENAL REJECTION CONFIRMED BY HISTOPATHOLOGIC ANALYSIS

Z. ŠIFTAR¹, I. SOKOLIĆ¹, M. M. KARDUM PARO¹, A. NAZOR¹, M. KNOTEK^{2,4},
M. SABLJAR-MATOVINOVIĆ², Ž. VIDAS³ i Z. FLEGAR-MEŠTRIĆ^{1,5}

¹*Merkur University Hospital, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, ²Department of Internal Medicine, Division of Nephrology, ³Department of Urology, ⁴University of Zagreb, School of Medicine and ⁵Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia*

Transplantation of solid organs, tissues or hematopoietic cells is now standard in the treatment of patients with terminal stage disease in order to cure and improve the recipients' quality of life. The study included 54 patients having undergone single or multiple organ transplantation. All patients received a combination of immunosuppressant therapy consisting of corticosteroids, calcineurin inhibitor (cyclosporine; tacrolimus), anti-CD25 (daclizumab) and mycophenolate-mofetil. In 24 patients, acute rejection was stratified by histopathologic analysis of renal biopsy. Fifteen highly sensitized patients were administered anti-thymocyte globulin (ATG) therapy. Absolute count and percentage of B/T lymphocyte subsets, NK cells and CD25+ or CD69+ activated T cells were measured on a flow cytometer (EPICS XL, Coulter) using single platform standardized protocol. Upon ATG therapy, rapid decline to a very low level of T and NK cell lymphocyte count was observed, as well of B lymphocytes, resulting in redistribution of lymphocyte compartment. Between consecutive measurements, kinetic changes of lymphocyte subset numbers (absolute count or percentage) did not differ in a large spectrum of immune parameters between the groups with and without rejection episode and having received quadruple immunosuppressive induction and maintenance therapy. Immunologic monitoring must be initiated prior to transplantation and continued consistently and frequently post-transplantation. Such a program is expensive and time-consuming and stressful for the patient, therefore, prospective studies should identify whether treatment decisions can be based reliably on these immune parameters. Serial measurement of immune cell counts is necessary for maintenance of ATG therapy and could be useful for monitoring patient recovery

Key words: transplantation, allograft, flow cytometry, immunosuppression, immune monitoring, rejection

PUNKTAT LIMFNOG ČVORA KAO ANALITIČKI UZORAK ZA FENOTIPIZACIJU STANICA

VIKTORIJA ŠVENCIBIR¹, VERONIKA ANIĆ¹, ZORAN ŠIFTAR², MIRJANA MARIANA KARDUM
PARO², SLOBODANKA OSTOJIĆ KOLONIĆ^{3,4}, INES KRIVAK BOLANČA¹ i IKA KARDUM-SKELIN^{1,4}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, ²Zavod za kliničku kemiju i
laboratorijsku medicinu, ³Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju i ⁴Sveučilište u Zagrebu,
Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Analiza stanica protočnim citometrom u suvremenom kliničko-laboratorijskom radu danas znači pomoć u postavljanju dijagnoze određivanjem klonalnosti B limfocita, te samim time odvajanju benignih od malignih limfoproliferativnih bolesti. Cilj ovog rada je bio ocijeniti vrijednost citološke dijagnoze i dostatnost materijala dobivenog citološkom punkcijom limfnog čvora za analizu metodom protočne citometrije u slučajevima benignih i primarno malignih poremećaja limfnih čvorova. Istodobno se određivalo klonalnost B limfocita u različitim skupinama malignih i benignih poremećaja limfnog čvora. Rezultati su pokazali da je citološka punkcija adekvatna metoda za dobivanje dovoljnog broja stanica za analizu protočnim citometrom, jer u našoj ispitivanoj skupini nije bilo neadekvatnih uzoraka. Citološka dijagnoza je u nekim slučajevima monomorfna populacija limfatičnih stanica limitirana prema malostaničnim limfomima. Tu je određivanje klonalnosti na protočnome citometru presudno u odvajanju malignih od benignih limfoproliferativnih bolesti. Zaključak je da je citološka punkcija uz pridruženu metodu protočne citometrije jednostavna i sigurna metoda u dijagnostici limfoproliferativnih bolesti.

Ključne riječi: citološka punkcija, limfni čvor, limfoproliferativne bolesti, protočna citometrija, klonalnost

Adresa za dopisivanje: Viktorija Švencbir
Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku
Zavoda za kliničku citologiju
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: vsvencbir@yahoo.com

UVOD

Limfni čvorovi su strukture okruglog, ovalnog ili bubrežastog oblika obavijene kapsulom, smještene većinom uzduž velikih krvnih žila. U organizmu ih ima oko 500 – 600, a dimenzije su od 1 mm do 1-2 cm u promjeru (1). Limfni čvor je građen od kore i srži. U kori nalazimo folikle koji su građeni isključivo od limfocita B, a stanice u parakortikalnoj regiji čine T limfociti. Dijelove folikla u kojima dolazi do aktivacije i proliferacije B limfocita na podražaj antigena nazivamo germinalnim ili zametnim centrom (2). Limfadenopatija je naziv za povećanje

limfnog čvora koje nastaje umnožavanjem stanica. Ako je povećan jedan limfni čvor ili skupina susjednih čvorova, kažemo da je limfadenopatija lokalizirana, za razliku od generalizirane limfadenopatije kada su povećane skupine limfnih čvorova koje nisu susjedne (3). Povećani limfni čvorovi mogu nastati kao posljedica infekcija (bakterijama, virusima, protozoama, riketijama ili gljivicama); imunoloških poremećaja ili zbog proliferacije i/ili infiltracije malignim stanicama. Benigna limfadenopatija koja se klinički očituje većinom prolaznim povećanjem limfnog čvora, uzrokovana je proliferacijom limfocita i/ili makrofaga ponajviše

zbog antigene stimulacije. Povećanje limfnog čvora benigne prirode može nastati i zbog infiltracije upalnim stanicama tijekom infekcije limfnih čvorova ili zbog infiltracije limfnih čvorova makrofazima krcatim lipidnim metabolitima (1). Protočna citometrija (engl. *Flow Cytometry* - FCM) je suvremena analitička metoda koja omogućuje kvantitativnu analizu stanica, odnosno izdvajanje homogene populacije stanica od interesa na temelju jednog od parametara stanice iz heterogene populacije stanica uz istodobno mjerenje različitih fizičkih i bioloških značajki svake stanice (broj, veličina i zrnatost) u suspenzijskoj otopini tijekom njenog prolaska kivetom protočnog citometra (4). Imunofenotipizacija je pojam koji označava uporabu specifičnih monoklonskih antijela pri određivanju staničnih antigena. Stanične antigene (leukocitne diferencijacijske biljege ili CD-antigene) moguće je otkriti na površini stanica, na specifičnim staničnim strukturama ili unutar stanične citoplazme (5).

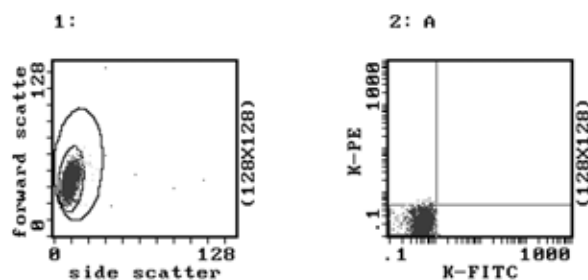
Cilj rada bio je ocijeniti vrijednost citološke dijagnoze i dostatnost materijala dobivenog citološkom punkcijom limfnog čvora za analizu metodom protočne citometrije u slučajevima benignih i primarnih malignih poremećaja limfnih čvorova.

ISPITANICI I METODE

Tijekom jedne godine izdvojeno je 239 uzoraka punktata limfnih čvorova bolesnika različitih dobnih skupina koji su zbog limfadenopatija došli u KB Merkur. Prema citološkim nalazima punktata izdvojeno je 114 uzoraka citološki dijagnosticiranih kao ne-Hodgkinovi limfomi B staničnog podrijetla (B-NHL), 67 kao monomorfna populacija limfatičnih stanica (MPLS), 53 uzoraka dijagnosticiranih kao benigne limfoproliferativne bolesti (BLPB) i ostatak analiziranih uzoraka (14) odnosio se na ne-Hodgkinove limfome ne-B staničnog podrijetla (Ne-B-NHL). Studija je provedena retrospektivno temeljena na medicinskoj dokumentaciji, citološkim razmazima punktata limfnih čvorova i rezultatima imunofenotipizacije na protočnom citometru. Prikadnost citološkog punktata limfnog čvora određivana je nakon izolacije stanica na gradijentu gustoće prije obilježavanja monoklonskim protutijelima (6).

Iz punktata limfnog čvora dobivenog punkcijom izolirani su limfociti nadslojavanjem nad gradijentom gustoće. Suspenzija mononuklearnih stanica citološkog punktata obilježena je odgovarajućom kombinacijom negativne kontrole i monoklonskih protutijela. Razaranje eritrocita i stabiliziranje suspenzije mononuklearnih stanica učinjeno je otopinama Q-PREP, te su analizirane na protočnom citometru unutar 30 minuta od liziranja.

Na mjernom instrumentu mjereni su i zabilježeni sljedeći imunofenotipizacijski pokazatelji: broj analiziranih stanica u prozoru veličine normalnih i manjih limfocita (LY), te stanica veličine većih limfocita i/ili stanica karakteristika ostalih mononukleara (VL/MN), jačina ekspresije κ/λ površinskih lakih lanaca imunoglobulina na B limfocitima ($\kappa+CD19+$; $\lambda+CD19+$), jačina ekspresije staničnih površinskih antigena (CD3, CD5, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD38, CD45), te jačina ekspresije dvostruko pozitivnih populacija (6). Klonalnim su se smatrali uzorci kod kojih je odnos κ i λ bio veći od 6:1 u korist κ ili 2:1 u korist λ u bilo kojem od analiziranih odjeljaka. Ekspresijom staničnih površinskih biljega specifične stanične populacije prikazane s dvoparametrijskim histogramima ekspresija podijeljenih u kvadrante (1-4), određen je relativan postotak (%) pozitivnih stanica unutar svakog kvadranta u odnosu na negativnu kontrolu i uz arbitriranu granicu od 30% kao iz literature poznatu granicu razdvajanja antigen-pozitivnih i antigen-negativnih stanica (6,7)(sl.a 1).

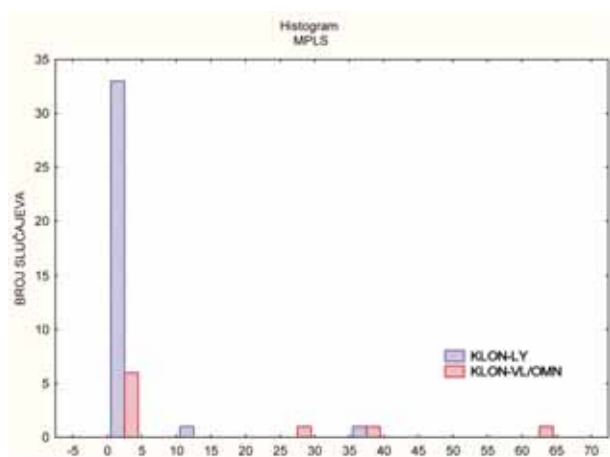


Sl. 1. Negativna kontrola fluorescencije na specifičnoj staničnoj populaciji: 1) elektronska ograda oko specifične stanične populacije (populacija stanica veličine limfocita-A; i populacija većih limfocita i/ili stanica karakteristika ostataka mononukleara-B) i 2) kontrola nivoa autofluorescencije, nespecifičnog vezivanja i fluorescencija na specifičnoj staničnoj populaciji (populacija stanica veličine limfocita-A; i populacija većih limfocita i/ili stanica karakteristika ostataka mononukleara-B) pomoću izotipske negativne kontrole fluorescencije

REZULTATI

Prema citološkim dijagnozama najviše je uzoraka bilo u skupini ne-Hodgkinovih B limfoma - 55%, benigne limfoproliferativne bolesti (BLPB) činile su 22%, a monomorfne populacije limfatičnih stanica (MPLS) 16%. Skupina Hodgkinovih limfoma ne-B staničnog podrijetla bila je zastupljena u svega 7% od 239 ispitivanih pacijenata.

Analizirajući uzorke u 85% je bilo dovoljno stanica za analizu, u 12% ih je bilo dostatno samo za određivanje klonalnosti, a u 3% bilo je nedovoljno stanica za bilo kakvu analizu te su ti uzorci bili isključeni iz istraživanja (sl. 2).

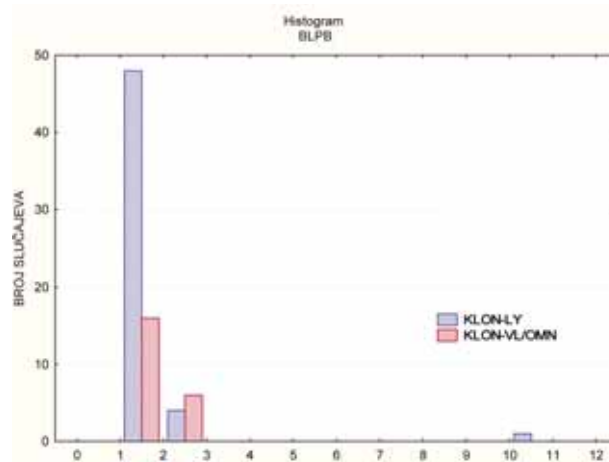


Sl. 2. Distribucija prema dostatnosti stanica u uzorcima punktata limfnog čvora

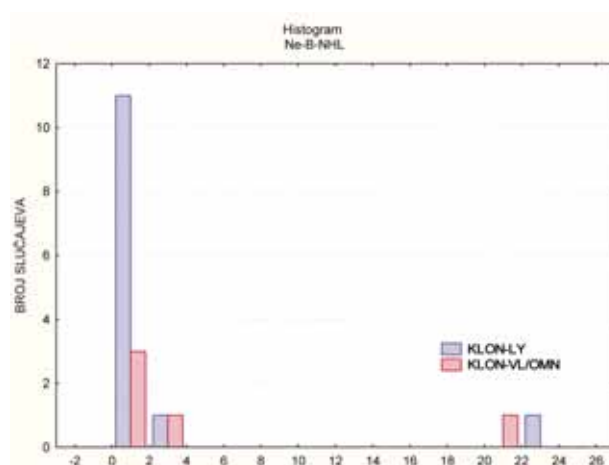
S obzirom na osobine limfatičnih stanica, analiza se obavljala u odjeljku veličine normalnih i manjih limfocita te većih limfocita i/ili stanica karakteristika ostalih mononuklearnih stanica. Od stanica nađenih u uzorcima najveći postotak malih limfocita nađen je u skupinama BLPB i MPLS, većih limfocita najviše u skupini B-NHL-a, a podjednako u ostalim skupinama. Velikih stanica karakteristika ostalih mononukleara najviše je bilo u skupini ne-B-NHL-a, a najmanje u BLPB i MPLS. U skupini B-NHL od 128 uzoraka klonalnost je nađena u 114, dok u 18 uzoraka nije nađena klonalnost niti u jednom od odjeljaka. Analizirajući te uzorke uglavnom se radilo o DLBCL bogatom T-limfocitima s manjim postotkom velikih limfatičnih stanica. Svi slučajevi su histološki verifikirani i potvrđeni kao

B-NHL-i (sl. 3). U skupini dijagnosticiranih kao monomorfne populacije limfatičnih stanica od 67 uzoraka klonalnost je nađena u 5 uzoraka. U dva je uzorka rađena analiza u odjeljku normalnih i manjih limfocita, a u tri u odjeljku većih limfocita i/ili ostataka mononukleara (sl. 4). Od 53 dijagnosticiranih kao benigne limfoproliferativne bolesti uzorci su pokazivali poliklonalnu populaciju limfatičnih stanica u svim odjeljcima, a samo u jednom slučaju nađena je klonalna populacija u odjeljku malih limfocita (sl. 5).

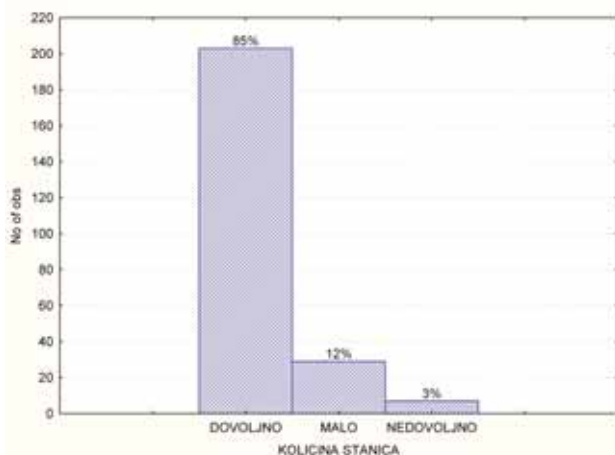
Samo 14 uzoraka ne-B-NHL-a analizirano je metodom protočne citometrije, u dva je uzorka nađena klonalna populacija: jednom u odjeljku manjih limfocita i jednom u odjeljku većih limfocita i/ili stanica ostataka mononukleara (sl. 6).



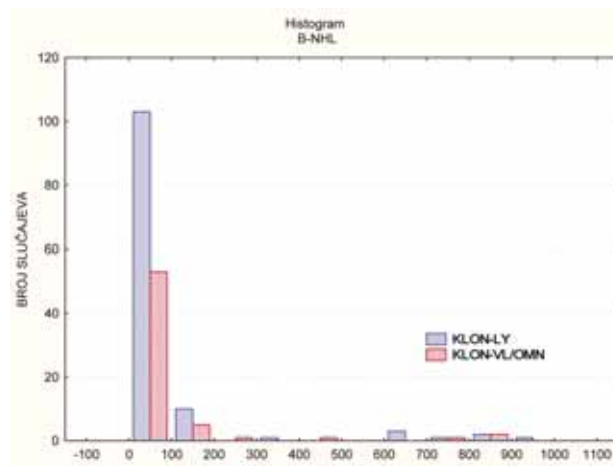
Sl. 3. Klonalnost limfatičnih stanica u bolesnika s B-NHL-om u različitim odjeljcima (LY i VL/OMN)



Sl. 4. Klonalnost limfatičnih stanica u bolesnika s MPLS u različitim odjeljcima (LY i VL/OMN)



Sl. 5. Klonalnost limfatičnih stanica u bolesnika s BLPB u različitim odjeljcima (LY i VL/OMN)



Sl. 6. Klonalnost limfatičnih stanica u bolesnika s ne-B-NHL-om u različitim odjeljcima (LY i VL/OMN)

Tablica 1.

Statistički značajne razlike između B-NHL i ne-B-NHL dobivenih protočnom citometrijom

VARIJABLE	RAZINA STATISTIČKE ZNAČAJNOSTI	B-NHL	Ne-B-NHL
	p	X±SD	X±SD
% ML # % ML	0,000042	78,30 ± 20,14	88,97 ± 7,25
% MN # %MN	0,003337	21,64 ± 18,03	5,33 ± 4,27
% CD2 ML # CD2 ML	0,000000	29,92 ± 25,25	62,14 ± 20,65
%CD2 MN # CD2 MN	0,205230	11,20 ± 13,32	25,20 ± 35,60
% CD3 ML # CD3 ML	0,000010	34,74 ± 25,60	57,97 ± 18,66
% CD19 ML # CD19 ML	0,000000	65,31 ± 25,34	36,81 ± 19,07
% CD19 MN # CD19 MN	0,038432	73,74 ± 26,20	45,04 ± 43,23
% KAPPA+CD19 ML # KAPPA+CD19 ML	0,000003	42,49 ± 33,73	21,77 ± 13,41
% KAPPA+CD19 MN # KAPPA+CD19 MN	0,938166	46,21 ± 37,59	16,04 ± 29,84
KLON ML # KLON ML	0,004094	73,88 ± 179,85	3,29 ± 5,98
KLON MN # KLON MN	0,505318	121,00 ± 245,71	51,16 ± 100,67
% CD20 ML # CD20 ML	0,033274	66,74 ± 23,56	49,78 ± 26,68
% CD20 MN # CD20 MN	0,337788	77,95 ± 24,72	61,70 ± 52,93
% CD10 ML # CD10 ML	0,033119	25,77 ± 31,57	3,99 ± 9,26
% CD10 MN # CD10 MN	0,344851	34,72 ± 39,70	58,57 ± 49,62

Legenda: p- razina statističke značajnosti; B-NHL-ne-Hodgkinovi limfomi B podrijetla; ne-B-NHL-ne-Hodgkinovi limfomi ne B podrijetla; ML-limfociti; VL-velike limfatične stanice; MN-ostatak mononukleara; CD23-stanični površinski biljeg B-limfocita; kappa-laki lanac imunoglobulina; KLON- omjer lakih lanaca imunoglobulina kappa i lambda (klonalnost limfatičnih stanica)

Statistička analiza ispitivanih pokazatelja između različitih citoloških skupina pokazala je da je postotak malih limfocita značajno veći u skupini BLPB i MPLS, najviše većih limfatičnih stanica ima u B-NHL-u, a stanica karakteristika ostalih mononukleara najviše u skupini Ne-B-NHL-a. Između BLPB i MPLS pokazalo je da nema značajnije razlike niti u jednom ispitivanom pokazatelju. Skupina B-NHL ima statistički veći izražaj biljega CD19,

CD20, CD10, koekspresiju biljega CD19 i lakog lanca kappa, izrazito veći omjer lakih lanaca kappa i lambda (klonalnost), a logično tome manji postotak biljega T loze (CD2 i CD3) (tablica 1). Koekspresija biljega CD19 i lakih lanaca tipa kappa kao i izražaj CD23 biljega, te biljega T loze (CD2 i CD3) jače su izraženi u BLPB nego u MPLS, ali to nije statistički značajno (tablica 2).

Tablica 2.

Statistički značajne razlike pokazatelja između BLPB i MPLS dobivenih protočnom citometrijom

VARIJABLE	RAZINA STATISTIČKE ZNAČAJNOSTI	BLPB	MPLS
	P	X±SD	X±SD
% ML # % ML	0,840762	88,66 ± 9,60	88,97 ± 7,25
% VL # % VL	0,566066	7,33 ± 2,17	8,00 ± 2,50
% MN # %MN	0,626524	6,17 ± 3,99	5,33 ± 4,27
% CD2 ML # CD2 ML	0,668036	64,43 ± 19,56	62,14 ± 20,65
% CD2 VL # CD2 VL	0,904625	31,15 ± 15,21	32,05 ± 14,27
% CD2 MN # CD2 MN	0,911889	22,48 ± 3,98	22,17 ± 3,93
% CD3 ML # CD3 ML	0,634144	55,80 ± 18,18	57,97 ± 18,66
% CD3 VL # CD3 VL	0,000000	0,00 ± 0,00	58,55 ± 18,07
% CD3 MN # CD3 MN	0,970233	18,19 ± 9,16	18,02 ± 9,48
% CD19 ML # CD19 ML	0,945819	37,04 ± 17,48	36,81 ± 19,07
% CD19 VL # CD19 VL	0,697160	62,64 ± 23,66	58,55 ± 18,07
% CD19 MN # CD19 MN	0,818013	42,82 ± 22,88	40,85 ± 20,19
% KAPPA+CD19 ML # KAPPA+CD19 ML	0,870178	22,15 ± 11,86	21,77 ± 13,41
% KAPPA+CD19 VL # KAPPA+CD19 VL	0,768549	39,69 ± 15,78	37,23 ± 18,12
% KAPPA+CD19 MN # KAPPA+CD19 MN	0,612877	24,09 ± 13,97	27,41 ± 18,66
% LAMBDA+CD19 ML # LAMBDA+CD19 ML	0,820063	14,17 ± 6,60	14,58 ± 11,60
% LAMBDA+CD19 VL # LAMBDA+CD19 VL	0,179738	24,21 ± 8,81	17,91 ± 9,64
% LAMBDA+CD19 MN # LAMBDA+CD19 MN	0,405520	13,42 ± 6,97	11,01 ± 7,51
KLON ML # KLON ML	0,178276	1,68 ± 1,29	9,08 ± 39,7355
KLON VL # KLON VL	0,300831	1,66 ± 0,42	4,70 ± 8,53
KLON MN # KLON MN	0,173643	1,79 ± 0,46	8,89 ± 18,53
% CD20 ML # CD20 ML	0,522826	42,36 ± 19,85	49,78 ± 26,68
% CD5 ML # CD5 ML	0,584463	62,85 ± 23,25	57,09 ± 24,07
% CD5 VL # CD5 VL	0,676019	28,27 ± 26,54	19,00 ± 12,30
% CD23 ML # CD23 ML	0,270760	29,60 ± 22,48	19,26 ± 12,53
% CD38 ML # CD38 ML	0,948998	33,75 ± 22,96	34,43 ± 23,90
% CD10 ML # CD10 ML	0,866270	4,73 ± 9,67	3,99 ± 9,26
% CD10 VL # CD10 VL	0,666667	38,75 ± 52,53	75,90 ± 0,00
% CD45 ML # CD45 ML	0,384050	98,80 ± 1,62	97,28 ± 12,32
% CD45 VL # CD45 VL	0,774495	97,11 ± 5,99	96,34 ± 6,65
% CD45 MN # CD45 MN	0,764828	90,49 ± 15,33	96,65 ± 5,06

Legenda: p- razina statističke značajnosti; B-NHL-ne-Hodgkinovi limfomi B podrijetla; ne-B-NHL-ne-Hodgkinovi limfomi ne-B podrijetla; ML-limfociti; VL-velike limfatične stanice; MN-ostatak mononukleara; CD23-stanični površinski biljeg B-limfocita; kappa-laki lanac imunoglobulina; KLON- omjer lakih lanaca imunoglobulina kappa i lambda (klonalnost limfatičnih stanica)

RASPRAVA

Analiza stanica protočnom citometrijom u suvremenom kliničko-laboratorijskom radu danas znači pomoć u postavljanju dijagnoze određivanjem klonalnosti B-limfocita, te samim time odvajanje benignih od malignih limfoproliferativnih bolesti (8-10). Ako je uzorak adekvatan, sama citološka dijagnostika limfoproliferativnih bolesti je jednostavna i sigurna metoda (11,12). Najčešće dodatne tehnike ranih citomorfoloških istraživanja bile su standardne imunocitokemijske metode na citološkim razmazima. Ako se citološkom punkcijom dobije dovoljno stanica za analizu protočne citometrije, ove dvije dijagnostičke metode korištene zajedno postižu dijagnostičku točnost i sigurnost koja iznosi preko 90% (13-15). U literaturi su opisani prihvatljivi analitički uzorci u kojima je broj stanica bio manji ili jednak $1,1 \times 10^9/L$ (16,17). U radu Kardum Paro (6) utvrđena je granica linearnosti metode protočne citometrije ($0,35 \times 10^9/L$) i smatrana je granicom pouzdanosti analitičkih rezultata ostvarenih ovom metodom. Prema tome, neprihvatljivi uzorci smatrani su citološki punktati ispod donje granice linearnosti metode ($0,24 \times 10^9/L$), a minimalno analiziranih 5000 stanica bio je broj dostatan za pouzdanost rezultata analize metodom protočne citometrije (18-20). Naši rezultati se podudaraju s gore navedenim i pokazuju da je citološka punkcija adekvatna metoda za dobivanje dovoljnog broja stanica za analizu protočnim citometrom. Isti autor (6) uvodi parametar unutar skupine s pozitivnom klonalnošću lakih lanaca imunoglobulina, KVANTUM, uveden prema jačem kriteriju određivanja klonalnosti limfocita B ($\kappa > 5,5 \lambda$; $\lambda > 1,4 \kappa$). On služi kao mjera infiltracije limfnog čvora klonalnim limfocitima B pa se mogu razlikovati maligne od benignih limfadenopatija nepoznatog uzroka. Manja infiltracija limfnog čvora klonalnim limfocitima B (kvantum $< 16,5$) je u korelaciji sa citomorfološkom dijagnozom benigne limfadenopatije nepoznatog uzroka. U ovom je radu analizirajući s obzirom na postotak limfatičnih stanica pokazano da BLPB i MPLS imaju najviše manjih limfatičnih stanica te se diferencijalno dijagnostički mora misliti i na malostanične limfome, pa je važno odrediti klonalnost stanica. B-NHL-i imaju najviše većih limfatičnih stanica, a limfomi koji nisu B-staničnog podrijetla imaju najviše stanica karakteristika ostalih mononukleara. Klonalnost

B-limfocita u pravilu je karakteristika B-malignih limfoproliferativnih bolesti.

Citološka punkcija limfnih čvorova je minimalno invazivna metoda, a dostupni su joj svi povećani limfni čvorovi. Pravilno razlikovanje reaktivnih hiperplazija i malignih limfoma uz citološku analizu limfnog čvora povećava i određivanje B i T diferencijacijskih biljega te klonalnosti limfatičnih stanica iz punktata limfnog čvora na protočnom citometru. Tada dijagnostička točnost iznosi i preko 90% (21,15). Citološkom se punkcijom limfnih čvorova dobije dovoljno stanica za analizu protočnim citometrom u svrhu određivanja klonalnosti i/ili diferencijacijskog statusa limfatičnih stanica. Adekvatnost je podjednaka bez obzira radi li se o benignim ili malignim limfoproliferativnim bolestima što ukazuje da dijagnoza ne uvjetuje kvalitetu materijala. Citološka dijagnoza je u nekim slučajevima monomorfne populacije limfatičnih stanica limitirana prema malostaničnim limfomima, kao i u slučajevima folikularnih limfoma prema floridnim folikularnim hiperplazijama te je određivanje klonalnosti na protočnome citometru presudno u odvajanju malignih od benignih limfoproliferativnih bolesti.

L I T E R A T U R A

1. Jakšić B, Labar B, Grgičević D. Hematologija i transfuziologija. Zagreb: Medicinska naklada, 1989.
2. Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada, 1998.
3. Damjanov I, Jukić S, Nola M: Patologija, drugo izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2008.
4. Kardum Paro MM. Utjecaj predanalitičkih čimbenika na fenotip stanica u B kroničnoj limfocitnoj leukemiji. Magistarski rad. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2003.
5. Topić E, Dragan D, Janković S. Medicinskobio-kemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada, 2004.
6. Kardum Paro MM. Metoda protočne citometrije u dijagnostici limfadenopatija. Doktorski rad. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2006.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Clinical applications of Flow cytometry: Quality

Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline. NCCLSoad, Suite 1400, Wayne, PA 19087 USA, 1998.

8. Davis BD, Foucar K, Szczarkowski W i sur. U.S.-Canadian Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematologic Neoplasia by Flow cytometry: Medical Indications. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1997; 30: 249-63.

9. Forehead N, Lens D, Zonas A, Merely R, Matutes E, Catovsky D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukemic B-cell precursor. *Br J Haematol* 1995; 91: 640-6.

10. Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 68: 1-31.

11. Pinkus GS. Needle biopsy in malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2415-16.

12. Das DK. Value and limitations of fine-needle aspiration cytology in diagnosis and classification of lymphomas: A review. *Diagn Cytopathol* 1999; 21: 240-9.

13. Liu K, Mann KP, Vitellas KM, Paulson EK, Nelson RC, Gockerman Dodd LG. Fine-needle aspiration with flow cytometric immunophenotyping for primary diagnosis of intra-abdominal lymphomas. *Diagn Cytopathol* 1999; 21: 98-104.

14. Nicol TL, Silberman M, Rosenthal DL, Borowitz MJ. The accuracy of combined cytopathologic and flow cytometric analysis of fine-needle aspirates of lymph nodes. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 18-28.

15. Kocjan G. Best practice No.185. Cytological and molecular diagnosis of lymphoma. *J Clin Pathol* 2005; 58: 561-7.

16. Finn LS, Hall J, Xu M, Rutledge JC. Flow cytometric validation of automated differentials in pediatric patients. *Lab Hematol* 2004; 10: 112-8.

17. Bodensteiner DC. A flow cytometric technique to accurately measure post-filtration white blood cell counts. *Transfusion* 1989; 29: 651-3.

18. Meylan PRA, Burgisser P, Weyrich-Suter C, Sperini F. Viral load and immunophenotype of cells obtained from lymph nodes by fine needle aspiration as compared with peripheral blood cells in HIV- infected patients. *J Acq Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology* 1996; 13: 39-47.

19. Neiburger JB, Neiburger RG, Richardson ST, Grosfeld JL, Baehner RL. Distribution of T and B lymphocytes in lymphoid tissue of infants and children. *Infect Immun* 1976; 14: 118-21.

20. Mackay CR, Kimpton WG, Brandon MR, Cahill RNP. Lymphocyte subsets show marked differences in their distribution between blood and the afferent and efferent lymph of peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1988; 167: 1755-65.

21. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene Rearrangement in B- and T- lymphoproliferative disease detected by the Polymerase Chain Reaction. *Blood* 1992; 78: 192-6.

S U M M A R Y

FINE NEEDLE ASPIRATE OF LYMPH NODE AS THE ANALYTICAL SAMPLE FOR IMMUNOPHENOTYPING

V. ŠVENCIR¹, V. ANIĆ¹, Z. ŠIFTAR², M. M. KARDUM PARO²,
S. OSTOJIĆ KOLONIĆ^{3,4}, I. KRIVAK BOLANČA¹ and I. KARDUM-SKELIN^{1,4}

¹*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics, ²Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, ³Department of Internal Medicine, Division of Hematology and ⁴University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Hrvatska*

In modern clinical laboratory routine, cell analysis by flow cytometry means help in setting up the diagnosis by determination of B-lymphocyte clonality and thus separation of benign and malignant lymphoproliferative diseases. The aim of this study was to assess the value of cytologic diagnosis and adequacy of the material obtained by fine needle aspiration (FNA) of lymph nodes for flow cytometry analysis in cases of benign lesions and primary malignant lesions of lymph nodes. In addition, the aim was to determine B-lymphocyte clonality in different groups of benign and malignant lymph node lesions. The study was based on medical documentation, cytologic smears of FNA lymph node samples and results of flow cytometry immunophenotyping. A total of 239 patients were included over a one-year period. Patients were classified according to cytologic findings in the groups of non-Hodgkin's lymphoma of B cell origin (55%), benign lymphoproliferative disease (22%), undefined group of monomorphic

population of lymphatic cells (16%), and the rest in the group of non-Hodgkin's non B cell origin. Study results showed FNA to be an appropriate method for obtaining sufficient numbers of cells for analysis by flow cytometry because there was no inadequate samples in our study group. In some cases of monomorphic lymphoid cell population, cytologic diagnosis was limited to small cell lymphomas, so determining the clonality by flow cytometry is crucial in separating malignant from benign lymphoproliferative disease. It is concluded that FNA associated with the flow cytometry method is a simple and safe method in the diagnosis of lymphoproliferative disease.

Key words: fine needle aspiration, lymph node, lymphoproliferative disease, flow cytometry, immunophenotyping

SJEĆANJA NA RAZVOJ KLINIČKE CITOLOGIJE U KLINIČKOJ BOLNICI MERKUR

INGA ČREPINKO

Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, Zagreb, Hrvatska

Moja sjećanja na razvoj kliničke citologije (KC) u KB Merkur obuhvaćaju 30-godišnje razdoblje (od 1955. do 1985. godine) i smjenu dviju generacija. Početak je uvijek uzbudljiv, prožet mladenačkim entuzijazmom, a uspomene gotovo nostalgичne. Tako je i meni bilo u Medicinsko-biokemijskom „Ruždičevom“ laboratoriju. Osnivači KC u KB Merkur bili su: kliničari Erik Hauptmann (hematolog), Zdenko Škrabalo (endokrinolog), Zvonimir Singer (ginekolog, citogenetičar), a mnogo je pridonio Ibrahim Ruždić (biokemičar). Kao prvi voditelj citološkog laboratorija Interne klinike shvatila sam zašto se je klinička citologija u KB Merkur tako uspješno razvila: uz osnovnu rutinsku citodijagnostiku uvodile su se nove tehnologije u dogovoru s kliničarima. Najveće težište postavljeno je na edukaciju kadrova (poslijediplomski studij iz KC od 1967; samostalna specijalizacija citologa od 1974; edukacija citotehnologa od 1968.). U našim su citološkim laboratorijima obranjeni brojni magistarski radovi i disertacije. Nastojanjem E. Hauptmana osnovana je 1970. Sekcija za citologiju (kasnije Hrvatsko društvo kliničkih citologa HLZ), a klinički citolozi KB Merkur pridonijeli su osnivanju Udruženja KC tadašnje Jugoslavije i 1979. organizirali prvi kongres. God. 1972. postali smo članovi EFCS-a, a Z. Singer i I. Črepinko članovi IAC-a. Želja mi je da se pomoću zapisanih sjećanja osnivanje i razvoj KC u KB Merkur ne zaboravi – jer svaka budućnost ima svoje podrijetlo!

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Inga Črepinko
Mesićeva 17
10 000 Zagreb, Hrvatska
Tel: 01 4680550
E-pošta: manjaprasek@gmail.com

UVOD

Klinička citologija danas je priznata grana i sastavni dio dijagnostičke medicine. U prvoj polovici 20. stoljeća začetnici kliničke citologije bili su liječnici – kliničari. Nagli razvoj tehnologije, ali i potreba postavljanja što točnije dijagnoze, naveli su u Europi liječnike – interniste (pretežno hematologe), a u Americi anatomske Papanicolaoua i ginekologa Trauta da se bave citodijagnostikom, tj. morfološkom metodom koja pod mikroskopom analizira stanice u standardno obojenom razmazu u svrhu otkrivanja tumora i drugih bolesti (1-9). U svjetskoj i domaćoj literaturi – često citiranoj u knjigama novijeg datuma – s velikim su entuzijazmom opisivani početci razvoja kliničke citologije. Čitajući predgovore i komentare divila sam se njihovoj ustrajnosti, marljivosti i ljubavi s kojom su opisivali i dokumentirali svoja prva zapažanja, požrtvovno sakupljajući preparate i fotografije. Međutim, oni često nisu imali ujednačena mišljenja pa su svoja zapa-

žanja morali podvrgnuti potvrdi s patohistološkim ili kojim drugim laboratorijskim nalazom (10-15). Uvidjeli su da je došlo vrijeme za sistematsku edukaciju iz citodijagnostike (16,17).

Još davno sam se opredijelila za dijagnostičku granu medicine, a za to su bila odgovorna dva doživljaja: za vrijeme studija – dok sam bila demonstrator, a kasnije pomoćni asistent na Zavodu za patološku anatomiju MEF-a u Zagrebu (od 1943. g. do 1947. g.) dojmila su me se predavanja i vježbe Beate Brausil iz interne propedeutike (pretežno morfologije u hematologiji), poglavito zbog njenog individualnog i konkretnog pristupa radu i razvoju kliničkih laboratorija. Nešto kasnije, kao asistent na kirurškoj klinici KB Zagreb (Rebro) za potrebe uvođenja dijagnostičkog laboratorija naišla sam na časopis *American Journal of Clinical Pathology* koji je već u drugom desetljeću 20. stoljeća počelo izdavati Američko društvo kliničkih patologa. Tamo sam otkrila da su klinički patolozi oni koji vode

dijagnostičke laboratorije polivalentnog tipa, uvijek smještene uz kliničko - bolničke ustanove. Klinički patolozi i njihovi suradnici u timskom radu najuže surađuju s kliničarima pojedinih područja (18-20). To su bili razlozi da sam i ja odmah nakon završetka studija medicine nastavila učiti, ali ujedno i poučavati druge o morfološkim karakteristikama stanica u hematologiji, a kasnije i drugim područjima.

Najveći dio radnog vijeka provela sam u bolnici u Zajčevoj ulici 19, pa će se zato moja sjećanja pretežno odnositi na to razdoblje.

Uprava društva Merkur tadašnjeg Sanatorija Merkur, povjerila je 1937. g. osnivanje „Laboratorija za mikrokemijsku analizu“ farmaceutu i biokemičaru prof. dr. Ibrahimu Ruždiću. On je taj laboratorij vodio do kraja svog radnog vijeka, do 1978. g. (21).

OSNIVANJE LABORATORIJSKO-HEMATOLOŠKOG ODSJEKA U MEDICINSKO BIOKEMIJSKOM LABORATORIJU PRI KB MERKUR

U proljeće 1954. g. na nagovor kirurga dr. Branka Oberhofera zaposlio me Ibrahim Ruždić u „svom“ laboratoriju iz više razloga: želio je osnovati centralni laboratorij polivalentnog tipa s biokemijskim, hematološkim, bakteriološkim, pa i drugim odsjecima. Osim toga želio je u laboratoriju provesti teorijsku i praktičnu nastavu za izobrazbu laboratorijskih tehničara i visoko kvalificiranih biokemičara. Ponajviše pak nastojao je uvesti bolju suradnju s liječnicima - kliničarima, teoretičarima i stručnjacima drugih dijagnostičko-laboratorijskih struka (17).

U laboratoriju sam započela sa sređivanjem odsjeka za hematološke pretrage u kojemu je godinama radila vrlo draga i obrazovana gospođa Etuška Franck, priučena laborantica. Ubrzo sam uvela prošireni program analize „krvna slika“, s time da sam tražila da se uvijek uz „crvenu krvnu sliku“ učini i krvni razmaz koji je morao biti pravilan i perfektno obojen. Pod monokularnim mikroskopom bro-

jili smo krvne stanice u Neubaerovoj komorici, a pravilno diferenciranje i opisivanje krvnih stanica u razmazima obojenim metodom May-Grünwald Giemsa smatrala sam svojim velikim uspjehom. Već tako jednostavnom analizom često smo mogli mnogo toga zaključiti, usmjeriti kliničare na dodatne dijagnostičke postupke, a koji puta i postaviti dijagnozu. Broj rutinskih hematoloških pretraga počeo se povećavati, a povećala se i njegova kvaliteta, što imam zahvaliti svojoj nezaboravnoj učiteljici prof. Beati Brausil.

U razdoblju od 1955. do 1964. g. uvedene su u hematološkom odsjeku laboratorija mnoge citokemijske pretrage od kojih su u svakodnevnu primjenu ušle: određivanje željeza, ugljikohidrata (PAS pozitivne supstancije) te aktivnost nekih enzima (alkalna i kisela fosfataza, peroksidaza, nespecifične esterase). Iz krvi smo započeli izolirati pojedine vrste krvnih stanica pa smo u tako nakupljenim leukocitima, biokemijski određivali aktivnost katalaze i peroksidaze. U tome je volonterski surađivala Ana Stavljenić, tada studentica Farmaceutskog fakulteta i laboratorijski tehničar Zvonko Starčević (22). Kretanje aktivnosti katalaze i peroksidaze kod mijeloidnih i limfatičnih leukemija obradila sam u svojoj disertaciji 1964. g. Već tada sam na bolničkim odjelima započela uz sternalnu punkciju raditi i citološku punkciju limfnih čvorova, organa i tumora, tj. aspiracijsku dijagnostiku.

OBLICI EDUKACIJE U MEDICINSKO BIOKEMIJSKOM LABORATORIJU PRI KB MERKUR

U raznim medicinskim laboratorijima postojala je općenito potreba za školovanim kadrom, pa je još ranije I. Ruždić povremeno organizirao tromjesečne i šestomjesečne tečajeve. Kasnije se njegov program dugotrajnije izobrazbe sastojao od niza teorijskih i općih te specijalnih kolegija s praktičkim vježbama i radom u bolničkim laboratorijima. Sklon timskom radu, I. Ruždić je uvijek izrađivao planove i programe u suradnji s liječnicima - kliničarima, bakteriolozima i teoretičarima, koji su u obrazovanju imali nazore sukladne njegovima (E).

Hauptmann, B. Richter, P. Tomašić i drugi) (21,23). Početkom 50-tih godina stupio je u kontakt s ravnateljem Škole za sanitarne tehničare Cvjetkom Tanodijem i osnovao u toj školi Srednju školu za tehničare laboratorijskog smjera. Tamo je on bio i prvi nastavnik kliničke kemije, a ja sam od 1958. g. vodila predmet „Laboratorijska hematologija s transfuziologijom“ te organizirala vježbe iz hematologije u školi i praktični rad na terenu (23). God. 1955/56. odlukom Savjeta za narodno zdravlje NRH organizirao je I. Ruždić u centralnom laboratoriju KB Merkur dvogodišnje doškolovanje za osobe sa završenom srednjom školom, kojima se nakon položenog diplomskog i stručnog ispita priznalo višu stručnu spremu, 1954. g. dobio je suglasnost da za završene farmaceute i ostale kandidate prirodnih struka organizira izobrazbu za voditelje medicinsko biokemijskih laboratorija.

To je bio temelj za osnivanje poslijediplomskog studija „Kliničko-laboratorijska dijagnostika“ pri Školi narodnog zdravlja „Andrija Štampar“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, kao i za specijalizaciju iz kliničke biokemije. U svim tim oblicima usavršavanja bio je E. Hauptmann predavač i nositelj kolegija iz hematologije, a mi ostali bili smo voditelji seminara i praktičnih vježbi. Bila sam oduševljena entuzijazmom kandidata za hematologiju i ostalu dijagnostiku. Polaznici spomenutih oblika usavršavanja obavljali su praktički dio nastave gotovo isključivo u centralnom laboratoriju bolnice. Nakon završene izobrazbe postali su odlični radnici, savjesni i vjerni svom pozivu. Ustrajno mikroskopirajući naučili su biti odgovorni za svaki segment u izvođenju pretrage. Tome je pridonijela organizacija rada i način života u centralnom laboratoriju, te poštivanje pojedinca i svakog radnog mjesta.

Farmaceuti sa završenim tečajem za kliničku biokemiju postali su voditelji laboratorija u svojim matičnim ustanovama, a neki od njih – ljubitelji morfoloških i hematoloških analiza - koji puta bi otkrili i pravi uzrok bolesti te tako uštedjeli bolesniku i ustanovi odlazak u udaljene centre. I. Ruždić je općenito svojim zalaganjem za laboratorijsku službu doista uvelike unaprijedio dijagnostičku medicinu jer je uvijek djelovao u timskom radu, što mu je vrlo dobro polazilo za rukom: bio je odličan organizator, komunikativan, a mogao je

strpljivo podnositi poteškoće koje su često odugovlačile ostvarenje njegovih namjera.

DOLAZAK ERIKA HAUPTMANN U KB MERKUR

Krajem 50-ih godina postepeno se odvijala smjena liječnika KB Merkura. Dolaskom E. Hauptmanna za predstojnika Klinike za unutarnje bolesti KB Merkur, a s njime i dva njegova suradnika internista (Svebora Čerleka i Zdenka Škrabala) došlo je do znatnih promjena. Jedna od njih bila je podjela Klinike u subspecialnosti: gastroenterologiju (prvi voditelj S. Čerlek), endokrinologiju - pretežno dijabetologiju (prvi voditelj Z. Škrabalo) i hematologiju (prvi voditelj E. Hauptmann), a kasnije i nefrologiju i kardiologiju. Hauptmann je uz svakodnevni rad uveo razne oblike trajnog stručnog usavršavanja kao npr. tjedne kliničko-patološke sastanke i nastavio usku suradnju s I. Ruždićem i njegovim suradnicama. O njegovom pedagoškom, nastavnom i organizacijskom radu te sklonosti za daljnji razvoj kliničke citologije nitko nije ljepše i sveobuhvatnije pisao od Hrvoja Harambašića čiji je članak izašao u AMC 2008. godine (24). Hauptmann je posebno nastojao razviti kliničku hematologiju, pa je intenzivirao citološku i citokemijsku dijagnostiku leukoza i malignih limfoma.

Već tada sam na nagovor E. Hauptmanna u Hematološkom odsjeku Biokemijskog laboratorija, u cilju suvremene klasifikacije hemoblastoza, uvela brojne ciktokemijske metode na razmazima punktata svih hematopoetskih organa. E. Hauptmann je sam citološki punktirao i limfne čvorove i slezenu te uz svoje mlađe suradnike istraživao morfološke karakteristike kod upalnih, degenerativnih stanja, hemoblastoza i metastaza karcinoma i upućivao svoje suradnike da prema oskudnim podacima iz tadašnje literature na vlastitom materijalu subklasificiraju pojedine oblike M. Hodgkin i non-Hodgkin limfoma. Time je aktivirao znanstveni rad koji je u tadašnjim prilikama bio realno dostupan. Tada su često dolazili liječnici iz drugih zdravstvenih ustanova na Internu kliniku i prisustvovali uz studente medicine i specijalizante njegovim nastavnim vizitama. Nakon takvih vizita pošao bi s "gostima" (koji su mahom bili iz Zagreba, Šibenika, Dubrov-

nika, Ljubljane, Sarajeva, Novog Sada, itd.) u Biokemijski laboratorij I. Ruždiću i meni da upoznaju rad u hematološkom ili kojem drugom odsjeku laboratorija. I danas se rado sjećam burnih diskusija s kolegama uz mikroskop koje su trajale do u kasne noćne sate. E. Hauptmann često je odlazio na kongrese u inozemstvo te je sa svojim suradnicima sudjelovao u pripremama osnivanja Europskog društva kliničkih citologa (EFCS) te bio aktivan član i suorganizator internacionalnog društva za kemo- i imunoterapiju (IGCI) sa sjedištem u Beču (25).

Još za vrijeme boravka na Rebru, E. Hauptmann je otkrio da se u punktatima čvorova na vratu mogu otkriti i stanice karakteristične za tkivo štitnjače, pa je predložio svom mlađem suradniku internisti i hematologu - citologu Z. Grgiću da zajedno nastave analizirati punktate štitnjače (26). Prelaskom u KB Merkur savjetovao je Z. Škrabalu da zajedno sa mnom nastavi razvijati citologiju štitnjače i utvrditi njenu dijagnostičku vrijednost. Na tom projektu radili smo dugo i uporno, a rezultate zajednički objavljivali u časopisima i knjigama (27-29). Škrabalo se vrlo rano, u sklopu endokrinologije, opredijelio za organizaciju ranog otkrivanja i načina liječenja šećerne bolesti, pa sam na njegov nagovor uvela citokemijsko određivanje ugljikohdrata u limfocitima bolesnika sa šećernom bolesti (28).

Osim toga bio je i inicijator citološkog proučavanja muških gonada, kako u ejakulatu, tako i u citološkom punktatu kod oligo i azospermija (28,29). Sjećam se kako smo prof. Jasminka Posinovec (iz Zavoda za histologiju i embriologiju MF-a u Zagrebu) i ja s velikim zanimanjem mjesecima zajedno analizirale i uočavale razlike u morfološkom izgledu stanica spermatogeneze ako se preparati obrađuju različitim tehnikama (histološkom odnosno citološkom) (28).

Svebor Čerlek je kao gastroenterolog - kliničar najviše surađivao s biokemičarima: I Ruždićem i njegovom suradnicom Doroteom Juričić (timski rad na terenu). Aspiracijsku biopsiju jetre i njezinu dijagnostičku vrijednost proučavao je s citologinjom, kasnije citopatologinjom Marom Dominis. Ona je u KB Merkur razvila i eksfolijativnu citologiju u gastroenterologiji (30,31).

RAZVOJ CITOLOŠKIH LABORATORIJA NA INTERNOJ KLINICI, GINEKOLOŠKOM ODJELU KB MERKUR I ZAVODU ZA DIJABETES, ENDOKRINOLOGIJU I BOLESTI METABOLIZMA VUK VRHOVAC

Razvoj citološkog laboratorija u Internoj klinici KB Merkur

Budući da su se u dijagnostičkim postupcima sve više počele koristiti citološke pretrage, E. Hauptmann je 1964. godine u Internoj klinici osnovao Laboratorij za hematologiju i citologiju. Tada sam iz Zavoda za medicinsku-biokemiju prešla na Internu kliniku i postala prvi voditelj tog laboratorija te nastavila razvijati morfološku dijagnostiku u hematologiji i ostalu aspiracijsku neginekološku citodijagnostiku. Predamnom su bile godine napornog rada tim više što je moje uvjerenje bilo da kompletan stručnjak može biti samo onaj koji u rutinskom radu stekne obilno iskustva, koji se bavi realno mogućim znanstvenim radom, koji se stalno usavršava i sudjeluje u edukaciji, a aktivan je u društvenom radu svoje struke. Veliki su to zahtjevi koje sam strpljivo s manje ili više uspjeha postepeno ispunjavala do 1982. g.

U početku imala sam samo jednu laboratorijsku tehničarku Branku Broessler, a kasnije su zaposlene još dvije: Mira Mravak i Biserka Štefok-Križaj (obje su kasnije završile dokvalifikaciju za citotehničare) (23). Budući da je u laboratoriju svakodnevna rutina postala sve veća bila sam zadovoljna da je 1965. godine stigla i prva učenica dr. Vida Jakaša. Radeći uz nas mnogo nam je pomogla, a sama je imala priliku naučiti osnove kliničke citologije te organizaciju citološkog laboratorija. Godine 1968. godine završila je prvi postdiplomski studij iz medicinske citologije, a 1973. godine specijalizaciju iz patološke anatomije. Još 1969. godine postala je voditeljica citološkog, a kasnije i patohistološkog laboratorija u Institutu za tumore u Zagrebu. Godinama je sudjelovala u edukaciji kadrova iz kliničke citologije posebno dojke i centralnog živčanog sustava (32).

Druga liječnica u tada novom citološkom laboratoriju Interne klinike bila je dr. Mara Dominis. Još za vrijeme stažiranja i kasnije sve do 1970. godine, kada je započela specijalizaciju patološke anatomije, bila je uporna i marljiva učenica i moja mlada

suradnica. Najviše se zalagala za timski rad s kliničarima - posebno iz gastroenterologije i stručnjacima iz bazičnih struka medicine (31). Veliki je interes pokazivala za citologiju i citokemiju hematopoetskih organa, posebno limfnih čvorova. Po svojoj osnovnoj izobrazbi kao citolog specijalizirala je patološku anatomiju i 1974. godine postala voditeljica Odjela za patologiju u Kliničkoj bolnici KB Merkur. Bila je sljedbenik suvremenih stavova, pa je djelovala i kao patološki anatom i kao citopatolog u edukaciji svih profila kadrova za usavršavanje iz kliničke citologije.

U Laboratoriju za citologiju na Internoj klinici svaki je pojedinac svoj dio poslova radio strpljivo i odgovorno s određenom dozom autokritike, a oduševljenje za tu struku prelazilo je i na druge. Bilo nam je drago kada je zajedno s nama mikroskopirao E. Hauptmann i analizirao na razmazima razne stanične elemente nabrajajući kriterije karakteristične za tumore, ali i one za degenerativne i upalne promjene. S citološkim iskustvom iz tog područja koje je stekao još 1948. godine u Americi objavivši rad „*The cytologic features of carcinomas as studied by direct smears*“ (15). Kao kliničar glasno je razmišljao o diferencijalno dijagnostičkom spektru poremećaja koji mogu izazvati identične promjene u izgledu stanica. Pri analiziranju preparata zahtijevao je apsolutnu objektivnost, a uspoređivanje s ostalim laboratorijskim nalazima i kliničkim podacima dozvoljavao je tek nakon donošenja mišljenja o citološkoj analizi.

Koliko je tek bilo veselja kada je Hauptmann zahvaljujući Rockefellerovoj fondaciji, nabavio binokularni mikroskop s ugrađenim uređajem za fotografiranje (do tada smo raspolagali sa 2 monokularna i jednim binokularnim mikroskopom). Na taj smo se način konačno riješili večernjih „provala“ u hematološki laboratorij prof. Beate Brausil na Rebru, gdje smo uz tajnovitu pomoć njezinog tehničara i fotografa skriveni od ostalih slikali mikrofotografije i kolor dija pozitivne. Zajedno s kliničarima, koji su ujedno i bili promotori citologije, prikazivali smo vlastite rezultate i stručnu fotodokumentaciju na raznim stručnim i znanstvenim skupovima i objavljivali ih u časopisima i knjigama (26,28,29,33).

Uvodili smo i primjenjivali nove tehnike dobivanja uzoraka za citologiju i patohistologiju: sjećam se

da nam je prof. Tihomil Beritić, vrativši se iz inozemstva, jednom prilikom demonstrirao punkciju i biopsiju *cristae posterior allae ossis illei* što smo odmah primijenili na bolesnicima u našoj Klinici i s tom tehnikom upoznali mnoge druge liječnike u raznim zdravstvenim ustanovama Hrvatske.

Uveli smo intraoperativnu citodijagnostiku koristeći uzorke tkiva istodobno za citološku i patohistološku analizu. Razvili smo eksfolijativnu citologiju urina i izljeva primijenivši metodu nakupljanja stanica iz tekućeg materijala u Saykovoju komorici. Hrvoje Harambašić koji je od 1953.g. bio voditelj Citološkog laboratorija u Bolnici Jordanovac, radio je u KB Merkur od 1967. do 1976. g. kao internist pulmolog. Svojim iskustvom u citologiji pridonio je dijagnostičkoj vrijednosti u pulmologiji obavljajući uz ostalo i transtorakalne citološke punkcije pod kontrolom rentgena (34). Njegovom je zaslugom u Citološki laboratorij došao učiti citodijagnostiku i citokemiju iz pulmologije i ostalih neginekoloških područja dr. E. Knoche, liječnik iz okolice Kolna (kirurg, kasnije pulmolog). Sjećam se da su i drugi kliničari posebno Hauptmann i Škrabal upućivali kolege iz inozemstva da u svrhu edukacije kraće ili duže vrijeme provedu u Citološkom laboratoriju Interne klinike KB Merkur.

Moja najljepša uspomena je posjet prof. P.L. Cardoza koji je želio vidjeti naše citološke preparate i pohvalio napredak koji smo zajedno sa Z. Škrabalom i Z. Papićem postigli u citološkoj analizi muških gonada kod oligo i azospermija. Tada je i pulmolog I. Roglić pokazao svoje uspjehe u citološkoj dijagnostici, a P.L. Cardozo ga je kao i našu skupinu iz KB Merkura uvrstio u svoj atlas (11).

Ginekološka citodijagnostika i citogenetika u KB Merkur

Podatke o razvoju ginekološke citologije u Hrvatskoj iscrpno je prikupila Silvana Audy, urednica knjige „Ginekološka citologija u Hrvatskoj – 50 godina poslije“ (35,36).

U KB Merkur započeo je 1963. g. Zvonimir Singer, mladi liječnik na specijalizaciji iz ginekologije, uvoditi citološke pretrage na Ginekološkom odjelu, a 1964. godine i citogenetiku. Za to se u više navrata usavršavao u nekoliko poznatih centara u

inozemstvu. On je 1978. godine položio specijalizaciju iz citopatologije u Beču i često je sudjelovao svojim radovima u internacionalnim društvima za proučavanje dugotrajnih kultura tkiva i stanica. Na Ginekološkoj klinici KB Merkur vodio je odsjek za citologiju i citogenetiku gdje je kontinuirano radio u području humane reprodukcije. Još 1965. godine postao je stalni suradnik Zavoda za dijabetes Vuk Vrhovac te obavljao kariotipizacije i druge citogenetske pretrage za mnoge korisnike diljem Hrvatske. Voditelj tog laboratorija bio je do odlaska u mirovinu (1994. godine) (22). Taj je rad nastavila njegova dugogodišnja suradnica dr. Đurđica Šips (koja ga je kasnije i naslijedila), a za izvođenje citogenetskih analiza postala je odgovorna Emilija Đorđijevski, odlična laboratorijska tehničarka i citotehnolog. Z. Singer je objavio mnogo stručnih i znanstvenih radova, sudjelovao je u nekoliko udžbenika, ali meni je ostala u sjećanju kao najvažnija njegova knjižica za praksu "Priručnik za ginekološku citologiju", objavljena 1966. i 1994. g. (37). Kao nastavnik iz područja svojih specijalnosti sudjelovao je u nekoliko postdiplomskih studija, a bio je odličan voditelj predmeta "Citodijagnostika u ginekologiji" u tečajevima za usavršavanje citotehničara te predsjednik komisije praktičnog i teorijskog dijela njihovih završnih ispita (23).

Citološki laboratorij u Zavodu Vuk Vrhovac

God. 1976. Z. Škrabalo, osnivač i ravnatelj Zavoda Vuk Vrhovac, osnovao je uz moju suradnju citološki laboratorij za potrebe endokrinologije, a prvi voditelj tog laboratorija bio je Zvonimir Papić. On je pri osnivanju tog laboratorija, kao i pri drugim aktivnostima u Zavodu Vuk Vrhovac, bio vrlo aktivan i marljiv, te je uveo suvremenu citološku dijagnostiku u andrologiji. Taj laboratorij bio je usmjeren na područje citokemije krvnih stanica u bolesnika sa šećernom bolesti, te za ekfolijativnu i aspiracijsku citologiju u andrologiji, dok je citologija štitnjače i nadalje ostala vezana uz citološki laboratorij na internoj klinici (22,27-29).

Sva tri citološka laboratorija u KB Merkur osnovali su kliničari i što je najvažnije postavili za voditelje tih laboratorija mlade liječnike koji su radili kliničku citologiju u punom radnom vremenu. Oni su se ujedno učinkovito brinuli za njihovu sistematsku izobrazbu.

UTJECAJ LIJEČNIKA-KLINIČARA U KB

MERKUR NA EDUKACIJU KLINIČKIH CITOLOGA

Kada je 1964. godine na Internoj klinici osnovan citološki laboratorij uz svakodnevnu rutinu, glavna tema bila je kako osposobiti liječnike koji rade u citološkim laboratorijima da postanu samostalni klinički citolozi i kako da steknu status identičan onom ostalih specijalista. Do tada su, naime, samo povremeno zainteresirani kliničari analizirali razmaze koje su im obojili priučeni tehničari. Nas nekolicina koji smo cijelo radno vrijeme radili u laboratorijima, često smo morali slušati oprečna mišljenja onih koji su imali pozitivan stav o dijagnostičkoj vrijednosti citologije i drugih koji su apsolutno negirali njenu vrijednost. Ipak je broj analiza postajao sve veći, pa se tako sve više osjećala potreba da se pristupi sistematskoj edukaciji kadrova za citodijagnostiku. Značajnu ulogu u tom pogledu odigrao je patolog Ante Zimolo: on je prvi tu problematiku predočio tadašnjim organima upravljanja zdravstvom, a Liga za borbu protiv raka nastojala mu je u tome pomoći (16). Raspravu o tome nastavio je s E. Hauptmannom koji je na brojnim kongresima u Europi dolazio u kontakt s kliničarima koji su se također intenzivno bavili citologijom iz odrađenih područja (npr. Lopes-Cardozo, P. Grunze) i sudjelovao u diskusijama o edukaciji kadrova i o osnivanju Europskog društva kliničkih citologa (EFCS). A. Zimolo i E. Hauptmann su o problemu edukacije kontaktirali s kolegama u Ljubljani 1965. i 1966. godine koji su tada već raspolagali s početnim vlastitim iskustvima. God. 1966. došlo je do dogovora između Hauptmanna i Zimola da se u ŠNZ Andrija Štampar Medicinskog fakulteta u Zagrebu osnuje posljediplomski studij iz medicinske citodijagnostike, pa je 1967. godine započela ta vrsta izobrazbe.

Prvi voditelj tog studija bio je E. Hauptmann, a o planu i programu te slijedu održavanja tog studija referirale smo moje suradnice i ja u više navrata (32, 38-41). Ne smije se zaboraviti da su u toku priprema za tu vrstu edukacije dobivene dvije stipendije za usavršavanje u citodijagnostici u Kopenhagenu i da je Liga za borbu protiv raka za prvi postdiplomski studij posudila 5 mikroskopa i isplatila školarinu za 5 polaznika (16). U početku se nastava odvijala pretežno u biblioteci Zavoda za patološku anatomiju gdje su se održavale i vjež-

be uz mikroskope koje su polaznici studija donosili iz svojih matičnih ustanova, a manjim dijelom u Citološkom laboratoriju KB Merkur i ostalim laboratorijima u Zagrebu. E. Hauptmann je bio voditelj tog postdiplomskog studija iz medicinske citologije do 1985. godine, a od 1968. do 1985. godine bila sam zamjenik voditelja (32,39). Hauptmann, koji je imao mnogo smisla za sistematski pristup edukaciji, inzistirao je na tome da broj polaznika bude limitiran (što je koji puta bilo povezano s privremenim odbijanjem kandidata) i da se studij kontinuirano nastavlja svake godine u trajanju od 2 semestra za svladavanje teorijske i praktične nastave. Nakon toga svaki kandidat iza položenog ispita mogao je upisati još 2 semestra za znanstveno usavršavanje i izradu magistarskog rada. Taj se postdiplomski studij uz prilagođavanje plana i programa prema suvremenim potrebama odvija do danas.

Kandidate su prilikom seminara i vježbi vodili tada već iskusni citolozi, voditelji kliničko-citoloških laboratorija i sjećam se da sam i ja u KB Merkuu imala s njima mnoge nezaboravne doživljaje. Sjećam se, na primjer, kako se za vrijeme mikroskopiranja iz udaljene sobe u laboratoriju začuo tihi zvuk jedne pjevnice koju je vodila Ika Kardum Skelin. Zapitavši za razlog tog pjevušenja doznala sam da im je ugođaj analiziranja lijepo obojenih razmaza i način interpretiranja postao tako drag i harmoničan da su to nesvjesno obilježili i pjesmom. Kandidati su bili vrlo strpljivi i samozatajni. Događalo se da su mlade majke već nekoliko tjedana nakon poroda vrlo brzo sjele uz mikroskop i nastavile studij u Zagrebu.

Polaznici poslijediplomskog studija bili su kliničari, patolozi i mladi liječnici bez specijalizacije (32). Većina njih postali su uvaženi voditelji kliničko-citoloških laboratorija u svojim matičnim ustanovama, a neki su se uključili i u nastavni rad za sve profile obrazovanja iz kliničke citologije. Bili su vrlo aktivni i savjesno obavljali dužnosti u citološkoj sekciji a kasnije u Hrvatskom društvu za kliničku citologiju HLZ. Kao primjer rado bih navela svje drage i požrtvovne suradnike i suradnice: Željku Znidarčić, Tatjanu Jeren, Vidu Jakaša, Vojislava Pešuta, Mihovila Roglića, Ivu Pongraca, Mariju Pajtler, Miru Haldbauer, Dragicu Bistrović, a posebno Gabrijelu Kocijan koja je svoj radni vijek

nastavila u Londonu, postavši viši predavač i voditelj Klinike za aspiracijsku citologiju na *University College Hospital* u Londonu.

Već 1968. godine osnovala sam u Srednjoj školi za laboratorijske tehničare u Medvedgradskoj ulici (tadašnji ravnatelj Cvjetko Tanodi) tečaj za usavršavanje citotehničara jer sam smatrala da se klinička citologija, posebno ginekološka, ne može uspješno obavljati bez dobro educiranog srednjeg stručnog kadra. Pri tome najviše su sudjelovali Vojislav Pešut, pulmolog, Zvonimir Singer, ginekolog, Đurđica Šips i brojne mlađe suradnice koje su u međuvremenu postale specijalisti iz kliničke citologije. Kasnije je to usavršavanje pod okriljem Škole postalo 5. stupanj izobrazbe, a od 2000. g. nastavljena je njihova izobrazba pod okriljem Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi (23).

Mnoge su generacije tijekom školovanja prošle kroz citološke laboratorije Interne i Ginekološke klinike u KB Merkuu, a svi su nakon završetka nastavili vrlo savjesno i odgovorno raditi u citološkim laboratorijima matičnih ustanova. Bila sam ponosna na njih, a naročito mi je bilo drago kada mi je na 7. europskom kongresu kliničkih citologa pristupio prof. P. Grunze i posebno pohvalio citotehničarku iz svojeg laboratorija koja mu je pri dolasku u laboratorij ponosno pokazala svjedodžbu o usavršavanju za citotehničare iz škole u Zagrebu na kojoj je uočio i moj potpis. Takvih primjera bilo je i više. U međuvremenu citotehničari su 2003. g. osnovali svoje stručno društvo (Hrvatska udruga citotehnologa-inženjera medicinsko-laboratorijske dijagnostike i laboratorijskih tehničara - HUCIT) (23).

Zalaganjem članova Sekcije za citologiju i citodijagnostiku HLZ-a i razumijevanjem odgovornih članova u tadašnjim organima upravljanja zdravstvom osnovana je 1974. godine samostalna specijalizacija iz kliničke citologije. O tome je također u nekoliko navrata iscrpno priopćeno tijekom održavanja simpozija odnosno kongresa Hrvatskog društva za kliničku citologiju (42-44). Na taj su način konačno liječnici s adekvatnom izobrazbom i punovrijednim statusom izjednačeni sa specijalistima ostalih struka postali punopravni voditelji kliničko-citoloških laboratorija.

UTJECAJ LIJEČNIKA KB MERKUR NA OSNIVANJE STRUČNE ORGANIZACIJE KLINIČKIH CITOLOGA

Godine 1968. tadašnji je Zbor liječnika Hrvatske (ZLH) odobrio formiranje skupine stručnjaka koji se bave citodijagnostikom u sklopu tadašnje sekcije za patološku anatomiju. Za 2 godine, tj. 1970. godine HLZ je odobrio osnivanje samostalne sekcije za citologiju i citodijagnostiku. S već dobro poznatim entuzijazmom moji suradnice i suradnici bili su godinama vrlo aktivni kako u kontinuiranom radu i održavanju mjesečnih sastanaka, tako i u općenitom djelovanju na daljnju izobrazbu mlađih kadrova iz kliničke citologije (42). Sjećam se kako smo još 1969. godine na inicijativu kliničara E. Hauptmanna prihvatili poziv na stručni sastanak njemačkog, švicarskog i austrijskog društva za kliničku citologiju gdje nas je nekolicina nastupila s vlastitim iskustvima iz pojedinih područja citologije. Bio je to nezaboravni doživljaj u proljeće spomenute 1969. godine u malom mjestu Sils Maria pokraj St. Moritza u Švicarskoj. Tamo smo uz prikaze vlastitih rezultata iz područja aspiracijske citologije štitnjače prisustvovali i njihovim organizacijskim sastancima na kojima su i patolozi i kliničari Europe pripremali organizirati Europsku federaciju kliničkih citologa (EFCS). Bila sam zajedno s Harambašićem 1971. g. na sastanku kliničkih citologa u Pragu gdje je osnovna Europska federacija i od tada do danas gdje je naša sekcija, a kasnije Hrvatsko društvo kliničkih citologa, njihov aktivni član (32). Naša zajednička aktivnost toliko je napredovala da smo još 1979. godine organizirali Prvi kongres kliničkih citologa Jugoslavije (UKCJ) čiji je predsjednik bio E. Hauptmann, a glavni voditelji organizacijskog odbora bila je uz mene J. Ivić, S. Audy te nezaboravni tajnik Z. Singer kao i mnogi drugi – kao npr. tada mlada citologinja na specijalizaciji Ika Kardum-Skelin.

Kao i svako sjećanje, pokušala sam prikazati sve ono što je bilo lijepo u stvaranju jedne nove struke, a posredno i neposredno vezano uz KB Merkur, gdje sam provela najbolji dio svog radnog vijeka. Izbjegla sam sjećanja na neuspjehe, odnosno neispunjene želje. Želim vjerovati da će moja nasljednica Ika Kardum-Skelin uz pomoć brojnih odličnih, mladih specijalista iz kliničke citologije iz KB Merkura i

cijele Hrvatske uspjeti i u rješavanju novih zadataka koji su se našli ispred njih, kao što je usaglašavanje novih specijalizacija iz histopatologije i citopatologije te integraciji cjelokupne citologije.

ZAKLJUČAK

U kliničkoj citologiji kao grani dijagnostičke medicine, naročito o njenom dinamičkom razvoju u Hrvatskoj, mnogo se raspravljalo i pisalo u domaćoj literaturi. U ovim se „Sjećanjima“ opisuje 30 godišnje razdoblje citologije u KB Merkur od 1955. do 1985. g. zbog toga što su se tada upravo u toj zdravstvenoj ustanovi sakupili i kliničari i budući citolozi i ostali laboratorijski stručnjaci koji su u timskom radu najviše utjecali na razvoj metodologije i usavršavanje tehnologije. Oni su uveli i omogućili sistematsku edukaciju svih profila iz kliničke citologije i organizirali stručnu i znanstvenu aktivnost formirajući 1970. g. Sekciju za citodijagnostiku (kasnije Hrvatsko društvo za kliničku citologiju) HLZ-a.

Intenzivna suradnja kliničara s kliničkim citolozima omogućila je dobru edukaciju mladih kadrova, sudjelovanje na brojnim kongresima s originalnim radovima obrađenog vlastitog materijala, objavljivanje udžbenika u kojima je obrađivana i kliničko-citološka problematika, a uz mentorsko vodstvo kliničkih citologa KB Merkur izrađeni su magistarski radovi i disertacije. Mnogi klinički citolozi iz drugih zdravstvenih ustanova u Zagrebu i ostalim gradovima u Hrvatskoj ostali su trajno povezani s kliničkim citolozima KB Merkur, jer su začetnici citologije te nasljednice I. Črepinko, I. Kardum-Skelin (predsjednice HDKC) samozatajno i s velikim razumijevanjem i ljubavlju za svoju struku umjele zainteresirati mlade generacije za kliničku citologiju i njezinu svrsishodnu primjenu u preventivnoj i kurativnoj medicini.

Molim da mi oprostite svi oni koji u ovim sjećanjima nisu posebno spomenuti. Neka to ne vodi zaboravu nego neka bude poticaj drugima da ih u svojim sjećanjima oni spomenu i opišu, jer svaka struka i znanost napreduje dok postoji sjećanje na njezin razvoj.



Morfolozi KB Merkur 1978. godine u zajedničkim trenucima povodom proslave rođendana prof. Črepinko

L I T E R A T U R A

1. Rohr K. Das menschliche Knochenmark. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1949.
2. Undritz E. Haematologische Tafeln. Basel: Sandoz, 1950.
3. Jeren T, ur. Sjećanje na prof. dr. Frana Mihaljevića. Zagreb: Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", 2000.
4. Zinser HK. Die Zytodiagnostik in der Gynakologie. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1957, 1951.
5. Streicher, HJ., Sandkühler ST. Klinische Zytologie Grundriss der Allgemeinen Zytologie und der Zyto-diagnostik. Stuttgart: G. Thieme Verlag, 1953.
6. Cardozo, PL. Clinical Cytology using the May-Grunwald-Giemsa Stained Smear. Leyden: L. Stafien, 1954.
7. Papanicolaou GN, Traut HF. Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear. New York: The Commonwealth, 1943.
8. Vidaković S. Rana dijagnozagenitalnih carcinoma. Lijec Vjesn 1950; 72: 37-9.
9. Harambašić H. Primjenjena citologija Lijec Vjesn 1964; 86: 861-4.
10. Bessis M. Blood Smears Reinterpreted Springer International, 1977.
11. Cardozo, PL. Atlas of Clinical Cytology. Leyden: Targa b.v. 's-Hertogenbosch, 1976.
12. Zajicek J. Aspiration biopsy cytology. Part 1 i Part 2, Monographs in clinical cytology: vol. 4 i 7. Basel: Karger, 1974. i 1979.
13. Papanicolaou GN. Atlas of Exfoliative Cytology. Cambridge: Commonwealth Fund by Harvard University Press, 1954.
14. Hauptmann E. Črepinko I. Jugoslavenska hematološka bibliografija, Svezak II, Zagreb: Pliva, 1968.
15. Hauptmann E. The cytologic features of carcinomas as studied by direct smears. Am J Path 1948; 24: 1199-203.
16. Zimolo A. O postdiplomskoj izobrazbi iz citodijagnostike i citopatologije u Hrvatskoj. Ginek Opstet 1968; 8: 187-200.
17. Koss LG. Diagnostic cytology and its histopathological basis. 2. ed. Philadelphia: I.B Lippincott, 1968.
18. Dock G. Clinical pathology in the eighties and nineties. Am J Clin Path 1946; 11: 671-80.
19. Curphey TJ. Widening horizons in pathology. Am J Clin Path 1949; 1: 1-9.
20. Rosahn PD. Pathways in pathology. Am J Clin Path 1949; 8: 796-800.
21. Roguljić A, ur. Opis života i rada profesora doktora Ibrahima Ruždića. U: Ibrahim Ruždić (1906-1990). Zagreb: Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara i Zavod za kliničku kemiju Kliničke bolnice Merkur, 2000.
22. Škrabalo Z. Prilozi za povijest dijabetologije i endokrinologije u Hrvatskoj. Zagreb: Nakladni zavod Globus, 1999.
23. Cesarec I, Bekavac Basić I, Zorko T, ur. Spomen – zbornik, Zagreb: Zdravstveno učilište, 2008, 26-7, 38, 45-6, 316-23, 327.
24. Harambašić H. Profesor Erik Hauptmann – lik i djelo prvog voditelja poslijediplomskog studija iz kliničke citologije. Acta Med Croatica 2008; 62: 435-6.

25. Stacher A. 10 Jahre Ludwig Boltzmann-Institut für Leukämieforschung und Hämatologie. Wien: Wiener Gebietskrankenkasse für Arbeiter und Angestellte, 1978, 7-64.
26. Škrabalo Z, Črepinko I, Grgić Z, Hauptmann E. Primjena aspiracione citodijagnostike kod bolesti štitnjače. Lijec Vjesn 1961; 83: 1035-41.
27. Škrabalo Z. Citološka i citokemijska ispitivanja štitnjače. Zagreb: JAZU, 1972.
28. Črepinko I. Morphological research at the Vuk Vrhovac Institute for Diabetes, Endocrinology and Metabolic diseases. Diabet Croat 1989; 18: 127-31.
29. Škrabalo Z. The Vuk Vrhovac Institute's bibliography/works published from 1935 to 1986. Diab Croat 1987; 16: 84-117.
30. Dominis M, Čerlek S, Solter D. Cytology of diffuse liver disorders Acta Cytol 1973; 17: 205-8.
31. Dominis M, Solter D, Damjanov I. Aspiration cytological and cytochemical study of changes induced in rat liver cells by carbon tetrachloride (CCL₄). Beitr Path 1973; 150: 132-47.
32. Črepinko I, Kardum Skelin I, Mahovlić V, Kudrna Prašek K. Poslijediplomski studij iz kliničke citologije od 1967 godine do danas - razlozi osnivanja i utjecaja na daljnji razvoj citologije u Hrvatskoj. Acta Med Croatica 2008; 62: 335-42.
33. Hauptmann E, Črepinko I. Osnove kliničke hematologije. Zagreb: Školska knjiga, 1963. i 1991.
34. Pavičić D, Harambašić H. Bibliografija 1947-2007. Zagreb: Klinika za plućne bolesti Jordanovac u Zagrebu, Zagreb, 2007.
35. Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj 50 godina poslije. Prvi međunarodni znanstveni simpozij kliničke citologije "Jasna Ivić". Zagreb: Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko društvo za kliničku citologiju, 2003.
36. Audy -Jurković S, Singer Z, Šips Đ i sur. Povijest ginekološke citodijagnostike u Hrvatskoj. Gynaecol Perinatol 2007; 16: 169-80.
37. Singer Z. Priručnik za ginekološku citologiju. Kutina: Narodna tiskara, v Vlastita naklada, 1966. i 1994.
38. Črepinko I, Ivić J. Primjer izobrazbe kadrova za citodijagnostiku u Hrvatskoj. Ljubljana: Zbornik simpozija „Citološki dnevni“, 1969, 162-6.
39. Audy Jurković S. Poslijediplomski studij „Klinička citologija“ 1967-2005. U: Jonjić N, Kardum-Skelin I, Anić V, ur. 3. Hrvatski kongres patologije i sudske medicine, 3. Hrvatski kongres kliničke citologije i 1. Hrvatski simpozij citotehnologije. Opatija. Hrvatsko društvo za kliničku citologiju, Hrvatsko društvo za patologiju i sudsku medicinu, Hrvatska udruga citotehnologa, 2005, 196-7.
40. Kardum-Skelin I. Specific education of cytologists and cytotechnologists. U: Grce M, Davies P, Grubišić G, Kardum-Skelin I, Broker TR, ur. Abstract book International workshop on human papillomaviruses and consensus recommendation for cervical cancer prevention & colposcopy training, Dubrovnik; Ruđer Bošković Institute, International Papillomavirus Society, European Cervical Cancer Association of CMA, Croatian Society for Clinical Cytology of CMA, Croatian Society for Colposcopy and Cervical Pathology of CMA, 2007, 22-3.
41. Kardum Skelin I. Osnovne citomorfološke pretrage i dopunske tehnologije u kliničkoj citologiji. U: Znidarčić Ž. Klinička (neginekološka) citologija u svakodnevnoj praksi. Priručnik za tečaj trajnog medicinskog usavršavanja, Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1988.
42. Črepinko I, Znidarčić Ž, Audy-Jurković S. Klinička citologija u Hrvatskoj/ povodom 30-te obljetnice Hrvatskog društva za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora i 25-te obljetnice specijalizacije iz kliničke citologije. Karlovac: Hrvatsko društvo za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora, 2000, 1-16.
43. Znidarčić Ž, Črepinko I, Jeren T i sur. Uloga kliničara u citološkoj dijagnozi. Lijec Vjesn 2002; 124: 360-5.
44. Znidarčić Ž, Pajtler M. Klinička citologija u Hrvatskoj danas i sutra. U: Štulhofer M, Kurjak A, ur. Klinička medicina u Hrvatskoj danas i sutra. Zagreb: Akademija medicinskih znanosti Hrvatske, 2002, 275-87.

S U M M A R Y

RECOLLECTIONS OF THE DEVELOPMENT OF CLINICAL CYTOLOGY AT MERKUR UNIVERSITY HOSPITAL

I. ČREPINKO

Academy of Medical Sciences of Croatia, Zagreb, Croatia

My recollections of the development of clinical cytology at Merkur University Hospital cover a 30-year period, from 1955 to 1985, and succession of generations. The beginning is always exciting, pervaded by youthful enthusiasm, while memories are quite nostalgic. That is how I also felt at the "Ruždić's" medical biochemistry laboratory. The founders of clinical cytology at Merkur University Hospital were the clinicians Erik Hauptmann (hematologist), Zdenko Škrabalo (endocrinologist) and Zvonimir Singer (gynecologist, cytogeneticist), with great contribution by Ibrahim Ruždić (biochemist). As the first head of cytology laboratory at University Department of Medicine, I realized what was crucial for such a successful development of clinical cytology at our Hospital; it was so because new technologies were continuously introduced in agreement with clinicians, along with the basic routine cytodiagnosis, while paying special attention to staff education (postgraduate study in clinical cytology since 1967; residency in cytology since 1974; education of cytotechnologists since 1968). A number of MS theses and doctoral dissertations have been defended at our cytology laboratories. The Section of Cytology (now Croatian Society of Clinical Cytologists, Croatian Medical Association) was founded in 1970, owing to the efforts invested by E. Hauptmann. Clinical cytologists from Merkur University Hospital contributed to the foundation of the Association of Clinical Cytologists of the then Yugoslavia and organized their first congress in 1979; in 1972, we were adopted members of the EFCS, while Z. Singer and I. Črepinko are IAC members. I wish that written memories help remember the foundation and development of clinical cytology at Merkur University Hospital because we should not forget that every future has its origin.

Key words: clinical cytology, Merkur University Hospital

EDUKACIJA CITOTEHNOLOGA - JESMO LI ZADOVOLJNI S ONIM ŠTO SMO IMALI, ŠTO IMAMO, A ŠTO BISMO ŽELJELI ?

VERONIKA ANIĆ¹ i IKA KARDUM-SKELIN^{1,2}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku i ²Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Želja nam je prikazati edukaciju citotecnologa u Hrvatskoj kako je izgledala u prošlosti, kako izgleda u sadašnjosti kao i naše želje, potrebe, odnosno neophodne nadolazeće promjene u budućoj edukaciji citotecnologa. Školovanje citotecnologa započinje u Školi za zdravstvene tehničare, gdje je prva edukacija citotecnologa organizirana 1968/69. godine, zahvaljujući prof. dr. Ingi Črepinko. Nakon razdoblja edukacije u obliku šestomjesečnog tečaja, od 1981. – 1992. godine, edukacija se odvijala u obliku jednogodišnjeg programa koji je vrednovan kao V. stupanj edukacije. Od tada pa sve do današnjih dana pokušava se oformiti edukacija na bilo kojoj akademskoj instanci u RH bez uspjeha. Jednogodišnja edukacija pri Visokoj zdravstvenoj školi oformljena je 1993. godine, gdje je educirana samo jedna generacija. Pod pokroviteljstvom Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH te Hrvatskim društvom za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora od 2000. g. održano je 5 jednogodišnjih tečajeva sa 630 sati teorijske nastave s vježbama uz 200 sati praktične nastave u citološkim djelatnostima. Da li smo bili i da li smo sada "zadovoljni"? U Hrvatskoj je potrebna optimizirana i standardizirana edukacija citotecnologa na sveučilišnoj razini s važećom diplomom u europskim zemljama te nastavnim planom i programom koja će zadovoljiti potrebe u novim tehnologijama (npr. molekularne tehnike, LBC, HPV testiranja).

Ključne riječi: citotecnolozi, edukacija

Adresa za dopisivanje: Veronika Anić
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
Klinička bolnica „Merkur“
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 22 53 235
E-pošta: veronika.anic@zg.t-com.hr

UVOD

Citotecnolozi godinama nailaze na neprepoznavanje i neadekvatno priznavanje svoje struke i položaja u dijagnostici premalignih i malignih stanja. Želja nam je prikazati edukaciju citotecnologa u Hrvatskoj kakva je bila u prošlosti, kakva je u sadašnjosti kao i naše želje, potrebe, odnosno neophodne nadolazeće promjene u budućoj edukaciji citotecnologa. Posebno se osvrćemo na značenje citologa i citotecnologa KB Merkur u navedenoj edukaciji.

POČECI ŠKOLOVANJA CITOTEHNOLOGA U HRVATSKOJ

Školovanje citotecnologa započinje u Školi za zdravstvene tehničare, gdje je prva edukacija citotecnologa organizirana 1968/69. godine sa 14 polaznika, zahvaljujući prof. dr. sc. Ingi Črepinko. Sljedeća edukacija bila je održana 1971/72. godine sa 13 polaznika te nakon toga svake godine do 1977. godine sa 7-21 polaznika po tečaju. Tijekom razdoblja od 1968. do 1977. godine edukacija je održavana u obliku šestomjesečnog tečaja. Na taj je

način educirano 86 citotehnologa. Jesmo li bili “zadovoljni”? Drugo i bolje nismo imali, ali nadali smo se boljem i višem obrazovanju... Od tada pa sve do današnjih dana pokušava se oformiti edukacija na bilo kojoj akademskoj instanci u RH bez uspjeha. Nakon razdoblja edukacije u obliku šestomjesečnog tečaja, od 1981. do 1992. godine organizirana je edukacija u obliku jednogodišnjeg programa sa 10 do 18 polaznika po tečaju te je na taj način educirano 78 citotehnologa. U edukaciji su u to vrijeme svesrdno učestvovali dr. Vojislav Pešut, prim. dr. Mihovil Roglič, doc. dr. sc. Željka Znidarčić, kao i brojni drugi citolozi. Iz KB Merkura uz prof. Črepinko to su bili prof. dr. sc. Zvonimir Singer (koji je izdao i priručnik za citotehničare, kako su se ranije zvali), dr. sc. Zvonimir Papić, prof. dr. sc. Mara Dominis, dr. Đurđica Šips, dr. Dunja Šušterčić). Taj je oblik edukacije vrednovan kao V. stupanj edukacije (1,2).

EDUKACIJA PRI VISOKOJ ZDRAVSTVENOJ ŠKOLI

Jednogodišnja edukacija pri Visokoj zdravstvenoj školi održana je 1993. godine pod vodstvom doc. dr. sc. Željke Znidarčić, gdje je u tom obliku provedena samo pri jednoj generaciji. Satnica edukacije iznosila je 630 sati u kojoj je 165 sati pripadalo gi-

nekološkoj citologiji, 369 sati neginekološkoj citologiji, a ostatak satnice pripadao je ostalim stručnim predmetima. Jesmo li bili “zadovoljni”? Postajali smo sve više svjesni nedostataka te shvaćali potrebu za adekvatnom edukacijom. Sve više smo bili svjesni neprepoznavanja i nepriznavanja uloge i položaja citotehnologa.

Traganje za trajnom, kompletnijom i statusno priznatom edukacijom dovodi do izrade dvogodišnjeg programa tada pri Visokoj zdravstvenoj školi. Program je verificiran od strane Škole i Medicinskog fakulteta (u čijem se sastavu tada Škola nalazila), ali do danas nije došlo do njene realizacije. Problem je nastao dijelom i zbog reorganizacije visokoškolskih ustanova i programa obrazovanja. Viša zdravstvena škola se osamostaljuje u Visoko zdravstveno učilište, a postojeći dvogodišnji programi se prilagođavaju trogodišnjim. Kontinuirana edukacija je postala problem, što je dovelo do pomanjkanja adekvatno školovanih kadrova, usprkos tome što je Hrvatsko društvo kliničkih citologa HLZ-a u dva navrata prilagođavajući program pri Visokom zdravstvenom učilištu, čekalo skoro 12 godina.

Tada, još uvijek bolje i drugo nismo imali, ali smo se i dalje nadali ... no poučeni negativnim iskustvima i sumnjali ...



Sl. 1. Polaznici Tečaja trajne edukacije citotehnologa 2008. godine s voditeljicom doc. dr. sc. Ikom Kardum-Skelin

KAKO TO IZGLEDA U SADAŠNJOSTI?

Zahvaljujući prepoznatom problemu od strane Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi RH u suradnji s Hrvatskim društvom za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora u razdoblju od 2008. do 2010. (sl. 1) godine nastavljena je edukacija. Prva tri tečaja organizirana su pod vodstvom doc. dr. sc. Željke Znidarčić i zadnja dva tečaja pod vodstvom doc. dr. sc. Ike Kardum-Skelin, zamjenice prim. dr. sc. Silvine Smojver-Ježek te prim. mr. sc. Ane Ovanin Rakić (voditeljice ginekološke citologije) i prof. dr. sc. Tatjane Jeren (predsjednice ispitne komisije). U tečaj su uključeni i brojni drugi citolozi i citotecnolozi iz Zagreba i drugih hrvatskih središta, a educirano je dodatnih 105 citotecnologa što je donekle ublažilo zabrinjavajuće stanje i nedostatak tih izuzetno važnih članova tima. Tečaj je u trajanju od godinu dana sadržavao 630 sati praktične i teorijske nastave iz svih područja citodijagnostike uz 200 sati provedenih u edukaciji u citološkim djelatnostima (slično kao tečaj iz 1993. godine) (3-6).

Izobrazba citotecnologa ne završava održanom edukacijom. Naime, za iskustvo koje je potrebno steći u ginekološkoj citologiji, da bi mogli samostalno izdavati negativne i nezadovoljavajuće rezultate, odnosno da bi postali kompetentni ponuditi diferencijalnu dijagnozu abnormalnih uzoraka te preuzeti ponovni probir (engl. *rescreening*), citotecnolozi moraju pregledati oko 7 000 ginekoloških preparata pod supervizijom.

Pred nas kao i osobe koje su odgovorne za edukaciju u RH postavlja se pitanje hoće li citotecnolozi izgubiti edukaciju ili će se citotecnolozi u RH educirati, prilagoditi, suočiti i usavršiti u novim tehnologijama koje dolaze.

U Hrvatskoj danas postoji samo 225 educiranih i zaposlenih citotecnologa te postoji veliki manjak i potreba za adekvatno educiranim citotecnolozima po Europskim standardima koji bi mogli odgovoriti budućim potrebama vezanima uz nadolazeće organizirane programe probira ranog otkrivanja karcinoma vrata maternice, debelog crijeva, dojke...(7).

Svjesni smo da to još uvijek ne može zamijeniti trajnu i statusno priznatu edukaciju, koju predlaže i Hrvatsko društvo za kliničku citologiju HLZ-a i od

2002. godine osnovana Hrvatska udruga citotecnologa - inženjera medicinsko laboratorijske dijagnostike i laboratorijskih tehničara s prvom predsjednicom Veronikom Anić, koja brzo uvodi u *European Advisory Committee of Cytotechnology* (EACC). Na nedavno novo izabranom vodstvu (predsjednik Silvijo Cuvaj) ostaje daljnja promocija ovog izuzetno važnog člana citološkog tima i borba za statusno priznatu edukaciju.

EDUKACIJA CITOLOGA U BUDUĆNOSTI

Citotecnolozima je potrebna optimalna, kontinuirana i prilagođena edukacija iz više razloga. Hoće li se omogućiti izobrazba novih, vrijednih generacija citotecnologa koji će posjedovati uz morfološke vještine u kombinaciji s molekularnim, citogenetskim, imunocitokemijskim, HPV testiranjem i ostalim analizama te biti od neprocjenjive važnosti u ranom otkrivanju premalignih i malignih promjena na stanicama u smislu rane, pravodobne i točne dijagnoze te praćenju razvoja kao i uspjeha liječenja bolesti.

U Hrvatskoj je potrebna optimizirana i standardizirana edukacija citotecnologa na sveučilišnoj razini s važećom diplomom u Europskim zemljama te nastavnim planom i programom koja će zadovoljiti potrebe u novim tehnologijama (npr. molekularne tehnike, LBC, HPV testiranja). Provedena anketa EACC-a na europskoj razini o izobrazbi citotecnologa u Europi [voditelj Veronika Anić, Hrvatska u sklopu *European Federation of Cytology Societies* (EFCS)] pokazala je da problematika edukacije postoji i na europskoj razini. U mnogim zemljama Europe ne postoji standardizirana, optimizirana edukacija. Zaključno mišljenje provedene ankete jasno ukazuje da edukacija neophodno mora biti provedena na sveučilišnoj razini s velikom potrebom certificirane diplome u životopisu od strane profesionalne organizacije poput EFCS koja bi utjecala i unaprijedila priznanje te olakšalo karijeru citotecnologa na toj razini. Usklađene promjene na europskoj razini povoljno će utjecati i na promjene na nacionalnom razini (8).

Zbog ozbiljnog smanjenja medicinske demografije citotecnologa u Europi neophodne su promjene (evolucijske) u edukaciji i karijeri citotecnologa.

L I T E R A T U R A

1. Cesarec I, Bekavac Basić I, Zorko T, ur. Spomen – zbornik, Zagreb: Zdravstveno učilište, 2008.
2. Pajtler M, Audy-Jurković, Kardum-Skelin I, Mahovlić V, Mozetič-Vrdoljak D, Ovanin-Rakić A. Organisation of Cervical Cytology Screening in Croatia: Past, Present and Future. Coll Antropol 2007; 31(Suppl 2): 47-54.
3. Anic V, Kardum-Skelin I. Education of cytotechnologists in Croatia. Cytopathol 2008; 19(Suppl 1): 57.
4. Kardum-Skelin I. Specific education of cytologists and cytotechnologists. U: Grce M, Davies P, Grubišić G, Kardum-Skelin I, Broker TR, ur. Abstract book International workshop on human papillomaviruses and consensus recommendation for cervical cancer prevention & colposcopy training, Dubrovnik; Ruđer Bošković Institut, International Papillomavirus Society, European Cervical Cancer Association, CMA, Croatian Society for Clinical Cytology of CMA, Croatian Society for Colposcopy and Cervical pathology of CMA, 2007, 22-3.
5. Audy-Jurković S, Singer Z, Šips Đ i sur. Povijest ginekološke citologije u Hrvatskoj. Gynaecol Perinatol 2007; 16: 169-220.
6. Audy-Jurković S. Jasna Ivić i Zavod za ginekološku citologiju Klinike za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb. U: Audy-Jurković S. Ginekološka citologija u Hrvatskoj - 50 godina poslije. Zagreb: Prvi međunarodni znanstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić“, 2003, 23-61.
7. Anic V, Kardum-Skelin I. Cytotechnologists in Croatia. Cytopathology 2009; 20(Suppl 1): 79.
8. Anic V, Eide ML, Domanski A, Ejersbo D, Morgan M, Srebotnik Kirbis I, Stani J. Training and education of cytotechnologists in Europe. Cytopathology 2011; 22(Suppl 1): 12.

S U M M A R Y

EDUCATION OF CYTOTECHNOLOGISTS – ARE WE SATISFIED WITH WHAT WE HAD, WHAT WE HAVE, AND WHAT WE WANT?

V. ANIĆ¹ and I. KARDUM-SKELIN^{1,2}

¹*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*
and ²*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Our aim is to present training of cytotechnologists in Croatia as it looked in the past, as it appears at present, and our desires, needs, and upcoming changes necessary in future education of cytotechnologists. Education in cytotechnology begins at the School of Health Technicians, where the first organized training of cytotechnologists was held in 1968/1969, thanks to the efforts invested by Professor Inga Črepinko. After a period of training in a six-month course, during the 1981-1992 period training took place in the form of a one-year program evaluated as education level V. Since then, efforts to establish education at all academic institutions in Croatia have failed. At Medical College, one-year training was introduced in 1993, however, for only one generation. Under the auspices of the Ministry of Health and Social Welfare and the Croatian Society of Clinical Cytology of the Croatian Medical Association, 5 one-year courses with 630 hours of theoretical classes with practical work and 200 hours of practical training in cytologic activities have been held since 2000. Now, we ask ourselves was there any reason for us to be satisfied in the past and is it there now. In Croatia, there is the need of optimized and standardized training of cytotechnologists at the university level, with a valid certificate in European countries and a curriculum that will meet the needs of new technologies (molecular techniques, LBC, HPV testing, etc.).

Key words: cytotechnology, education

ZNAČENJE SUDJELOVANJA U PROGRAMIMA VANJSKE PROCJENE KVALITETE U MOLEKULARNOJ DIJAGNOSTICI - VLASTITA ISKUSTVA

MIRJANA MARIANA KARDUM PARO¹, ZORAN ŠIFTAR¹,
DUBRAVKA JURETIĆ² i ZLATA FLEGAR- MEŠTRIĆ^{1,2}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
i ²Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Harmonizacija molekularno genskih pretraga u laboratorijima u Republici Hrvatskoj je tek u začetku. Sudjelovanje u programima vanjske procjene kvalitete je jedan od kriterija osiguranja kvalitete postupaka ispitivanja, ali i jedan od preduvjeta za zahtjevan proces akreditacije temeljem međunarodne norme EN ISO 15189 "Medicinski laboratoriji - posebni zahtjevi za kvalitetu i kompetenciju" svakog medicinsko-biokemijskog laboratorija koji izvodi molekularno genske pretrage. Poradi njihove velike specifičnosti i korištenja različitih tehnologija i opreme, međulaboratorijska usporedba rezultata molekularno genskih pretraga je ključna komponenta osiguranja kvalitete. U današnje su vrijeme medicinsko-biokemijskim laboratorijima koji izvode molekularno genske pretrage dostupne različite međunarodne sheme i programi vanjske procjene kvalitete. Cilj rada je temeljem iskustava sudjelovanja Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu u međunarodnim programima UK NEQAS (engl. *United Kingdom National External Quality Assessment Scheme*), EMQN (engl. *The European Molecular Genetic Quality Network*) i EQUAL-qual (engl. *Multi-National External Quality Assay program*) ukazati na važnost standardizacije i harmonizacije različitih metodologija u molekularnoj dijagnostici, ne samo na nacionalnoj, nego i na europskoj razini.

Ključne riječi: međunarodni programi vanjske procjene kvalitete, standardizacija, harmonizacija u molekularnoj dijagnostici

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Mirjana Mariana Kardum Paro, spec. med. biokemije
Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10 000 Zagreb, Hrvatska
Tel/faks: +385 1 2431 397
E-pošta: mariana.kardum@zg.t-com.hr

UVOD

Molekularna dijagnostika kao specifičan dio visokodiferentne laboratorijske medicine mora zadovoljiti sve opće uvjete osiguranja kvalitete primjenjive i na cjelokupan laboratorijski proces. Molekularno genske pretrage su pretrage kojima se izravno ili neizravno na razini nukleinske kiseline utvrđuje prisustvo ili odsustvo mutacija, broj kopija gena ili broj ponavljajućih jedinica. Kako su molekularno genske pretrage uglavnom kvalitativne, za osiguranje njihove kvalitete je prihvaća-

nje preporuka i smjernica dobre prakse neophodno. Prema međunarodnoj normi za medicinske laboratorije EN ISO 15189 "Medicinski laboratoriji - posebni zahtjevi za kvalitetu i kompetenciju" od kliničkog se laboratorija zahtijeva da sudjeluje u shemama ili međunarodnim programima vanjske procjene kvalitete radi međulaboratorijske usporedbe rezultata ispitivanja. U molekularnoj dijagnostici se kao kriteriji prihvatljivosti rezultata ispitivanja preporučuje mišljenje stručnjaka, aktualno stanje struke ili potvrda dobivenih rezultata ispitivanja usporednim tehnologijama. Unutar po-

jedinih međunarodnih programa vanjske procjene kvalitete postoje različite sheme razvijene za praćenje čestih nasljednih genskih bolesti (engl. *Application-based proficiency testing*), odnosno sheme ili međunarodni programi vanjske procjene kvalitete namijenjeni praćenju kvalitete analitičkog dijela molekularno genskih pretraga (engl. „*Methodological proficiency testing*“) prvenstveno usmjerenih na način izdvajanja nukleinskih kiselina ili način njihovog umnažanja. Prva je međunarodna shema iz molekularne dijagnostike organizirana 1996. godine i bila je namijenjena otkrivanju mutacije u genu za cističnu fibrozu (CFTR). U današnje vrijeme postoji veliki broj različitih shema i međunarodnih programa vanjske procjene kvalitete u molekularnoj dijagnostici dostupnih kliničkim laboratorijima diljem Europe koji nude potporu i savjet pri izvođenju molekularno genskih pretraga s ciljem standardizacije i harmonizacije različitih metodologija u molekularnoj dijagnostici (1-11).

Slijedeći zahtjeve međunarodne norme za medicinske laboratorije EN ISO 15189 i smjernice dobre laboratorijske prakse Laboratorij za molekularnu dijagnostiku Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur od 2005.

godine sudjeluje u međunarodnim programima vanjske procjene kvalitete UK NEQAS (engl. *United Kingdom National External Quality Assessment Scheme*) i EMQN (engl. *The European Molecular Genetic Quality Network*) namijenjenima svim kliničkim laboratorijima koji izvode molekularno genske pretrage za otkrivanje zloćudnih hematoloških bolesti i najčešćih genskih poremećaja, a od 2004. do 2006. godine je sudjelovao i u međunarodnom programu EQUAL (engl. *Multi-National External Quality Assay program*). Cilj rada je sažeto prikazati vlastita iskustva sudjelovanja u različitim međunarodnim programima vanjske procjene kvalitete radi standardizacije metodologija u molekularnoj dijagnostici i postizanja međulaboratorijske usporedivosti rezultata ispitivanja i na europskoj razini.

METODE

Neovisni organizatori shema ili međunarodnih programa vanjske procjene kvalitete distribuiraju kontrolne uzorke svim sudionicima sheme ili programa (tablica 1).

Tablica 1.

Vrsta kontrolnog uzorka distribuirana sudionicima shema ili programa vanjske procjene kvalitete.

Neovisni organizator	Shema/ program vanjske procjene kvalitete	Vrsta distribuiranog kontrolnog uzorka	Pojedinačni podprogrami	Metoda
UK NEQAS (<i>United Kingdom National External Quality Assessment Schemes for Leucocyte Immunophenotyping</i>)	MDHM	liofilizirani limfociti (liofilizirane stanične linije)	otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa uključujući t(8;21), t(15;17) i inv(16)	kvalitativna lančana reakcija polimeraze
		puna krv	JAK2 V617F mutation status	alel- specifična lančana reakcija polimeraze
			IgH/TCR clonality testing	višestruka lančana reakcija polimeraze
EMQN (<i>European Molecular Genetics Quality Network</i>)	HFE	DNK (otopljena)	HFE testing	lančana reakcija polimeraze – polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (PCR-RFLP)
EQUAL (<i>Multi-National External Quality Assay (EQA) programs</i>)	EQUAL- qual	puna krv humanog porijekla ili izdvojena DNK priložene početnice (EQUAL- qual Kit)	EQUAL- qual metodološki modul	kvalitativna lančana reakcija polimeraze (izdvajanje DNK, određivanje kvalitete/ koncentracije DNK, umnažanje lančanom reakcijom polimeraze i analiza produkata umnažanja)

PREGLED NEKIH OD MEĐUNARODNIH PROGRAMA VANJSKE PROCJENE KVALITETE U MOLEKULARNOJ DIJAGNOSTICI

1. EQUAL (engl. Multi-National External Quality Assay (EQA) program)

Program EQUAL je započeo 2004. godine unutar programa EU FP6 (za detalje vidi <http://www.ec-4.org/equal>), a sačinjavala su ga 3 različita metodološka modula: EQUAL-qual, EQUAL-quant i EQUAL-seq koji su se bavili procjenom kvalitete u genotipiziranju, kvantitativnoj lančanoj reakciji polimeraze i sekvencioniranju DNK. U programu EQUAL je ukupno sudjelovalo 380 laboratorija: 200 u metodološkom modulu EQUAL-qual, 120 u metodološkom modulu EQUAL-quant i 60 u EQUAL-seq metodološkom modulu (10-11).

U EQUAL-qual metodološkom modulu u kojem je procjenjivan način izdvajanja deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i učinkovitost njenog umnažanja lančanom reakcijom polimeraze, svaki je sudionik iz distribuiranih kontrolnih uzoraka (dvaju uzoraka pune krvi i dvaju uzoraka izdvojene DNK) morao DNK izdvojiti prema vlastitom protokolu izdvajanja DNK, odrediti njihovu čistoću i koncentraciju i umnožiti ih koristeći priložene, ali i vlastite oligonukleotidne početnice (engl. *primers*), te dobivene produkte umnažanja analizirati nakon elektroforeze na agaroznom gelu. Rezultati svih sudionika su statistički obrađeni, a dobiveni podaci kategorizirani u arbitrarne jedinice prema analizi percentila. Ovisno o rezultatu, sudionici su svrstavani u neku od skupina, a shodno zbroju bodova im je dodijeljena i ukupna ocjena (engl. „*total score value*“) analitičkog dijela molekularno genske pretrage, odnosno opisna ocjena njene izvedbe. Na primjer, izvedba nekog sudionika je ocijenjena kao izvrsna (engl. *excellent*), ako je zbrojem bodova postignuta ukupna ocjena jednaka 80 ili više bodova. Ako je ukupna ocjena jednaka 65 ili manja od 80 bodova, izvedba je ocijenjena dobrom, a u slučaju da je ukupna ocjena bila jednaka 32 ili manja od 65 bodova izvedba je ocijenjena zadovoljavajućom. Sve izvedbe u kojima je ukupna ocjena dobivena zbrojem bodova bila manja od 32 ocijenjene su kao nezadovoljavajuće, a svim sudionicima s nezadovoljavajuće ocijenjenom izvedbom je pružena mogućnost daljnje edukacije na organiziranim EQUAL radionicama.

2. UK NEQAS (engl. United Kingdom National External Quality Assessment Schemes for Leucocyte Immunophenotyping)

Međunarodni program vanjske procjene kvalitete UK NEQAS akreditiran od strane udruženja za akreditaciju kliničke patologije (engl. *Clinical Pathology Accreditation*; CPA) omogućava vanjsku procjenu kvalitete molekularno genskih pretraga za otkrivanje zloćudnih hematoloških bolesti (engl. *Molecular Diagnosis of Haematological Malignancies*; MDHM). Shema MDHM međunarodnog programa UK NEQAS je sastavljena od pet pojedinačnih potprograma: otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa (uključujući translokacije t(8;21), t(15;17) i inv16), određivanje kvantitativne razine fuzijskog prijepisa gena BCR-ABL, praćenje kimerizma, određivanje klonalnih preuredbi u genu za teški lanac imunoglobulina i T-staničnim receptorima (IgH/TCR) i otkrivanje točkaste mutacije V617F u genu za tirozin-kinazu JAK2. Kontrolni uzorci (liofilizirani limfociti, liofilizirane stanične linije ili uzorci pune krvi negativni na HIV I, HIV II, HBV, HCV i sifilis) se, ovisno o njihovoj raspoloživosti, distribuiraju sudionicima svaka dva do tri mjeseca. Sudionici moraju izdvojiti odgovarajuću nukleinsku kiselinu (DNK ili RNK) prema vlastitom, rutinskom protokolu izdvajanja, umnožiti ih, a prema dobivenim produktima umnažanja dokazati ili o kojem fuzijskom prijepisu, odnosno kojoj klonalnoj preuredbi je riječ ili kolika je kvantitativna razina fuzijskog prijepisa gena BCR-ABL. Kriterij prihvatljivosti rezultata je konsensus rezultat koji se temelji na pojedinačnim rezultatima svih sudionika. Kako je shema MDHM međunarodnog programa UK NEQAS tada bila u pokusnoj fazi, učinkovit sustav bodovanja (engl. *scoring system*) nije postojao, a svaki pojedinačni rezultat sudionika procjenjivan je isključivo u odnosu na konsensus svih sudionika.

3. EMQN (engl. European Molecular Genetics Quality Network)

Međunarodni program EMQN, započeo 1998. godine kao pilot program, je kliničkim laboratorijima širom Europe ponudio prve sheme i programe vanjske procjene kvalitete namijenjene molekularnoj dijagnostici genskih bolesti s ciljem povećanja i održavanja standarda izvođenja molekularno genskih pretraga. Već 2004. godine EMQN je nudio sudjelo-

vanje u 14 različitih shema namijenjenih najčešćim genskim bolestima: retinoblastomu (RB), fragilnom X sindromu (FRAX), muskularnoj distrofiji tipa Duchenne (DMD), karcinomu dojke (BRCA 1, BRCA 2), hereditarnoj hemokromatozi (HFE) i dr. Sve sheme i programe koje EMQN nudi mogu se naći na internetskoj stranici EMQN-a (<http://www.emqn.org>) i otvoreni su svim kliničkim laboratorijima koji za cilj imaju edukaciju genotipiranja i ispravno tumačenje dobivenih rezultata. Program vanjske procjene kvalitete hereditarne hemokromatoze obuhvaća tri klinička slučaja praćena potrebnim kliničkim podacima kako bi se rezultati genotipiranja mogli ispravno protumačiti.

Kontrolni uzorci (DNK) se nakon utvrđivanja i potvrde genotipova od strane eksperata iz dvije neovisne kliničke ustanove i dvjema različitim metodologijama distribuiraju sudionicima. Izvještaje sudionika ocjenjuju ocjenjivači slijedeći smjernice dobre laboratorijske prakse objavljene na internetskoj stranici EMQN-a (<http://www.emqn.org>). Rezultati genotipiranja se šalju organizatoru programa vanjske procjene kvalitete u obliku laboratorijskog nalaza uz tumačenje dobivenih rezultata. Rezultati sudionika se ocjenjuju s obzirom na točnost genotipiranja i dosljednost u tumačenju dobivenih rezultata u skladu s poznatim kliničkim podacima.

Rezultat izvedbe izražava se zbrojem dviju numeričkih ocjena: ocjene za točnost genotipiranja i ocjene za tumačenje dobivenih rezultata genotipiranja. Prema utvrđenim kriterijima, za svaki ispravno utvrđeni genotip, kao i za svako ispravno tumačenje rezultata genotipiranja sudionicima se dodjeljuju po 2.00 boda. Na kraju svakog ciklusa organizator sheme ili programa vanjske procjene kvalitete sudionicima šalje konačan izvještaj u pisanom obliku koji im omogućava uvid u rezultate svih sudionika i procjenu vlastitih rezultata u odnosu na rezultate svih sudionika. Kao i ostali programi vanjske procjene kvalitete i EMQN program je prvenstveno program s obrazovnim karakterom koji nastoji kritički procijeniti analitičku izvedbu svakog sudionika, a da pritom svaku lošu analitičku izvedbu ili tumačenje rezultata ne kažnjava oduzimanjem bodova.

REZULTATI I RASPRAVA

Sudjelovanje u programima vanjske procjene kvalitete je jedan od kriterija osiguranja kvalitete postupaka ispitivanja, ali i jedan od preduvjeta za zahtjevan proces akreditacije svakog medicinsko-biokemijskog laboratorija temeljem međunarodne norme EN ISO 15189 "Medicinski laboratoriji - posebni zahtjevi za kvalitetu i kompetenciju" (13). Sve više kliničkih laboratorija koristi sve veći broj molekularno genskih pretraga.

Postojanje različitih metodologija u molekularnoj dijagnostici ne samo na nacionalnoj, nego i na europskoj razini ukazuje na stalnu potrebu za standardizacijom metodologija, postupaka i radnih protokola. Mnogi radni protokoli opisani posljednjih godina su tzv. „in-house“ radni protokoli koje je neophodno standardizirati ako ih se želi učiniti prihvatljivima pri izvođenju rutinskih molekularno genskih pretraga. Mnogo je napora učinjeno s ciljem standardizacije metodologija, postupaka i radnih protokola u molekularnoj dijagnostici. Standardizirani radni protokoli u molekularnoj dijagnostici su danas dostupni u obliku preporuka ili smjernica dobre prakse (14,15).

Mnogi od njih se odnose na prijeanalitičku (16-20), analitičku (12-15,20) ili poslijeanalitičku fazu postupaka ispitivanja, budući da je i u području molekularne dijagnostike, kao i u ostalom području laboratorijske dijagnostike, za procjenu prihvatljivosti rezultata neophodno sagledati cjelokupan laboratorijski proces. Kako je najčešći uzrok neprihvatljivosti rezultata posljedica predanalitičkog dijela, neophodna je stalna unutarnja kontrola kvalitete rada (1,2,7,13). Prema standardiziranim radnim protokolima i smjernicama dobre prakse u molekularnoj dijagnostici za utvrđivanje integriteta nukleinske kiseline potrebno je koristiti elektroforezu na agaroznom gelu, onečišćenja pri umnažanju lančanom reakcijom polimeraze pratiti pojačanim umnažanjem i pozitivnih i negativnih internih kontrola, a prisustvo inhibitora lančane reakcije polimeraze ocjenjivati spektrofotometrijskim mjerenjem čistoće nukleinske kiseline (260/280 nm) (8). Za utvrđivanje točne veličine produkata umnažanja potrebno je koristiti odgovarajuće molekularne biljege različitih raspona (12-14). Rezultati ostvareni u skladu s navedenim standardiziranim radnim protokolima i smjernicama dobre prakse

Tablica 2.

Rezultati sudjelovanja u međunarodnom programu UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Schemes for Leucocyte Immunophenotyping) u razdoblju 2006.- 2010. godine. Shema MDHM (Molecular Diagnosis of Haematological Malignancies).

Program UK NEQAS		Shema MDHM				
Godina sudjelovanja	Ciklusa (ukupno)	MDHM ciklusi	Broj sudionika ciklusa	% sudionika s konzensus rezultatom	Vlastiti rezultati jednak konzensus rezultatima	Pokrenuta popravna radnja
2006.	3	otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa (1)	22	100% (22/22)	DA	-
		određivanje klonalne preuredbe (IgH) (2)	26	73 % (19/26)	DA	
			32	97 % (31/32)	DA	
2007.	3	otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa (1)	44	55 % (24/44)	NE	DA
		određivanje klonalnih preuredbi (IgH/TCR) (1)	57	68 % (55/57) (za IgH) 84 % (43/51) (za TCR)	DA	
		otkrivanje mutacije V617F u genu za JAK2 (1)	61	70 % (43/61)	DA	
2008.	6	određivanje klonalne preuredbe (IgH) (2)	65	94 % (61/65)	DA	-
			72	96 % (69/72)	DA	
		otkrivanje mutacije V617F u genu za JAK2 (2)	51	74 % (53/72)	DA	
			85	76 % (65/85)	DA	
		otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa (2)	72	96 % (49/51)	DA	
2009.	6	otkrivanje mutacije V617F u genu za JAK2 (2)	103	98 % (101/103)	DA	-
			106	81 % (86/106)	DA	
		određivanje klonalne preuredbe (IgH) (1)	76	99 % (75/76)	DA	
		otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa (2)	66	100% (66/66)	DA	
			69	100% (69/69)	DA	
		određivanje klonalne preuredbe (TCR) (1)	46	89 % (41/46) (za TCRb) 92 % (69/75) (za TCRy)	DA	
2010.	6	otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa (2)	87	98 % (85/87)	DA	-
			87	99 % (86/87)	DA	
		određivanje klonalne preuredbe (IgH) (2)	101	94 % (95/101)	DA	
			96	98 % (94/96)	DA	
		otkrivanje mutacije V617F u genu za JAK2 (2)	120	100% (120/120)	DA	
			113	94 % (106/113)	NE	
Ciklusa (ukupno): 24		Pokrenutih popravni radnji (ukupno)			3	

Tablica 3.

Rezultati sudjelovanja u međunarodnom programu EMQN (The European Molecular Genetics Quality Network) u razdoblju od 2004. -2010. godine. Shema namijenjena praćenju hereditarne hemokromatoze (HFE).

Program EMQN (The European Molecular Genetics Quality Network)		Shema HFE							
Godina sudjelovanja	Broj sudionika ciklusa	Rezultati genotipiranja			Rezultati tumačenja rezultata genotipiranja			Ocjena analitičke izvedbe	Pokrenute popravne radnje
		% sudionika s maksimalnim bodovima genotipiranja	Prosječni zbroj bodova genotipiranja svih sudionika („score“)	Vlastiti zbroj bodova genotipiranja („score“)	% sudionika s maksimalnim brojem bodova tumačenja rezultata	Prosječni zbroj bodova tumačenja svih sudionika	Vlastiti zbroj bodova tumačenja rezultata		
2004.	57	97 % (55/57)	1.99	2.00	26% (15/57)	1.65	---	---	NE
2005.	53	98% (52/53)	1.97	2.00	17% (9/53)	1.60	---	---	
2006.	57	96% (55/57)	1.99	2.00	26% (15/57)	1.66	1.42	ODLIČNA	
2007.	60	97% (58/60)	1.92	0.67	48% (29/60)	1.82	2.00	LOŠA*	DA
2008.	79	99% (66/67)	1.99	2.00	12% (8/79)	1.52	1.42	ODLIČNA	NE
2009.	78	97% (76/78)	1.98	2.00	28% (22/78)	1.80	1.75	ODLIČNA	
2010.	u tijeku								
Pokrenutih popravni radnji (ukupno):								1	

PCR-RFLP = lančana reakcija polimeraze-polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata; maksimalan broj bodova genotipiranja i tumačenja rezultata genotipiranja= 2,00

Tablica 4.

Rezultati sudjelovanja u projektu EQUAL
(Multi-National External Quality Assay (EQA)
program. Metodološki modul EQUAL-qual.

EQUAL-qual modul		Godina sudjelovanja	
		2005.	2006.
Način izdvajanja nukleinske kiseline DNK („DNA quality and DNA quantity“)	Ukupni zbroj bodova	18	18
Umnažanje kontrolnih uzoraka („PCR performance“)	Ukupni zbroj bodova	72	69
Ukupna ocjena („Total Score Value“)		90	87
Ocjena analitičke izvedbe* (prema ukupnoj ocjeni)		izvrсна	izvrсна

*analitička izvedba je ocijenjena izvrsnom ako je zbrojem bodova postignuta ukupna ocjena jednaka 80 ili više bodova od maksimalnih 116

su zbirno prikazani u tablicama 2, 3 i 4. Danas se u literaturi koristi pojam „ispitivanje osposobljenosti“ (engl. *Proficiency Testing*, PT) umjesto pojma „vanjska procjena kvalitete“ (engl. *External Quality Assessment*, EQA), iako jasne razlike između tih dvaju pojmova nema. Vanjska procjena kvalitete je definirana kao „određivanje laboratorijskih izvedbi ili postupaka ispitivanja međulaboratorijskom usporedbom rezultata ispitivanja“, a dostupna je u shemama ili međunarodnim programima namijenjenima praćenju kvalitete analitičkog dijela molekularno genskih pretraga ili u shemama namijenjenima praćenju čestih nasljednih genskih bolesti (7,13,23,26-28).

Ispitivanje osposobljenosti je definirano kao „određivanje specifičnosti laboratorijskih izvedbi međulaboratorijskom usporedbom rezultata ispitivanja“ (25). Nepobitna činjenica o postojanju velikog broja različitih metodologija, postupaka i radnih protokola ukazuje na potrebu sudjelovanja u nekoj od shema ili međunarodnih programa vanjske procjene kvalitete u molekularnoj dijagnostici. Unutar programa EU FP6 ustanovljen je 2004. godine metodološki program EQUAL sačinjen od 3 različita modula od kojih je modul EQUAL-qual bio namijenjen praćenju načina izdvajanja DNK i njihovom umnažanju kvalitativnim lančanim reakcijama polimeraze (10-11,22). Rezultati projekta EQUAL su objavljeni u mnogim radovima (22,31-32). Nakon

izdvajanja DNK i njenog umnažanja lančanom reakcijom polimeraze prema vlastitim protokolima izdvajanja i umnažanja, rezultati laboratorijskih postupaka ispitivanja su procjenjivani temeljem njihove raspodjele oko konsenzus vrijednosti medijana svih sudionika, kategorizirani su u arbitrarne jedinice prema analizi percentila i izraženi kao ukupna ocjena (engl. „total score value“). Iako je u svakom od ciklusa projekta EQUAL postignut zbroj bodova bio jednak 80 ili više bodova, a naša laboratorijska izvedba uvijek ocjenjivana kao izvrsna (tablica 4), zaključili smo da je potrebno ne pratiti samo kvalitetu prijeanalitičkog i analitičkog dijela postupaka ispitivanja, već i poslijeanalitičkog dijela. Ipak, valja istaći kako je projekt EQUAL imao i obrazovnu ulogu, ali i otišao korak dalje od ostalih programa nudeći radionice za izobrazbu i poduku onih sudionika koji su u okviru programa EQUAL postigli slabije rezultate, a nakon njihove izobrazbe bili su daleko uspješniji. Danas se sudjelovanje u metodološkim shemama ili programima vanjske procjene kvalitete preporučuje tek kao alternativa sudjelovanju u shemama ili programima namijenjenim praćenju čestih nasljednih genskih bolesti u organizaciji UK NEQAS-a, EMQN-a ili mreže za cističnu fibrozu (engl. *Cystic Fibrosis Network*, CF-Network) (29,30). Kako Laboratorij za molekularnu dijagnostiku Zavoda za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu većinom izvodi molekularno genske pretrage za otkrivanje zloćudnih hematoloških bolesti i najčešćih genskih poremećaja, sudionik je programa UK NEQAS i sheme MDHM namijenjene praćenju zloćudnih hematoloških bolesti, te programa EMQN i sheme HFE namijenjene praćenju hereditarne hemokromatoze.

Od 2006. do 2010. godine održano je ukupno 24 ciklusa sheme MDHM (otkrivanje BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa uključujući translokacije t(8;21), t(15;17) i inv16), određivanje klonalnih preuredbi u genu za teški lanac imunoglobulina i T-staničnim receptorima (IgH/TCR) i otkrivanje točkaste mutacije V617F u genu za tirozin-kinazu JAK2) (rezultati su prikazani u tablici 2). Konsensus rezultat je temeljen na rezultatima svih sudionika i predstavljao je ciljnu vrijednost u odnosu na koju je procjenjivan rezultat svakog sudionika. Kako su rezultati opisni, bodovanje sudionika se ne provodi. Ukupno su pokrenute tri popravne radnje. Pri otkrivanju BCR-ABL i AML fuzijskih prijepisa uključujući

translokacije t(8;21), t(15;17) i inv16), prethodno je određena čistoća i koncentracija izdvojene RNK, ustanovljen njen integritet elektroforezom na agaroznom gelu i provjereno umnažanje kontrolnog gena. Uočena razlika rezultata u odnosu na konsensus rezultat ciklusa u kojem je bilo potrebno otkriti BCR-ABL i AML fuzijske prijepise mogla je biti posljedica niske razine fuzijskih prijepisa u kontrolnom uzorku koji je prema priznanju organizatora bio irelevantan za dijagnostičke svrhe. U ciklusu određivanja klonalnih preuredbi u genima za T-stanične receptore (TCRb; TCRg), postignut je konsensus rezultat za TCRb, ali ne i za TCRg. Nakon što je određivanje klonalne preuredbe u genu za T-stanični receptor g (TCRg) ponovljeno s istim rezultatom klonalne preuredbe, kontaktiran je organizator koji je preporučio korištenje komercijalnog dijagnostičkog testa. U ciklusu otkrivanja mutacije V617F u genu za tirozin-kinazu JAK2 nije ostvaren konsensus rezultat radi neodgovarajućeg tumačenja rezultata. Nakon primljenog završnog izvještaja o ciklusu ponovljeno je određivanje istog kontrolnog uzorka i dobiven je isti analitički rezultat koji je prema organizatorovom objašnjenju najvjerojatnije posljedica vrlo male količine mutacijskog produkta (7,9%) u odnosu na prethodne kontrolne uzorke (28,0%).

Sudjelovanje u programu UK NEQAS i shemi MDHM omogućilo nam je dugoročno retrospektivno praćenje kvalitete prijeanalitičkog, analitičkog i poslijeanalitičkog dijela molekularno genskih pretraga i unaprjeđenje postupaka ispitivanja standardizacijom i međulaboratorijskom usporedivosti rezultata ispitivanja.

Od 2004. godine Laboratorij za molekularnu dijagnostiku Zavoda za kliničku kemiju uključen je u program EMQN i shemu HFE namijenjenu praćenju hereditarne hemokromatoze odnosno otkrivanju dviju zajedničkih mutacija ili varijanata u genu za HFE. Rezultati genotipiranja i tumačenja dobivenih rezultata genotipiranja su prikazani u tablici 3. Tijekom proteklih godina zadržana je visoka razina rezultata genotipiranja, a od 2005. godine raste i uspješnost tumačenja dobivenih rezultata genotipiranja, jer postotak sudionika koji postižu maksimalan broj bodova za tumačenje rezultata genotipiranja raste kontinuirano (17% 2005., 26% 2006. i 48% 2007. godine). Svakako valja naglasiti i

edukativnu ulogu sheme HFE u ispravnom tumačenju dobivenih rezultata genotipiranja, a koji bi trebali pomoći kliničaru u postavljanju dijagnoze.

Tijekom proteklih godina sudjelovanja u shemi HFE jedino su 2007. godine rezultati genotipiranja proglašeni lošima, jer je zbroj bodova ostvaren genotipiranjem pao ispod prosječne vrijednosti svih sudionika (ispod 1,60). Poduzeta je popravna radnja, ponovljena je analiza slikovnih rezultata genotipiranja koja je pokazala da je došlo do zamjene dvaju uzoraka, a time i rezultata genotipiranja, te se smatrala slučajnom pogreškom.

Godine 2005. osnovana je mreža izvrsnosti EuroGentest (engl. *Network of Excellence*) s ciljem razvoja infrastrukture, izrade postupaka ispitivanja i smjernica za harmonizaciju genskog testiranja diljem Europe (33). Program SPIDIA (engl. *Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics*) je započeo 2008. godine unutar programa EU FP7 (za detalje vidi <http://www.spidia.eu>) s ciljem daljnje standardizacije i poboljšanja prijeanalitičke faze na Europskoj razini (34). Trenutno se najvažnije informacije o dostupnim shemama i međunarodnim programima vanjske procjene kvalitete mogu naći na internetskim stranicama njihovih organizatora koji nude različite sheme za otkrivanje konstitucijskih mutacija (ACE, APC, ApoB100, ApoE i dr.), farmakogenetiku (CYP2D6, GH-R i dr.) ili otkrivanje somatskih mutacija (bcr-1, bcr-2, određivanje klonalnih preuredbi i dr.) (za detalje vidi <http://emqn.org> ili <http://www.eurogentest.org>).

Sheme ili programe vanjske procjene kvalitete nije moguće razviti za sve genske bolesti, naročito ne za one vrlo rijetke. Stoga je Njemačko društvo za kliničku kemiju (engl. *The German Society of Clinical Chemistry*, DGKC) preporučilo program temeljen na procjeni najuobičajenijih analitičkih aspekata većine molekularnih postupaka ispitivanja u rutinskom genskom testiranju (21, 28).

Temeljem višegodišnjeg iskustva zaključujemo da sudjelovanje u nekoj od shema ili u nekom od međunarodnih programa vanjske procjene kvalitete pruža objektivni uvid u vlastitu laboratorijsku izvedbu i postupke ispitivanja i omogućava međulaboratorijsku usporedivost rezultata ispitivanja

i na europskoj razini. Ostvareni su dobri rezultati u programima vanjske procjene kvalitete u kojima se sudjelovalo, a dobiveni rezultati su korišteni za otkrivanje laboratorijskih analitičkih pogrešaka, nakon kojih su pokrenute i popravne radnje kako bi se smanjile njihove moguće posljedice.

ZAKLJUČAK

Prema našem iskustvu, sudjelovanja, sheme ili međunarodni programi vanjske procjene kvalitete daju objektivni uvid u vlastitu laboratorijsku izvedbu i postupke ispitivanja, mogućnost pravodobnog prepoznavanja mogućih laboratorijskih analitičkih pogrešaka i pokretanje preventivnih radnji s ciljem smanjenja njihove učestalosti u budućnosti. Prihvatanje standardiziranih postupaka i radnih protokola u molekularnoj dijagnostici, te harmoniziranih metodologija ne samo na nacionalnoj, nego i na europskoj razini omogućilo bi i da nove molekularno genske pretrage pronađu svoje mjesto u kliničkom laboratoriju. Budućnost rutinskog testiranja u molekularnoj dijagnostici zasigurno predstavlja razvoj standardiziranih nukleinsko-kiselinskih referentnih materijala (engl. *Nucleic Acid Reference Materials*, NARMs). Prvi referentni materijal u molekularnoj dijagnostici namijenjen za probir krvnih pripravaka na virus hepatitisa C (HCV genotip 1, 96/790) je razvila je Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *The World Health Organization*, WHO), a jedan od prvih standardiziranih nukleinsko-kiselinskih referentnih materijala razvio je Nacionalni institut za standard i tehnologiju (engl. *The National Institute of Standards and Technology*, NIST) (21, 33-34).

Danas su neki od njih već i komercijalno dostupni (HBV DNA (genotip A, 97/746); HIV-1 RNA (genotip B, 97/656)) (35,36), a njihova uporaba je predviđena i sastavni je dio smjernica Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *The Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD). Iako se područje molekularne dijagnostike brzo razvija, dostupnost standardiziranih nukleinsko-kiselinskih referentnih materijala potrebnih za validaciju različitih metodologija još je uvijek ograničena.

LITERATURA

1. Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. Harmonization of laboratory tests on the field of medical biochemistry. Croatian Chamber of Medical Biochemists. Croatian Society of Medical Biochemists [4 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.hkmb.hr/2005>. Datum pristupa informaciji 5. veljače 2011.
2. Wallace PS, Van Loon A. QCMD Improving Molecular Diagnostics through International Quality Control Programmes: Expansion of EU Quality Control Concerted Action Programme (EU-QCCA). *EQA news* 2005;16(3):33-48.
3. Steponavičiute D, Kučinskas V. External quality assessment schemes in molecular genetic testing. *EQA-PKU. Biologija* 2002; 3: 3-6.
4. Plebani M. Pre and Post Examination Aspects. 2004; [3 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol15no4/150412200404.htm>. Datum pristupa informaciji 1. veljače 2011.
5. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Parag G, Sikirica M, Perkov S, Juretić D. Analytical goal-setting in the external quality assessment for medical biochemical laboratories in the Republic of Croatia. *Biochem Med* 2005;1-2: 15-23.
6. Elles R, Ramsden S, Patton S, Stenhouse S, Barton D. Clinical molecular genetic testing – A total quality approach. *VAM Bulletin, Spring* 2002; 10-3.
7. Ibareta D, Elles R, Cassiman JJ, Rodriguez-Cerezo E, Dequeker E. Towards quality assurance and harmonization of genetic testing services in the European Union. *Nature* 2004; 10: 1230-5.
8. Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clin Chem* 1998; 44: 12-26.
9. Grody WW, Richards CS. Alternative approaches to Proficiency Testing in Molecular Genetics. *Clin Chem* 2003; 49: 717-18.
10. Pazzagli M. The EC4 EQUAL Project. *EQA News* 2004; [3 stranice]. Dostupno na URL adresi: http://www.egalm.org/EQAnews/EQAnews_May_030604&20maj%2004.pdf. Datum pristupa informaciji 5. veljače 2011.
11. Raggi CC, Pinzani P, Paradiso A, Pazzagli M, Orlando C. External quality assurance program for PCR amplification of genomic DNA: An Italian Experience. *Clin Chem* 2003; 49: 782-91.
12. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M i sur. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH-3936. *Leukemia* 2003; 17: 2257-317.

13. Braun A, Deufel T, Geilenkeuser WJ i sur. External quality assessment of molecular biology-based methods used in laboratories of clinical chemistry and human genetics. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 231-4.
14. Huber S i sur. *Methods in molecular medicine*. Humana Press 2000; 49: 439-50.
15. Coleman WB, Tsongalis GJ. Laboratory-developed test: Guidelines and Standards for Molecular Diagnostics testing. U. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Springer, 2006.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Handling, Transport and Storage of Specimens for Molecular Methods. Excerpt from Collection, Transport, Preparation and Storage of Specimens for Molecular Methods. Approved Guideline (MM13-A).
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS MM1-A Molecular Diagnostic Methods for Genetic Diseases.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS MM2-A Immunoglobulin and T-cell Receptor Gene Rearrangement Assay.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS MM3-A Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. NCCLS MM5-A Nucleic Acid Amplification Assays for Molecular Hematology.
21. Neumaier M, Braun A, Gessner R, Funke H. Experiences with external quality assessment (EQA) in molecular diagnostics in clinical laboratories in Germany. Working Group of the German Societies for Clinical Chemistry (DGKC) and Laboratory Medicine (DGLM). *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:161-3.
22. Orlando C, Verderio P, Maatman R i sur. EQAL-qual: A European Program for External Quality Assessment of Genomic DNA Extraction and PCR Amplification. *Clin Chem* 2007; 53: 1349-57.
23. Sertić J. Molecular diagnostics: Quality assurance program in genotyping. A Croatian experience. *Biochem Med* 2004; 3-4: 95-100.
24. Bobetić-Vranić T, Šiftar Z, Flegar-Meštrić Z. Frequency of Bcr/Abl p210 molecular isoforms in chronic myeloid leukemia and its clinical significance. *Biochem Med* 2006; 16(Supl.1): 6-7.
25. Eurachem Proficiency Testing Working Group. Survey on the Accreditation of EQA Scheme. *EuraChem/EQALM report 2005*; [5 stranica]. Dostupno na URL adresi: <http://www.eqalm.org/Eurachem%20EQALM%20report%20EQAS%20accreditation%20survey%202005.pdf>. Datum pristupa informaciji 1. veljače 2011.
26. British Society of Human Genetics; [4 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.emqn.org>. Datum pristupanja informaciji 1. veljače 2011.
27. OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing; [6 stranica]. Dostupno na URL adresi: <http://www.eurogentest.org/web/files/public/QAGuidelineseng.pdf>. Datum pristupanja informaciji 24. veljače 2011.
28. Neumaier M. European quality assessment networks in molecular diagnostics; [3 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.ifcc.org/ejifcc>. Datum pristupanja informaciji 18. Siječnja 2011.
29. European Molecular Genetics Quality Network (EMQN); [7 stranica]. Dostupno na URL adresi: <http://www.emqn.org>. Datum pristupanja informaciji 20. veljače 2011.
30. United Kingdom National External Quality Assessment Schemes for Leucocyte Immunophenotyping (UK NEQAS); [4 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.ukneqasli.org>. Datum pristupanja informaciji 15. veljače 2011.
31. Ramsden SC, Daly S, Geilenkeuser WJ i sur. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. *Clin Chem* 2006; 52: 1584-9.
32. Ahmad-Nejad P, Dorn-Beineke A, Pfeffer U i sur. Methodologic European external quality assurance for DNA sequencing: the EQUALseq program. *Clin Chem* 2006; 52: 716-27.
33. The EuroGentest NoE (Network of Excellence). Meeting Notes; [2 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.eurogentest.org/web/info/public/unit1/eqa>. Datum pristupanja informaciji 21. veljače 2011.
34. Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics; [3 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.spidia.eu>. Datum pristupanja informaciji 21. veljače 2011.
35. National Institute of Standards and Technology; [3 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://ts.nist.gov>. Datum pristupanja informaciji 2. veljače 2011.
36. National Biological Standards Board; [5 stranica]. Dostupno na URL adresi: <http://www.nibsc.ac.uk/products/directorylist.asp>. Datum pristupanja informaciji 2. veljače 2011.

S U M M A R Y

SIGNIFICANCE OF PARTICIPATION IN PROGRAMS OF EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT IN MOLECULAR DIAGNOSTIC – OUR EXPERIENCE

M. M. KARDUM PARO¹, Z. ŠIFTAR¹, D. JURETIĆ² and Z. FLEGAR-MEŠTRIC^{1,2}

¹*Merkur University Hospital, Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*
and ²*University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia*

Harmonization of molecular diagnostic tests in laboratories in the Republic of Croatia has only just started. According to laboratory accreditation standard ISO 15189 participation in external quality assessment (EQA) schemes or programs is a prerequisite and support tool for clinical laboratory accreditation process. As there are no national quality assurance schemes yet, an European external quality assessment (EQA) scheme or program should be found. Because of variation in the molecular diagnostic test performance of clinical laboratories across Europe, EQA is recognized as a system whereby a set of reagents and techniques are assessed by an external provider making inter-laboratory performance comparability possible through already integrated recommendations and practice guidelines of molecular diagnostic test performance. Today, wide range of various EQA schemes and programs already in action have been available and most of them began within the last ten years. This paper is therefore intended to present and summarize the four-year EQA activities in the Institute of Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, in three different international EQA schemes: United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS), the European Molecular Genetic Quality Network (EMQN) and Multi-National External Quality Assay program (EQUAL- qual) and to point out their educational role in standardization of laboratory performance of any test intended for patient testing. from a laboratory point of view.

Key words: external quality assessment (EQA), standardization and harmonization in molecular diagnostic

NEZADOVOLJAVAJUĆI UZORCI I NJIHOVA UČESTALOST U CERVIKOVAGINALNIM RAZMAZIMA

LJILJANA GAVRANOVIĆ, SANJA RAKEK NOVAK i INES KRIVAK BOLANČA

*Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku,
Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku, Zagreb, Hrvatska*

Prema definiciji, neadekvatan Papa razmaz je onaj kod kojeg je detekcija cervikalne epitelne abnormalnosti onemogućena i nesigurna. Iz tog razloga dolazi do smanjene detekcije intraepitelnih lezija pa su moguće i lažno negativne dijagnoze. Svrha rada bila je određivanje učestalosti i razloga nezadovoljavajućih uzoraka cervikovaginalnih razmaza tijekom godine dana, kada je izdvojeno 12 424 konvencionalno uzetih uzoraka cerviksa. Razmazi su analizirani s obzirom na njihovu adekvatnost. Izdvojeni su oni razmazi kod kojih nije bilo moguće procijeniti abnormalnost stanica zbog neadekvatnosti uzorka. Nakon 6 mjeseci ili nakon provedene terapije u ponovljenim razmazima ponovno je analizirana adekvatnost i postojanje abnormalnosti. Od izdvojenih 1 594 (12,8%) uzoraka koji su prvotno bili ocijenjeni kao zadovoljavajući s ograničenjem, citološka dijagnoza je postavljena u 92% uzoraka, dok 8% uzoraka nije bilo moguće analizirati. Neadekvatan pribor, oskudan materijal za citološku analizu te loša tehnička priprema mogu dovesti do previda abnormalnosti i pogrešaka u mikroskopskoj analizi. To znači da je svaki član tima odgovoran za adekvatnost uzoraka i točnost rezultata. Redovitom unutarnjom kontrolom, nadzorom nad kvalitetom rada te trajnom izobrazbom svakog pojedinca u timu moguće je reducirati neadekvatne uzorke a time i troškove zdravstvene zaštite.

Ključne riječi: Papa test, nezadovoljavajući uzorci, uzroci

Adresa za dopisivanje: Ljiljana Gavranović
Jedinica za ginekološku citologiju
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 22 53 420
E-pošta: ljiljana.gavranovic@zg.t-com.hr

UVOD

Prema definiciji, neadekvatan Papa razmaz je onaj kod kojeg je detekcija cervikalne epitelne abnormalnosti onemogućena i nesigurna. Iz tog razloga dolazi do smanjene detekcije intraepitelnih lezija blažeg i težeg stupnja a moguće su i lažno negativne dijagnoze. Adekvatan nalaz konvencionalnog Papa testa bio je definiran prisustvom najmanje 10% dobro sačuvanih i vidljivih pločastih stanica pogodnih za citološku analizu. Do 90-tih godina prošlog stoljeća nije bilo objektivne definicije i mjerljivih kriterija za jednoznačno određivanje adekvatnosti uzorka. Određivanje adekvatnosti uzorka za citološku analizu je svoju punu afirma-

ciju dobilo uvođenjem klasifikacije Bethesda 2001. g. (1,2).

Primjerenost uzorka u procjeni nalaza je bitna jer upozorava ginekologa na ograničenost nalaza, na njegovu moguću pogrešku kao i na potrebu ponavljanja pretrage kako bi se dobilo što točniji nalaz. Svrha našeg rada bila je određivanje učestalosti i razloga nezadovoljavajućih uzoraka cervikovaginalnih razmaza tijekom godine. Uzorci su podijeljeni u kategorije zadovoljavajućih i nezadovoljavajućih po preporuci klasifikacije Bethesda (BC 2001) i modifikacije klasifikacije Zagreb 2002. (3) koja nudi standardizirani pristup procjeni adekvatnosti materijala.

MATERIJAL I METODE

Po preporuci, klasifikacija, primjerenost uzorka podijeljena je u kategorije: zadovoljava za analizu, zadovoljava za analizu s ograničenjem (nastaje zbog razlike u procjeni adekvatnog minimuma celularnosti) i nezadovoljava za analizu. Analizirali smo sve konvencionalno uzete cervikalne uzorke obrađene u našem Odsjeku tijekom jedne godine. Ukupno je bilo 12.424 uzoraka koje smo analizirali u odnosu na njihovu adekvatnost. Odvojili smo ukupno 1.594 VCE razmaza (vagina, cerviks, endocerviks), koji su ocijenjeni nezadovoljavajućim za analizu ili zadovoljavajućim s ograničenjem. Unutar skupine nezadovoljavajućih uzoraka izdvojili smo 127 razmaza kod kojih nije bilo moguće postaviti citološku dijagnozu. U tih su pacijentica ponovno uzeti VCE razmazi odmah ili nakon provedene terapije i analizirana je adekvatnost uzorka te procjena postojanja promjena na stanicama.

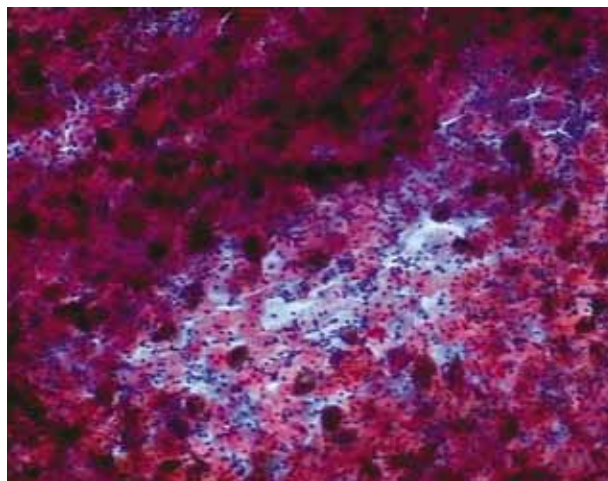
Razmaz na kojem su nađene atipične (diskariotične) stanice, bez obzira na njihovu brojnost, proglašen je i tretiran kao adekvatan za analizu.

REZULTATI

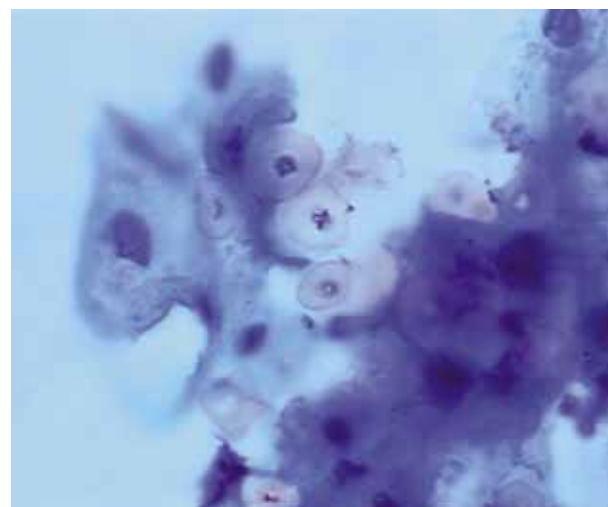
Od ukupnog broja obrađenih uzoraka, 12,8% (1.594/12.242) uzoraka je bilo ocijenjeno kao nezadovoljavajuće za interpretaciju ili zadovoljavajuće za interpretaciju s ograničenjem. Od tih uzoraka, u 1.467 (92%) pacijentica je postavljena citološka dijagnoza, a u 127 (8%) VCE razmaza nije bilo moguće procijeniti postojanje abnormalnosti stanica pa su te pacijentice pozvane na kontrolno uzimanje razmaza.

Uvidom u kontrolne razmaze pacijentica u kojih nije bilo moguće postaviti citološku dijagnozu dokazano je postojanje abnormalnosti stanica u 30 (1,8%) od čega su bila dva slučaja srednje displazije (0,1%). U 97 pacijentica nalaz je očitao urednim nakon provedene terapije ili dobro uzetog razmaza.

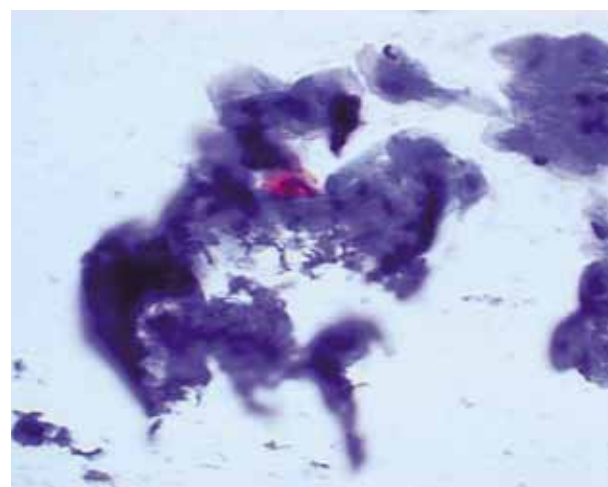
Najčešći razlozi neadekvatnog uzorka je nedostatak endocervikalnog epitela (61,54%), gustoća razmaza (sl. 1) i prekrivanje stanica brojnim upalnim elementima i eritrocitima (20,63%), a ostalih 17,82% uzoraka (284 od 1.594) čine neprimjereni uzorci zbog prisustva stranog materijala (sl. 2), slabe fiksacije stanica ili loše obojenih preparata (sl. 3).



Sl. 1. Gusti razmaz, neadekvatan za analizu



Sl. 2. Kristali vaginaleta koji ometaju analizu



Sl. 3. Nefiltrirani hematoksilin ometa analizu

RASPRAVA

Najčešći uzroci neprimjerenosti uzoraka su oskudnost stanica, razmazi razvučeni u više razina, prekrivenost eritrocitima i leukocitima te nedostatak endocervikalnih cilindričnih stanica (4). Prisustvo endocervikalnih cilindričnih stanica i stanica metaplazije je dokaz da je uzorak pravilno uzet, odnosno da su u uzorku prisutni elementi skvamokolumnarne granice i endocervikalnog kanala. Obrisci uzoraka koje procjenjujemo zadovoljavajućim moraju biti uzeti s adekvatnog anatomskeg mjesta, s dovoljnim brojem stanica, dobro fiksirani i dobro obojani.

U našim rezultatima najčešće je razlog proglašenja razmaza nezadovoljavajućim bila odsutnost endocervikalnih stanica. Nedostatak endocervikalnih cilindričnih stanica, a posebno stanica metaplastičnog epitela sa zone transformacije dovode do mogućnosti lažno negativnog rezultata pretrage jer uzorak tada nije reprezentativan za anatomske mjesto.

U razmazu koji nije dobro uzet stanice mogu biti oštećene ili nanese u debelom sloju. U našem je istraživanju bilo nemoguće procijeniti abnormalnost zbog prekrivanja stanica bilo upalnim elementima bilo krvlju u 20,6% uzoraka. Naime, prije uzimanja razmaza potrebno je vatom obrisati vrat maternice da bi se uklonio sloj odljuštenih, mrtvih stanica i višak sluzi. Isto tako, prilikom nanošenja materijala na staklo mora se paziti kako se stanice prenose na stakalce da se ne bi oštetile i da se nanese u tankom sloju. Stanice koje su nanese u debelom sloju loše se fiksiraju pa je i obojenost preparata slaba. Ako razmaz nije dobro fiksiran, stanice se ne mogu dobro obojati. Sasušene stanice ne prime dobro boju i takav se razmaz ne može očitati.

Predugo bojanje hematoksilinom dovodi do intenzivnije obojenosti jezgara, što uzrokuje hiperkromaziju jezgara. Kromatin je taman, loša je vizualizacija distribucije kromatina te je moguće takav razmaz ocijeniti abnormalnim. Neprofiltrirana boja hematoksilin također može otežavati kvalitetnu analizu preparata. Prejaka obojenost citoplazmatskim bojama OG i EA također može otežavati dobru analizu preparata.

Prilikom uklapanja preparata mora se paziti da se

uklopi sav nanese materijal. U našem laboratoriju kod uklapanja preparata Kanada balzomom koristimo metodu zagrijavanja na porculanskoj ploči i laganoj temperaturi. Nakon zagrijavanja, kada se istisne suvišak balzama, preparati se čiste u ksilolu te su takvi znatno trajniji, čistiji, bez mjehurića zraka ispod pokrovnica pa se lakše analiziraju. Međutim, ako je staklo prejako zagrijano, stanice se mogu oštetiti pa na njima uočavamo tamni pigment koji može prekriti jezgru i onemogućiti analizu. Pregrijana stakla mogu dati sličnu sliku kao i preparati koji su loše fiksirani.

Neki kristali imaju izgled sitne prašine koja neiskusnom oku može imati izgled poput bakterija. U našem istraživanju ostaci nekih lijekova, u prvom redu vaginaleta, bili su jedan od razloga nemogućnosti procjene adekvatnosti.

Nakon uvođenja klasifikacije Bethesda točnost dijagnoze je narasla, velikim dijelom zbog adekvatnosti uzorka (5). Neadekvatni uzorci, prema literaturi su se zadržali između 3,8 - 5,9% (5-7). Naše istraživanje je pokazalo 12,8% nezadovoljavajućih uzoraka i ponešto se razlikuje u usporedbi s drugim istraživanjima. Reynolds i sur. su pokazali u svom istraživanju veliki pad postotaka neadekvatnih uzoraka uzetih „split“ metodom u odnosu na preparate pripremljene metodom jednog sloja stanica (LBC) (6). Najčešći uzrok neadekvatnih uzoraka u našem istraživanju bio je nedostatak stanica sa zone transformacije i odsutnost endocervikalnih cilindričnih stanica. Razlog leži u tome što se striktno držimo preporuke da na četiri ili više vidnih polja pod povećanjem od 100 x ima najmanje 10 stanica bilo pločastih bilo cilindričnih, odnosno na četiri vidna polja pri povećanju od 400x ima najmanje pet stanica.

Kada se primijene takvi striktni kriteriji u našem istraživanju ima naizgled dosta neadekvatnih uzoraka. Day i sur. su pokazali da su uzorci adekvatniji ako se endocervikalni razmaz uzima adekvatnim priborom te preporučuju korištenje četkice „broom type“ (7). To je četkica koja istodobno uzima elemente ekto i endocerviksa. Nedostatak endocervikalnih cilindričnih stanica kao uzrok neadekvatnosti razmaza predstavlja svojevrsnu kontroverzu. Naime, dio istraživača je dokazao da nema statistički značajne razlike u detekciji težih displastičnih promjena kod razmaza koji sadrže endocervi-

kalne stanice i onih kod kojih endocervikalni dio razmaza nedostaje (8,9). Na drugoj se strani naglašava potreba postojanja endocervikalnih stanica u VCE razmazima što se i uvodi u postupnike za cervikalnu citologiju te se izoštravaju kriteriji adekvatnosti (4,10-12). Ako u anamnezi pacijentice postoji podatak o atipičnom citološkom nalazu, onda je postojanje endocervikalnog epitela neophodno (11). Nakon provedene terapije i pravilno uzetih razmaza u 1,8% naših uzoraka je pronađena atipija na stanicama upravo u dijelu endocervikalnog kanala. Nađeni slučajevi teže displazije znače da je prvotni, neprimjereni citološki nalaz bio zapravo lažno negativan, što su i drugi istraživači uočili i dokazali (12).

Neadekvatan pribor, oskudan materijal za citološku analizu te loša tehnička priprema mogu dovesti do previda abnormalnosti i pogrešaka u mikroskopskoj analizi. To znači da na svakom članu tima leži odgovornost za točnost rezultata, ali i za adekvatnost uzorka. Smanjenje broja navedenih uzroka je moguće ako se provodi redovita unutarnja kontrola, nadzor nad kvalitetom rada kao i trajna izobrazba svakoga u timu. Zbog potrebe za ponavljanjem razmaza, rastu troškovi zdravstvene zaštite bez identifikacije značajnijeg broja epitelnih abnormalnosti, jer su neadekvatni uzorci najčešći razlog lažno negativnog citološkog nalaza.

L I T E R A T U R A

1. Kurman RJ, Solomon D. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. New York: Springer-Verlag, 1994.
2. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A. The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. JAMA 2002; 287: 2114-9.
3. Ovanin-Rakić A, Pajtler M, Stanković T i sur. Klasifikacija citoloških nalaza vrata maternice „Zagreb 2002“. Modifikacija klasifikacija „Zagreb 1990“ i „NCI Bethesda system 2001“. Gynaecol Perinatol 2003; 12: 148-53.
4. McGoogan E, Colgan TJ, Ramzy I, Cochand-Priollet B, Davey DD. Cell preparation methods and criteria for sample adequacy. International Academy of Cytology task force summary. Diagnostic cytology towards the 21st century: An international expert conference and tutorial. Acta Cytol 1998; 42: 25-32.
5. Islam S, West AM, Saboorian MH, Ashfaq R. Re-processing unsatisfactory ThinPrep Papanicolaou test specimens increases sample adequacy and detection of significant cervicovaginal lesions. Cancer 2004; 102: 67-73.
6. Reynolds TA, Kay EW, Leader M, Grace A. Has the Thin Prep method of cervical screening maintained its improvement over conventional smears in terms of specimen adequacy. Diagn Cytopathol 2009; 37: 239-40.
7. Day SJ, Deszo EL, Freund GG. Dual sampling of the endocervix and its impact on AutoCyte Prep endocervical adequacy. Am J Clin Pathol 2002; 118: 41-6.
8. Selvaggi SM, Guidos BJ. Endocervical component: is it a determinant of specimen adequacy? Diagn Cytopathol 2002; 26: 53-5.
9. Pajtler M, Audy-Jurković S. Pap smear adequacy: is the assessing criterion including endocervical cells really valid? Coll Antropol 2002; 26: 565-70.
10. van Kemenade FJ, Wiersma T, Helmerhorst TJ. New version of the pathology practice guideline for cervical cytology: sharpened criteria for adequacy; expanded use of new techniques. Ned Tijdschr Geneesk 2007; 151: 1283-6.
11. Sheffield MV, Simsir A, Talley L, Roberson AJ, Elgert PA, Chhieng DC. Interobserver variability in assessing adequacy of the squamous component in conventional cervicovaginal smears. Am J Clin Pathol 2003; 119: 367-73.
12. Zuna RE, Sienko A, Lightfoot S, Gaiser M. Cervical smears interpretations in women with a histologic diagnosis of severe dysplasia. Factors associated with discrepant interpretations. Cancer 2002; 96: 218-24.

S U M M A R Y

CAUSES AND FREQUENCY OF UNSATISFACTORY CERVICOVAGINAL SMEARS

LJ. GAVRANOVIĆ, S. RAKEK NOVAK and I. KRIVAK BOLANČA

*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics,
Division of Gynaecological Cytology and Cytogenetics, Zagreb, Croatia*

Inadequate Pap smear by definition is a specimen in which detection of cervical epithelial abnormality is impossible or uncertain. This causes poorer detection of intraepithelial lesions of a mild and more severe grade, including the possible false-negative diagnosis. Sample adequacy is most crucial in the evaluation of the finding, alerting the gynecologist to the limitations of the finding, its possible inaccuracy, and need to repeat the examination in order to obtain as precise results as possible. The aim of the study was to establish the frequency and reasons of unsatisfactory cervicovaginal smear samples in the course of one year, during which 1594 of 12,242 conventionally obtained cervical samples were sorted out as inadequate. These were reassessed with respect to their adequacy. Eight percent of the smears in which the evaluation of cell abnormality failed due to sample inadequacy were identified and these smears were repeated and analyzed for adequacy and presence of abnormality. The most common reasons included insufficient endocervical epithelial cells, excessive smear thickness, cells obscured with numerous inflammatory elements and erythrocytes, and sample inadequacy due to the presence of foreign material, poor fixation or staining. Inadequate equipment, insufficient material for cytologic analysis, and poor preparation technique may lead to failure to observe abnormality and errors in microscopic analysis. This implies each team member's responsibility for the accuracy of the result as well for the assurance of specimen adequacy. Reduction in the frequency of the reasons mentioned above is possible if internal control, performance quality monitoring and continuing education of each team member are conducted on a regular basis. The necessity to repeat sampling adds to the cost of health care with no considerable increase in the detection rate of epithelial abnormalities, inadequate specimens being the most common cause of false-negative cytologic findings.

Key words: Pap test, unsatisfactory samples, causes

PODRIJETLO ERITROCITA U URINU ODREĐIVANO SVJETLOSNI MİKROSKOPOM KOD BOLESNIKA S KARCINOMOM MOKRAĆNOG MJEHURA

GORDANA KNEŽEVIĆ¹, KATARINA PARIGROS¹, BISERKA KRIŽAJ¹, VERONIKA ANIĆ¹,
MARINA PAŽUR¹, BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ¹, DUNJA ŠUŠTERČIĆ¹ i IKA KARDUM-SKELIN^{1,2}

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

²Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Prisustvo 80% i više dismorfičnih eritrocita upućuje na krvarenje iz glomerula bubrega, dok 80% i više glatkih eritrocita u urinu upućuje na krvarenje iz donjeg dijela urinarnog trakta. U uzorcima urina bez mogućnosti detektiranja podrijetla eritrocita nalazi se mješavina (između 20-80%) i dismorfičnih i glatkih eritrocita. Svrha rada je bila odrediti podrijetlo eritrocita u uzorcima urina s prisustvom malignih stanica urotela. Svježi sedimenti urina nativno su kontrastno obojeni s 0.1% otopinom safranina i mikroskopski analizirani pod povećanjem 400x. Obradom su obuhvaćena 72 pacijenata s prisutnim malignim stanicama u urinu. Podrijetlo eritrocita određeno je u 25 pacijenata (9 žena, 16 muškaraca) u 90 uzoraka (prosječno 3-4 uzorka po bolesniku). U 26 (28,8%) uzoraka nije bilo nedovoljno eritrocita za odrediti podrijetlo, u 33 (36,9%) uzoraka bili su prisutni dismorfični i glatki eritrociti, 25 (27,9%) uzorka sadržavalo je dismorfične, a 6 (6,3%) uzorka glatke eritrocite. Nije bilo specifične povezanosti između nalaza malignih stanica u urinu i podrijetla eritrocita. Međutim, prisutnost hematurije može upozoriti, iako nije siguran pokazatelj maligne ili bubrežne bolesti.

Ključne riječi: maligne stanice u urinu, dismorfični eritrociti, glatki eritrociti

Adresa za dopisivanje: Gordana Knežević
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
KB Merkur
Zajčeva 19
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: gorkne@gmail.com

UVOD

Citološka analiza urina te određivanje podrijetla eritrocita kao neinvazivna metoda koja uključuje jednostavno dobivanje uzoraka, općenito je prihvaćena kao dijagnostički postupak. Ima visoku osjetljivost za detekciju malignih tumora, atipija i displazija urotela (1). Citološka analiza urina nije rutinska metoda poput analize nativnog sedimenta urina, ali se smatra pouzdanom metodom u dijagnosticiranju benignih i malignih bolesti urinarnog trakta, kod detekcije ranih znakova odbacivanja transplantiranih bubrega te za praćenje bolesnika s ranije dijagnosticiranim i liječenim tumorima urotakta (1,2). Hematurija podrazumijeva prisutnost

krvi u urinu. Hematurija može biti uzrokovana infekcijama, upalnim bolestima, kamencima, traumom, hematološkim poremećajima, povećanjem prostate i tumorima (1,3). Hematurija je često prvi simptom bubrežnog adenokarcinoma ili karcinoma urotela, iako sama prisutnost krvi u urinu nije siguran pokazatelj maligne ili bubrežne bolesti (1,4). Nakon isključenja malignog procesa, određivanje podrijetla eritrocita pomaže nam u odvajanju glomerularnoga od neglomerularnoga krvarenja (1,5-7). Prisustvo 80% i više dismorfičnih eritrocita upućuje na krvarenje iz gornjeg, dok 80% i više glatkih eritrocita u urinu upućuje na krvarenje iz donjeg dijela urinarnog trakta. U uzorcima urina bez značajnog podrijetla eritrocita bilo je prisutno

od 20-80% dismorfičnih i glatkih eritrocita (1). Svrha rada bila je odrediti podrijetlo eritrocita u uzorcima urina s prisustvom malignih stanica urotela.

BOLESNICI I METODE

Radom su obuhvaćena 72 pacijenta s prisutnim malignim stanicama u urinu. U svih je učinjena citološka analiza u tri navrata odnosno analizirano je citološki 216 uzoraka urina. Podrijetlo eritrocita se u bolesnika kod kojih je bila poznata dijagnoza malignog tumora kanalnog sustava urotakta nije određivalo rutinski. Stoga je podrijetlo eritrocita određeno u 25 pacijenata s nepoznatim uzrokom prisustva eritrocita u urinu, a naknadno su u njih citološkom analizom nađene maligne stanice prelaznog epitela. Podrijetlo eritrocita ispitano je u 90 uzoraka urina tih bolesnika.

Za citološku analizu korišteni su svježi, ne prvi jutarnji uzorci urina, dobiveni tijekom tri dana. Uzorci su obrađeni u citocentrifugi na 600 okretaja 5 minuta. Preparati su osušeni na zraku te obojani metodama po metodama May-Grünwald Giemsa (MGG) i Papanicolaou.

Uzorci urina za određivanje podrijetla eritrocita obrađivani su u običnoj centrifugi na 1500 okretaja 5 minuta. Nakon odlijevanja supernatanta, sediment je nativno kontrastno obojen s 0,1% otopinom safranina te je učinjena mikroskopska analiza pod povećanjem 400×. Korištena je kvantitativna analiza, uz određivanje postotka glatkih i dismorfičnih eritrocita.

Ako je postotak dismorfičnih eritrocita bio viši od 80%, uzorci su svrstavani u kategoriju s dismorfičnim eritrocitima. U obrnutom slučaju, s više od 80% glatkih, radilo se o uzorcima s glatkim eritrocitima. Ako postotak niti glatkih niti dismorfičnih nije prelazio 80%, uzorci su smatrani miješanim. Ako se u sedimentu nije uspjelo izbrojati 100 eritrocita, uzorak je svrstan u kategoriju „nedovoljan broj eritrocita“ za određivanje podrijetla eritrocita u urinu.

REZULTATI

Citološki su nađene maligne stanice prelaznog epitela u svih 90 uzorka urina u 25 bolesnika (9 ženskih, 16 muških). Bolesnici su bili u dobi od 45 do 89 (medijan 55) godina. Od 90 uzoraka, u 64 (71%) bila je prisutna krv u mokraći s dovoljno eritrocita da se u sedimentu moglo odrediti postotak glatkih i/ili dismorfičnih eritrocita, dok je u 26 (29%) uzoraka broj eritrocita bio nedostatan za određivanje podrijetla odnosno radilo se o mikrohematuriji.

Određivanjem podrijetla eritrocita u slučajevima kad je broj eritrocita bio dostatan, u 33 (36,9%) uzorka nađena je miješana populacija i dismorfičnih i glatkih eritrocita (i glatkih i dismorfičnih manje od 80%). Bez obzira što se radilo o miješanoj populaciji, ipak je bila veća zastupljenost glatkih eritrocita (prosječno 66%), a znatno manje (34%) dismorfičnih eritrocita. Više od 80% dismorfičnih eritrocita bilo je u 25 (27,9%) uzoraka (prosječno 82%), dok je 6 (6,3%) uzoraka sadržavalo više od 80% glatkih eritrocita (prosječno 93%) (tablica 1).

U svih je bolesnika potvrđena citološka dijagnoza malignog tumora kanalnog sustava urotakta cistoskopijom i patohistološkom analizom bioptičkog uzorka uzetog pri cistoskopiji.

Tablica 1.

Demografske karakteristike i rezultati određivanja podrijetla eritrocita u urinu svjetlosnim mikroskopom u bolesnika s malignim tumorom urotela

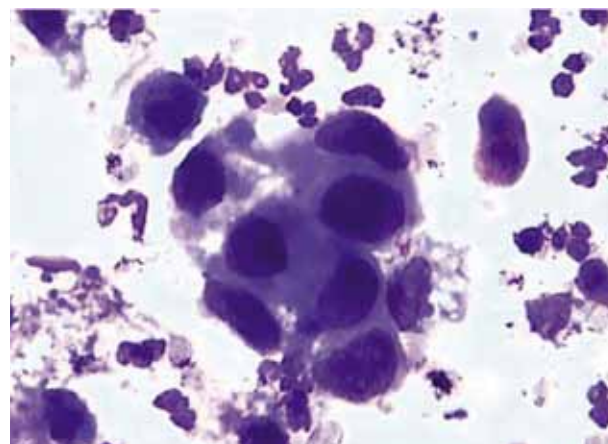
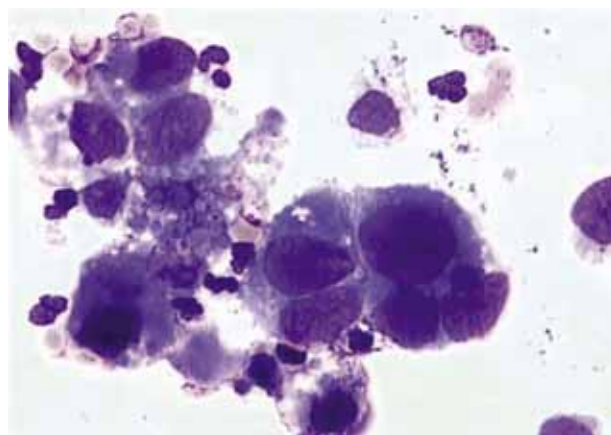
Parametri	Vrijednosti
Broj bolesnika	25
Dob Raspon Medijan	45-89 55
Spol Muškarci Žene	9 16
Broj uzoraka urina u kojim je određivano podrijetlo eritrocita	90
Broj uzoraka s dostatnim brojem eritrocita za određivanje podrijetla eritrocita	64
Broj uzoraka s miješanom populacijom glatkih i dismorfičnih eritrocita	33
Broj uzoraka s >80% dismorfičnih eritrocita	25
Broj uzoraka s <80% glatkih eritrocita	6

Nije nađena specifična povezanost između nalaza malignih stanica u urinu i podrijetla eritrocita.

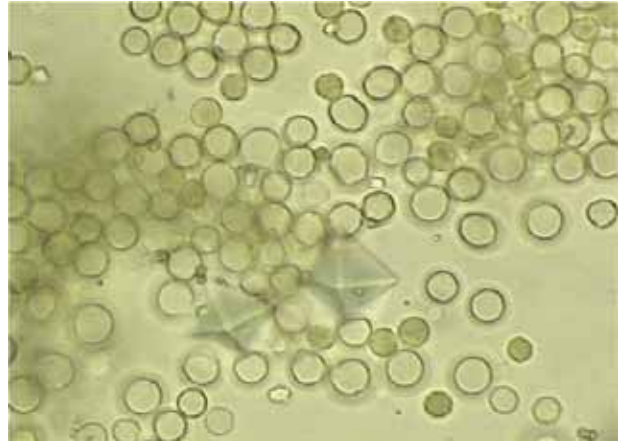
RASPRAVA

Citološka analiza urina kao neinvazivna metoda koja uključuje brzo i jednostavno dobivanje uzorka prihvatljiva je i za pacijente i za liječnike. Brojne su indikacije za citološku analizu urina. Koristi se kao metoda probira kod visoko rizične populacije (osobe izložene kemijskim karcinogenima kao što su anilinske boje i teški metali). Inicijalna je dijagnostička metoda u pacijenata s hematurijom kako bi se isključile maligne, ali i ostale bolesti mokraćnog sustava. Neizostavna je metoda u dijagnostičkoj obradi simptomatskih bolesnika (s disurijom i polakisurijom nejasnog uzroka, kroničnim upalima urotakta) te praćenju bolesnika s ranije dijagnosticiranim karcinomom mokraćnih putova. Važna je metoda u detekciji upala i infekcija posebno u pacijenata s transplantiranim bubregom radi detekcije ranih znakova odbacivanja bubrega (1,8). Točnost citološke analize osim o educiranosti i iskustvu citologa ovisi i o ispravnom uzimanju te adekvatnoj tehničkoj pripremi i obradi uzorka. Za analizu se najčešće koristi spontano izmokrena mokraća. Prvi jutarnji uzorak urina nije prikladan za citološku analizu jer tijekom noći dolazi do propadanja stanica što otežava morfološku analizu. Pacijentu se daju detaljne upute o načinu davanja urina. Nakon ustajanja i pražnjenja prve jutarnje mokraće pacijent treba oprati spolovilo kako bi se

izbjegla kontaminacija pločastim stanicama te u ustanovi dati svježe izmokreni srednji mlaz drugog jutarnjeg urina. Preporuča se trodnevna analiza, jer se time povećava osjetljivost metode (1,8). Najčešći tumori mokraćnog sustava su tumori mokraćnog mjehura koji se nalaze na petom mjestu incidencije malignih tumora kod muškaraca. Javljaju se 3 puta češće u muškaraca nego u žena, a većina je bolesnika u dobnoj skupini od 50 do 80 godina (9). Kao najvažniji rizični čimbenik u razvoju tumora mokraćnog mjehura izdvaja se pušenje cigareta. Značajnu ulogu u epidemiologiji tumora mokraćnog mjehura imaju i industrijske kemikalije, shistosomijaza, kemoterapija citostaticima te radioterapija (9,10). Veliku većinu tumora mokraćnog mjehura čine maligni tumori (oko 95%) koji se dijele u dvije skupine, znatno češće karcinome te izrazito rijetke sarkome. Makroskopski se karcinomi mogu podijeliti u papilarne i ravne tvorbe. U papilarne tumore koji su mnogo češći ubrajamo papilarnu neoplazmu niskog malignog potencijala, papilarni karcinom niskog stupnja te papilarni karcinom visokog stupnja. Ravni karcinomi obuhvaćaju karcinom *in situ*, invazivni urotelni karcinom, planocelularni karcinom te adenokarcinom (9, 10). Citološka kvalifikacija tumora prijelaznog epitela zasniva se na polimorfizmu i atipijama tumorskih stanica. Bergkvistova podjela iz 1965. godine koja se još uvijek koristi, razlikuje 5 stupnjeva: 0. i I. stupanj predstavljaju benigne tumore prijelaznog epitela, II., III. i IV. stupanj dobro, srednje i slabo diferencirane karcinome prijelaznog epitela (1,11). Citološka analiza je vrlo specifična metoda u identifikaciji malignih stanica (sl. 1) u mokraći, dok joj osjetljivost



Sl. 1. Maligne stanice prelaznog epitela u sedimentu urina, MGG x1000



Sl. 2. Određivanje podrijetla eritrocita u urinu svjetlosnim mikroskopom: a) dismorični i b) glatki eritrociti u sedimentu urina

ovisi o stupnju invazivnosti tumora. Osjetljivost za tumore visokog stupnja i karcinom *in situ* je visoka (80-90%), ali osjetljivost je znatno niža (20-50%) za neoplazme niskog gradusa (3,8,10,12). Morfologija eritrocita ukazuje nam na glomerularno (dismorfični) (sl. 2a) ili neglomerularno (glatki) (sl. 2b) podrijetlo eritrocita. Prilikom prolaza kroz oštećenu membranu glomerula dolazi do oštećenja eritrocita (dismorfični eritrociti) koji mogu poprimiti izgled poput anulocita, target stanice ili mogu sadržavati pupoljak. Prilikom krvarenja iz drugih dijelova urinarnog trakta ne dolazi do oštećenja eritrocita (glatki eritrociti). Važno je da uzorak bude svjež i brzo tehnički obrađen jer stajanjem stanice propadaju, a time i prisutni eritrociti u urinu gube svoj glatki oblik te ih se može krivo interpretirati; 80% i više dismorfčnih eritrocita upućuje na krvarenje iz gornjeg dijela urinarnog trakta, dok 80% i više glatkih eritrocita (neoštećenih kontura) upućuje na krvarenje iz donjeg dijela urinarnog trakta (1).

U našem su radu u analizu bila uključena 72 bolesnika s prisutnim malignim stanicama u urinu. Postupak nativnog analiziranja podrijetla eritrocita i citološke analize stanica u urinu je različit. Podrijetlo eritrocita se utvrđuje neposredno nakon uzimanja urina, a citološka analiza nakon pripreme sedimenta i bojenja. U 25 bolesnika određivano je neposredno pri uzimanju i podrijetlo eritrocita u urinu, budući da ranijim pretragama nije nađen uzrok prisustva eritrocita u urinu, a maligne stanice nađene su naknadno u citološkim uzorcima. Maligni su tumori često udruženi s tumorskom

dijatezom, uključujući i različiti stupanj hematurije. U našem je radu znatan dio uzoraka imao mikroskopsku, odnosno mikrohematuriju s malim postotkom eritrocita, nedovoljnim za određivanje omjera glatkih i dismorfčnih eritrocita. Za očekivati je bilo da većina uzoraka ima glatke eritrocite, jer su tumori urotela locirani neglomerularno. U našem radu najmanji postotak uzoraka imao je posve glatke eritrocite (6 uzoraka). Većina je imala miješanu populaciju, iako je u tako miješanoj slici bila dominacija glatkih eritrocita. Odgovor možda leži u tome što je tumorska geneza karakterizirana krvarenjem koje je profuzno, polagano i dugo traje, te eritrociti u takvom okruženju mijenjaju svoju morfologiju, dijelom i zbog dugotrajnog stajanja u urinu, koji nije izotonična otopina. Drugi razlog je i manja osjetljivost svjetlosnog mikroskopa za razliku od fazono kontrastnog mikroskopa (5,6) gdje se protruzije eritrocita bolje uočavaju u odnosu na artefakte i degenerativne promjene eritrocita nastale zbog drugih utjecaja okoline.

ZAKLJUČAK

Analiza podrijetla eritrocita na osnovi morfologije može biti od koristi u odvajanju glomerularnoga i neglomerularnog krvarenja, ali nema specifične povezanosti između nalaza malignih stanica u urinu i podrijetla eritrocita. Prisutnost hematurije može upozoriti, iako nije siguran pokazatelj maligne ili bubrežne bolesti.

L I T E R A T U R A

1. Kardum-Skelin I. Citologija mokraće. u: Flegar-Meštrić Z, Kliničko-biokemijska korelacija rezultata kvalitativne analize mokraće. Zagreb: Medicinska naklada, 2004, 81-106.
2. Sharma S, Ksheersagar P, Sharma P. Diagnosis and treatment of bladder cancer. *Am Fam Physician* 2009; 80(Suppl. 7): 717-23.
3. Nakamura K, Kasraeian A, Iczkowski KA i sur. Utility of serial urinary cytology in the initial evaluation of the patient with microscopic hematuria. *BMC Urol* 2009; 9: 12.
4. Trivedi D, Messing EM. Commentary: the role of cytologic analysis of voided urine in the work-up of asymptomatic microhematuria. *BMC Urol* 2009; 9: 13.
5. Mohammad KS, Bdesha AS, Snell ME, Witherow RO, Coleman DV. Phase contrast microscopic examination of urinary erythrocytes to localise source of bleeding: an overlooked technique? *J Clin Pathol* 1993; 46(Suppl. 7): 642-5.
6. Sultana T, Sultana T, Rahman MQ, Rahman F, Islam MS, Ahmed AN. Value of dysmorphic red cells and G1 cells by phase contrast microscopy in the diagnosis of glomerular diseases. *Mymensingh Med J* 2011; 20(Suppl. 1): 71-7.
7. Miura H, Suwabe A, Tominaga M. Evaluation of dysmorphic red cells in the urinary sediment. *Rinsho Byori* 2001; 49(Suppl. 7): 638-45.
8. Sullivan PS, Chan JB, Levin MR, Rao J. Urine cytology and adjunct markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Am J Transl Res* 2010; 2(Suppl. 4): 412-40.
9. Šćukanec-Špoljar M, Krušlin B, Damjanov I. Bolesti bubrega i mokraćnoga sustava. U: Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2008, 495-555.
10. Arianayagam R, Arianayagam M, Rashid P. Bladder cancer-current management. *Aust Fam Physician*. 2011; 40 (Suppl. 4): 209-13.
11. Bergkvist A, Ljungqvist A, Moberger G. Classification of bladder tumours based on the
12. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol* 2009; 22 (Suppl 2): 53-9.

S U M M A R Y

ERYTHROCYTE MORPHOLOGY IN URINE DETERMINED BY LIGHT MICROSCOPY IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER

G. KNEŽEVIĆ¹, K. PARIGROS¹, B. KRIŽAJ¹, V. ANIĆ¹, M. PAŽUR¹,
B. JELIĆ-PUŠKARIĆ¹, D. ŠUŠTERČIĆ¹ and I. KARDUM-SKELIN^{1,2}

¹*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*
and ²*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

A finding of 80% or more of dysmorphic erythrocytes is assumed to point to kidney glomeruli, and of 80% or more of isomorphic erythrocytes to lower urinary tract as the origin of bleeding. In urine samples without significant origin of bleeding, there were 20%-80% of mixed results with both dysmorphic and isomorphic erythrocytes. The aim of the study was to show the origin of erythrocytes in malignant urine samples. Samples were fresh native urine sediment contrast stained with 0.1% safranin solution and analyzed under light microscope (X40). Out of 72 patients with malignant cells detected in urine, the origin of erythrocytes was identified in 25 patients (nine female and 16 male) through 90 samples (approximately 3-4 samples per patient); 26 (28.9%) samples did not have enough erythrocytes to define their origin, a mixed origin of erythrocytes was identified in 33 (36.7%) samples, dysmorphic erythrocytes were found in 25 (27.9%) samples, and isomorphic erythrocytes in 6 (6.3%) samples. In conclusion, there was no specific connection between malignant cell findings in urine and origin of erythrocytes. However, the high presence of mixed erythrocyte origin in malignant samples may suggest that the existence of a malignant process and renal disease should be taken in consideration.

Key words: malignant urine sample, dysmorphic erythrocytes, smooth erythrocytes

AKUTNI ODLJEVNI BRONHITIS - PRIKAZ BOLESNIKA

GORDANA CAVRIĆ¹, SLAVICA NAUMOVSKI-MIHALIĆ¹, IKA KARDUM-SKELIN^{2,7},
SONJA DŽEBRO³, BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ², DUNJA ŠUŠTERČIĆ²,
BRUNO ŠKURLA¹, IVICA PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ¹, TAJANA FILIPEC-KANIŽAJ^{1,7},
INGRID PRKAČIN^{1,7}, DUBRAVKA BARTOLEK⁴, KLARA JURIĆ⁵ i DOMAGOJ MOSLER⁶

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, ²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku,
³Klinički zavod za patologiju i citologiju, ⁴Klinički bolnički centar Sestre Milosrdnice, Klinika za traumatologiju,
Odjel za anesteziju, reanimaciju i intenzivno liječenje, ⁵Klinička bolnica Dubrava, Klinika za unutarnje bolesti,
⁶Lječilište Topusko, Topusko i ⁷Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Prikazujemo slučaj 81-godišnjeg muškarca hospitaliziranog u jedinici intenzivne skrbi koji se prezentirao pojavom odljevnog bronhitisa tipa I. Odljevni ili plastični bronhitis rijedak je poremećaj karakteriziran stvaranjem i ponekad dramatičnom ekspektoracijom dugih bronhijalnih odljeva. Patogeneza stvaranja bronhijalnih odljeva nije jasna.

Ključne riječi: bronhitis, odljevni bronhitis

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Gordana Cavrić, dr. med.
Jedinica intenzivnog liječenja
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 22 53 208
E-pošta: gordana.cavric1@gmail.com

UVOD

Odljevni ili plastični bronhitis rijedak je poremećaj karakteriziran stvaranjem i ponekad dramatičnom ekspektoracijom dugih bronhijalnih odljeva (1). Ovo stanje se može javiti u bilo kojoj životnoj dobi, ali većina publiciranih slučajeva odnosi se na pedijatrijsku populaciju. Iako je ovaj poremećaj rijedak može rezultirati životno ugrožavajućom opstrukcijom dišnih puteva i asfiksijom (2).

PRIKAZ BOLESNIKA

Osamdesetjednogodišnji muškarac primljen je u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL) interne klinike zbog kardiogenog plućnog edema u čijoj je podlozi

bio srčani infarkt bez ST elevacije (NSTEMI). Radilo se o bolesniku sa šećernom bolešću, stanjem nakon preboljela 3 srčana infarkta (posljednji infarkt - mjesec dana prije sadašnje hospitalizacije), stanjem nakon preboljelog moždanog udara s lijevostranom hemiparezom, stenozom aortne valvule teškog stupnja, generaliziranom aterosklerozom (bolest karotidnih arterija i arterija donjih ekstremiteta), dijabetičkom nefropatijom, arterijskom hipertenzijom i hiperlipidemijom.

Uz uobičajenu terapiju edema pluća i NSTEMI-ja pacijentu je u terapiji nastavljena terapija ciprofloksacinom koju je započeo 3 dana ranije nakon ambulantno postavljene dijagnoze lijevostrane bazalne pneumonije uz manji pleuralni izljev, a istom terapijom liječio se i infekt u defektu kože palca lijevog stopala iz kojeg je izoliran *Pseudomonas aeruginosa*.

Nakon početne stabilizacije - 5. dana boravka - ponovno razvija edem pluća uz bradikardiju i asistoliju. Proveden je reanimacijski postupak, bolesnik je endotrahealno intubiran i mehanički ventiliran te uz ostalu terapiju dolazi do poboljšanja pa je sljedeći dan nakon nešto manje od 24 h odvojen od mehaničke ventilacije, a potom i ekstubiran. Kako je pod antibiotskom terapijom došlo do progresije lijevostranog upalnog infiltrata 12. dana boravka u JIL-u učini se bronhoskopija transnazalnim pristupom (uz uredne koagulacijske parametre - PV 0,72, trombociti $278 \times 10^9/L$). Bronhoskopijom se nađu ušća za lijevo pluće (i gornji i donji režanj) izrazito edematozne, hiperemične i vulnerabilne sluznice uz aspiraciju dosta sluzavog gušćeg sekreta. Iz lijevog donjeg režnja uzmu se mini-bronhoalveolarni lavati (BAL) za mikrobiološku, citološku analizu i analizu na prisutnost *Mycobacterium tuberculosis*. Citološkom analizom bronhoalveolarnog lavata nađeno je dosta eritrocita, prilično neutrofilnih granulocita, dosta stanica pločastog i cilindričnog epitela, nešto makrofaga te pokoja spora gljivica. Zahvat je bolesnik dobro podnio, tijekom sljedećih otprilike 34 h bio je hemodinamski stabilan, eupnoičan. Potom naglo postaje izrazito dispnoičan (13. dan boravka u JIL-u) uz obilno iskašljavanje krvavog sadržaja i više komada nekoliko cm velikih i do 1 cm širokih crvolikih crvenkasto-smeđkastih komada «tkiva» (sl.1), koji su na prvi pogled izgledali poput komada plućevine. Tada se učini rtg srca i pluća i nađe miopatsko srce sa znacima subdekompenzacije te difuzno inhomogeno mekotkivno zasjenjenje u smislu diseminirane pneumonije. Tijekom otprilike 12 h stanje se popravlja, nije više bilo iskašljavanja.



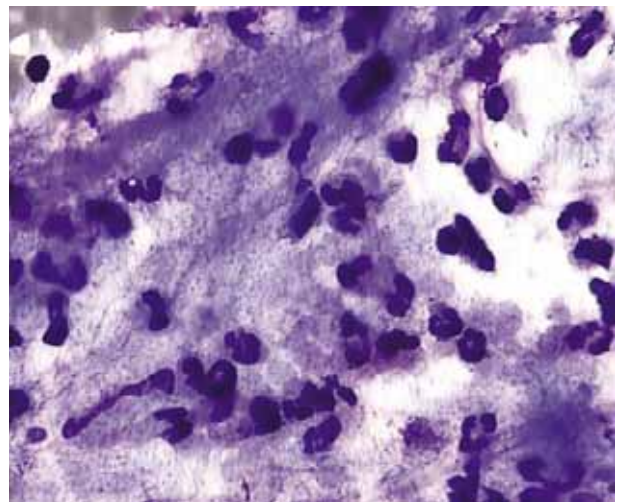
Sl. 1. Bronhalni odljev

Petnaestog dana boravka u JIL-u pacijent postaje jače dispnoičan uz pad saturacije hemoglobina kisikom što je zahtijevalo endotrahealnu intubaciju i mehaničku ventilaciju, a ubrzo potom dolazi i do razvoja šoka koji je bio bez odgovora na primijenjenu vazopresornu terapiju te bolesnik unatoč svim poduzetim mjerama liječenja umire. Vjerojatni razlog smrti je kombinacija kardiogenog i septičkog šoka. Nije rađena obdukcija.

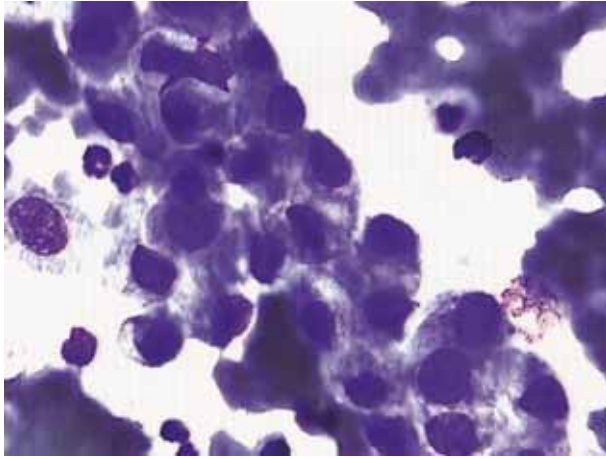
U aspiratu traheje uzetom 6. dana boravka u JIL-u nađena je *Candida albicans* 10^3 CFU/mL i *Streptococcus viridans* $\geq 10^5$ CFU/mL, a u aspiratu traheje 9. dana boravka u JIL-u *Pseudomonas aeruginosa* O10 $\geq 10^3$ CFU/mL, *Candida albicans* 10^3 CFU/mL i *Candida non albicans* 10^3 CFU/mL (ovaj uzorak je proglašen neadekvatnim jer je nađeno više od 25 pločastih epitelnih stanica).

Mikrobiološki iz lavata uzetog tijekom bronhoskopije nađen je *Pseudomonas aeruginosa* O10 $\geq 10^5$ CFU/mL, *Candida non albicans* 10^3 CFU/mL i koagulaza - negativan stafilokok $\geq 10^5$ CFU/mL. Lavat na *Mycobacterium tuberculosis* naknadno pristigao bio je negativan.

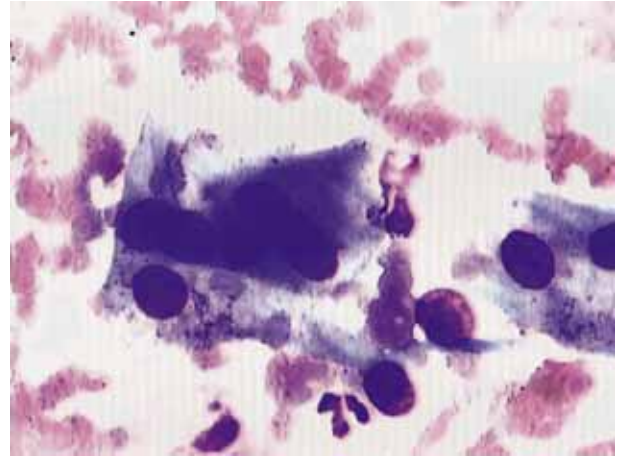
Od 9. do 12. dana boravka u JIL- pacijent nije dobio antipseudomonasni antibiotik, a od 13. dana - u vrijeme pogoršanja ponovno ga se uvodi u terapiju *ex iuvantibus* (tada se još nije bio poznat točan mikrobiološki nalaz), a naknadno se vidjelo da je to bilo u skladu s antibiogramom. Od 07. do 14. dana boravka dobivao je flukonazol, a posljednji dan se umjesto njega uvodi vorikonazol.



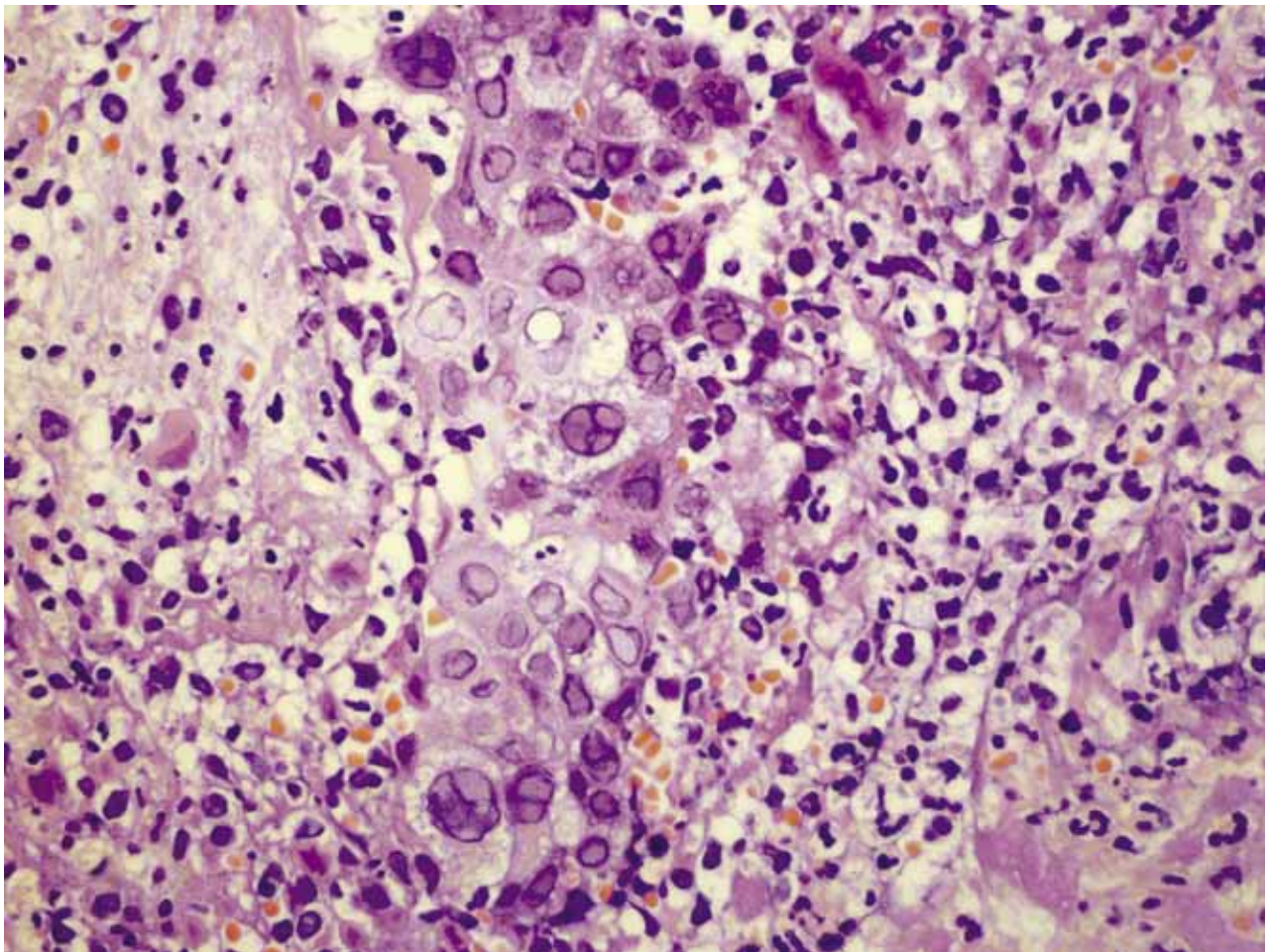
Sl. 2. Granulociti u citološkom otisku bronhalnog odljeva, May-Grünwald Giemsa, x1000



Sl. 3. Pločaste stanice u citološkom otisku bronhalnog odljeva, May-Grünwald Giemsa, x1000



Sl. 4. Makrofagi u citološkom otisku bronhalnog odljeva, May-Grünwald Giemsa, x1000



Sl. 5. Histološki prikaz citopatskog efekta Herpes virusa, hemalaun-eozin, x400

Citološkom analizom otiska iskašljanog komada tkiva koji se makroskopski doimao poput plućevine našlo se sljedeće: mnogo periferne krvi, prilično granulocita (sl. 2), nešto morfološki urednih

stanica pločastog epitela (sl. 3), nešto makrofaga (sl. 4), mjestimice nešto detritusa i sluzi s pokojom sporom gljivica poput *Candida albicans*. Patološka analiza navedenih komada tkiva našla je sljedeće:

vretenaste smeđe-sivkaste, mekane, mase duljeg promjera 6,5 i 3 cm, koje su na prerezu spužvaste i mrvičaste konzistencije. Histološki se radilo o sluzavom gnojnom sekretu uz obilni fibrin i krv. U serijskim rezovima uočena je pokoja vretenasta stanica pločastog epitela, makrofazi i granulociti. Nađene su i manje nakupine slabo očuvanih okruglastih stanica hiperlobuliranih mjehurastih jezgara koje morfološki upućuju na citopatski učinak virusa herpesa (sl. 5).

DISKUSIJA

Patogeneza stvaranja bronhalnih odljeva nije jasna. Čimbenik koji može doprinijeti njihovom nastanku je bronhoreja s infektivnim odstranjivanjem i posljedičnim isušivanjem mukoidnog sekreta koji ponekad može sadržavati upalne stanice i stanični detritus (3).

U odljevnom bronhitisu - veličina bronhalnih odljeva može varirati od malih - koji odgovara odljevu malog segmentalnog bronha - do odljeva koji ispunjavaju cijela pluća (2,4). Bolest se opisuje i istoznačnicama kao što su: fibrinski bronhitis, pseudomembranozni bronhitis, bronhalni krup, Hoffmanov bronhitis i mukoidna impakcija bronha (5). Odljevi bronha se obično dijele u dva tipa ovisno o njihovom sastavu: tip I (inflamatorni) i II (acelularni). Tip I se predominantno sastoji od fibrina uz infiltraciju neutrofilima, eozinofilima ili limfocitima; taj je tip obično povezan s infekcijom, astmom, cističnom fibrozom i bronhopulmonalnom aspergilozom. Tip II se uglavnom sastoji od mucina ponekad s malim brojem mononuklearnih stanica ili bez njih, najčešće nakon kirurške reparacije kongenitalnih cijanotičkih srčanih bolesti (obično nakon Fontenove operacije) (5,6).

Prikazom našeg pacijenta želimo prikazati rijedak slučaj odljavnog bronhitisa. U ovom slučaju možemo reći da se radilo o tipu I odljeva bronha koji je vjerojatno nastao kao posljedica infekcije. Točan mehanizam ne možemo objasniti. Prilikom patohistološke analize nađene su manje nakupine slabo očuvanih okruglastih stanica hiperlobuliranih mjehurastih jezgara koje morfološki upućuju na citopatski učinak virusa herpesa. Infekcija virusom herpesa simpleksa (HSV) traheobronhalnog stabla može se manifestirati i u imunokompetentnog bolesnika ulceracijama i stvaranjem upalnih membrana

koje se sastoje od fibrina i purulentnog eksudata (7). HSV može dospjeti u donji respiratorni trakt hematogenim širenjem, reaktivacijom latentnog HSV u vagusnom gangliju s posljedičnom migracijom duž živaca do traheobronhalnog epitela, ali najčešće aspiracijom ili širenjem iz gornjih dišnih puteva (7). HSV traheobronhitis ili pneumonija povezani su povećanom smrtnošću u kritično bolesnih, a moguća je i nozokomijalna transmisija (8). Pneumonija je, općenito, česta komplikacija bolesnika koji su preživjeli kardijalni arrest (9).

Točan razlog pojave odljavnog bronhitisa u našeg pacijenta ne znamo, ali s obzirom na tijek bolesti mišljenja smo da bi njegovom nastanku mogla pridonijeti moguća HSV infekcija koju nismo tretirali za života pacijenta (patohistološki nalaz smo saznali nakon što je pacijent umro).

LITERATURA

1. Kao NL, Richmond GW. Cough productive of casts. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 76: 231-3.
2. Wang G, Wang YJ, Luo FM i sur. Effective use of corticosteroids in treatment of plastic bronchitis with hemoptysis in Chinese adults. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1206-12.
3. Bowen AD, Oudjhane K, Odagiri K, Liston SL, Cumming WA, Oh KS. Plastic bronchitis: large, branching, mucoid bronchial casts in children. *AJR Am J Roentgenol* 1985; 144: 371-5.
4. Eberlein MN, Drummond MB, Haponik EF. Plastic bronchitis: a management challenge. *Am J Med Sci* 2008; 335: 163-9.
5. Raos M, Marković J, Miše B, Božinović D, Pegan B. Akutni odljevni bronhitis u petogodišnje djevojčice. *Pediatr Croat* 2007; 51: 1-6.
6. Goo HW, Jhang WK, Kim YH i sur. CT findings of plastic bronchitis in children after a Fontan operation. *Pediatr Radiol* 2008; 38: 989-93.
7. Remy DP, Kuzmowych TV, Rohatgi PK, Ortega LG. Herpetic bronchitis with a broncho-oesophageal fistula. *Thorax* 1995; 50: 906-7.
8. Engelmann I, Gottlieb J, Meier A i sur. Clinical relevance of and risk factors for HSV-related tracheobronchitis or pneumonia: results of an outbreak investigation. *Crit Care* 2007; 11: R119.
9. Rello J, Vallés J, Jubert P i sur. Lower respiratory tract infections following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 310-4.

S U M M A R Y

ACUTE PLASTIC BRONCHITIS - CASE REPORT

G. CAVRIĆ¹, S. NAUMOVSKI-MIHALIĆ¹, I. KARDUM-SKELIN^{2,7}, S. DŽEBRO³,
B. JELIĆ-PUŠKARIĆ², D. ŠUŠTERČIĆ², B. ŠKURLA¹, I. PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ¹,
T. FILIPEC-KANIŽAJ^{1,7}, I. PRKAČIN^{1,7}, D. BARTOLEK⁴, K. JURIĆ⁵ and D. MOSLER⁶

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine*, ²*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*, ³*Department of Clinical Pathology and Cytology*, ⁴*University Hospital Center Sisters of Mercy, Department of Traumatology, Division of Anaesthesiology, Reanimation and Intensive Care*, ⁵*University Hospital Dubrava, Department of Internal Medicine*, ⁶*Topusko Spa Resort, Topusko and* ⁷*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Plastic bronchitis is a rare disorder characterized by formation and sometimes dramatic expectoration of bronchial casts. It may occur at any age, but most published cases refer to pediatric population. We report a case of an 81-year-old man hospitalized at intensive care unit, who presented with the appearance of plastic bronchitis type I. He had profuse expectoration of several pieces, a few cm long and up to 1 cm wide, of wormlike reddish-brownish "tissue". Histologically, it was a slimy purulent secretion with abundant fibrin and blood and with cytopathic effect of herpes virus. The pathogenesis of plastic bronchitis is not clear.

Key words: bronchitis, plastic bronchitis

IZOLIRANI MIJELOIDNI SARKOM MEDIJASTINUMA

BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ¹, IKA KARDUM-SKELIN^{1,5}, DUNJA ŠUŠTERČIĆ¹, MARINA PAŽUR¹,
RADOVAN VRHOVAČ^{2,5}, DELFA RADIĆ-KRIŠTO², NJETOČKA GREDELJ-ŠIMEC², DRAGICA
OBAD KOVAČEVIĆ³, JASMINA PLAŠČAK³, SLAVKO GAŠPAROV^{4,5} i BRANIMIR JAKŠIĆ^{2,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, ²Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju, ³Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, ⁴Klinički zavod za patologiju i citologiju, i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Mijeloidni sarkom je rijedak ekstramedularni, solidni tumor građen od nezrelih mijeloidnih stanica. Javlja se u 2-8% pacijenata s akutnom mijeloidnom leukemijom (AML). Najčešće zahvaća kosti, kožu, limfne čvorove, meko tkivo, gastrointestinalni trakt i testis. Medijastinalni mijeloidni sarkom je vrlo rijedak. Prikazujemo slučaj 56-godišnje pacijentice koja se žalila na osjećaj slabosti, vrtoglavicu, suhi kašalj i otežano disanje. Kliničkim pregledom uočio se pojačan vaskularni crtež na desnoj strani prsništa te otok desne ruke. Kompjutoriziranom tomografijom (CT) toraksa uočena je ekspanzivna tvorba u području prednjeg dijela medijastinuma duljine 11 cm u kraniokaudalnom smjeru. Učinjena je citološka punkcija tumorske mase kojom se dobije oskudno celularan uzorak s pojedinačnim, atipičnim, nezrelim stanicama, nježne strukture kromatina i oskudne citoplazme u kojoj se mjestimice uočavaju granula te Auerovi štapići. Uzevši u obzir morfološke, citokemijske i imunocitokemijske karakteristike nezrelih stanica postavljena je dijagnoza mijeloidnog sarkoma što je potvrđeno i patohistološkom dijagnostikom bioptata tumora. Analizom punktata koštane srži, imunofenotipizacijom stanica koštane srži te biopsijom kosti nisu nađene nezrele stanice. Budući da u koštanoj srži i perifernoj krvi nisu umnožene nezrele stanice, a slikovnim metodama (CT, UZV) je isključena proširenost bolesti izvan medijastinuma, zaključeno je da se radi o primarnom, neleukemijskom obliku medijastinalnog mijeloidnog sarkoma.

Ključne riječi: izolirani mijeloidni sarkom, akutna mijeloidna leukemija, medijastinum

Adresa za dopisivanje: Biljana Jelić-Puškaric, dr. med.
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: biljana.jelic.puskaric@zg.t-com.hr

UVOD

Mijeloidni sarkom je rijedak ekstramedularni, solidni tumor građen od nezrelih mijeloidnih stanica (1). Iako se može javiti na bilo kojoj lokalizaciji, najčešće zahvaća subperiostalni dio kosti, kožu, limfne čvorove, meko tkivo, gastrointestinalni trakt i testis (1-4). Medijastinalni mijeloidni sarkom je vrlo rijedak (5-7). U manje od 10% slučajeva zahvaćene su multiple anatomske lokalizacije (8). Prema tipu nezrelih stanica od kojih je sastavljen razlikujemo granulocitni i monoblastični tip mijeloidnog sarkoma. Granulocitni sarkom je najčešći oblik, građen

od mijeloblasta, neutrofila i neutrofilnih prekursora. Rjeđi, monoblastični sarkom, koji najčešće prethodi akutnoj monoblastičnoj leukemiji je građen od monoblasta. Najrjeđe se vide tumori koji nastaju proliferacijom nezrelih stanica svih triju loza hemocitopoeze te tumori pretežno građeni od eritroidnih prekursora ili megakarioblasta (1). Mijeloidni sarkom se javlja u 2-8% pacijenata s akutnom mijeloidnom leukemijom (AML) (6,8). Može prethoditi ili se javiti istodobno s pojavom AML ili može biti prva manifestacija relapsa AML u prethodno liječenih bolesnika (1,9,10). Blastična transformacija nekog od oblika kronične mijeloproliife-

rativne neoplazme (engl. *Chronic Myeloproliferative Neoplasms* - CMN) ili mijelodisplastičnog sindroma (engl. *Myelodysplastic Syndromes* - MDS) također se može manifestirati kao mijeloidni sarkom (1,9,10). Najveći diferencijalno dijagnostički problem predstavlja izolirani, primarni mijeloidni sarkom bez zahvaćanja koštane srži i periferne krvi koji može mjesecima i godinama prethoditi leukemijskoj fazi i vrlo često se pogrešno dijagnosticira, najčešće kao maligni limfom (5,11-13).

PRIKAZ BOLESNICE

Pacijentica u dobi od 56 godina žalila se unazad 6 mjeseci na osjećaj slabosti, vrtoglavicu, suhi kašalj i otežano disanje, posebno noću te je primijetila povremeno oticanje desne ruke kao i desne strane vrata i lica. Zbog progresije simptoma bolesnica je hospitalizirana u lokalnoj bolnici nakon što je više puta pregledana u internističkoj i neurološkoj ambulanti. Kliničkim se pregledom uočio pojačan vaskularni crtež na desnoj strani prsišta te otok desne ruke. Laboratorijskom obradom nađena je blaga anemija (eritrociti $3,85 \times 10^{12}/L$, hemoglobin 116 g/L) uz

uredne vrijednosti leukocita ($7,59 \times 10^9/L$) i trombocita ($376 \times 10^9/L$), ubrzana sedimentacija eritrocita (SE 82 mm/3,6ks) i povišen C reaktivni protein (CRP 50,8 mg/L). Na ultrazvučnom (UZV) pregledu vrata primijećen je povećan limfni čvor desno u IV regiji. Učinjena je citološka punkcija čvora koja je ukazivala na limfoproliferativnu bolest. Patohistološkom dijagnostikom (PHD) ekstirpiranog čvora nisu nađeni morfološki znakovi limfoproliferativne bolesti. Radi daljnje obrade bolesnica je premještena u našu ustanovu. Kompjutoriziranom tomografijom (CT) toraksa uočena je ekspanzivna tvorba u području prednjeg medijastinuma dužine 11 cm u kraniokaudalnom smjeru. Tumorska masa u koju su inkorporirane vaskularne strukture većim je dijelom bila smještena s desne strane, gdje se u kranijalnom dijelu širila prema vratu potiskujući desni režanj štitnjače i traheju što je omogućilo retrosternalni pristup citološkoj punkciji tumora pod kontrolom UZV-a (sl. 1).

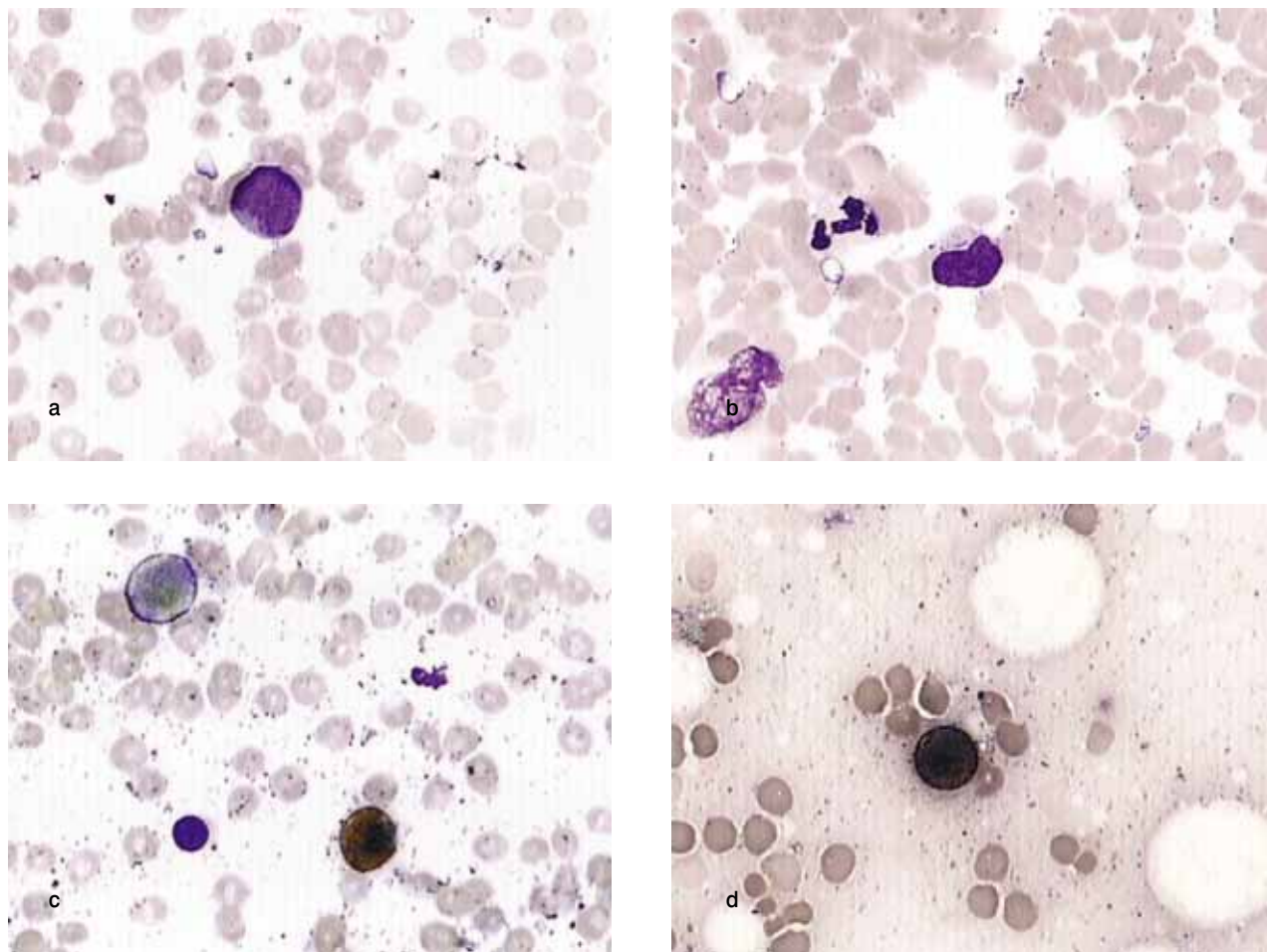
Punkcijom je dobiven oskudno celularan uzorak s pojedinačnim, atipičnim, nezrelim stanicama, nježne strukture kromatina i oskudne citoplazme u kojoj se mjestimice uočavaju granula te Auerovi štapići. Navedene su stanice pokazivale pozitivnu citokemijsku reakciju na mijeloperoksidazu dok su imunocitokemijski bile negativne na Tdt, CD20 i CD34 (sl. 2).

Uzevši u obzir morfološke, citokemijske i imunocitokemijske karakteristike postavljena je dijagnoza mijeloidnog sarkoma. Zbog oskudne celularnosti uzorak nije bio adekvatan za analizu na protočnom citometru. Pacijentici je nakon desnostrane parasternotomije učinjena biopsija tumorske tvorbe, koja je bila histološki građena od malih do srednje velikih stanica vezikularnih jezgara i oskudne citoplazme. Tumorske stanice su imunohistokemijski bile pozitivne na MPO, CD117, CD68KP1, a negativne na CD20, CD10, CD34, CD3, CD2, CD4, CD8 i CD30 te je potvrđena dijagnoza mijeloidnog sarkoma. U razmazima periferne krvi nisu nađene nezrele stanice (sl. 3).

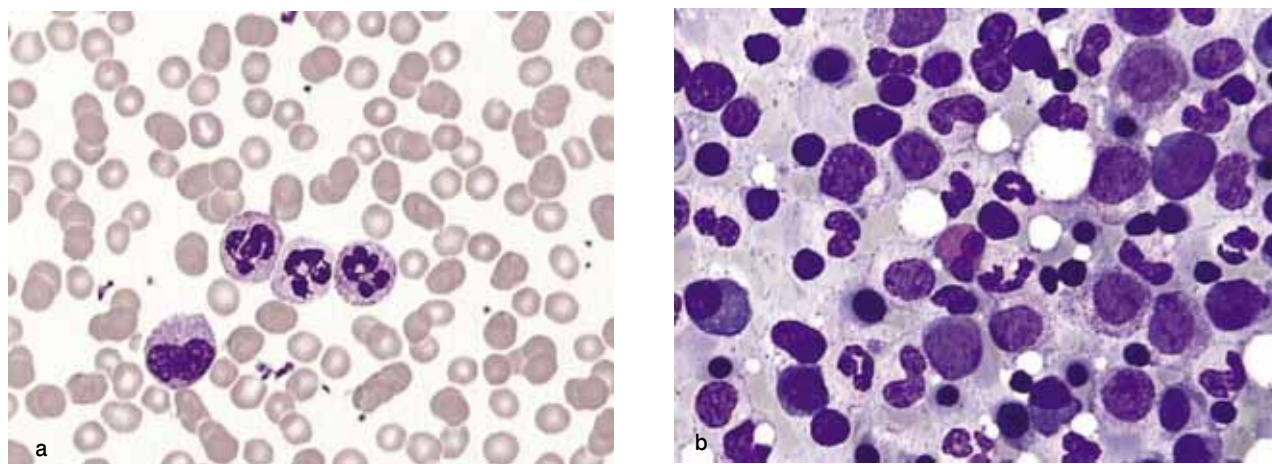
Obrada je dopunjena punkcijom koštane srži te biopsijom kosti. U normocelularnom punktatu koštane srži nađene su dobro zastupljene sve tri loze hemocitopoeze uz prisutne sve razvojne stadije bez umnažanja nezrelih oblika (sl. 3), što je potvrđeno



Sl. 1. CT toraksa: tumorska masa u području prednjeg medijastinuma većim je dijelom smještena s desne strane medijastinuma, potiskuje desni režanj štitnjače i traheju



Sl. 2. Nezrele tumorske stanice u punktatu medijastinalne tumorske tvorbe: a,b) MGG, x1000; c, d) citokemija, x1000, mijeloperoksidaza.



Sl.3. a) Razmaz periferne krvi (MGG, x1000), b) Punktat koštane srži (MGG, x1000).

imunofenotipizacijom stanica na protočnom citometru te biopsijom kosti. Na punktatu koštane srži učinjena je i citogenetska analiza, a citogenetske abnormalnosti nisu nađene. UZV pregledom abdomena, vrata, prepona i pazuha te CT-om abdomena i zdjelice nisu uočeni povećani limfni čvorovi niti organomegalija. Budući da u koštanoj srži i perifernoj krvi nisu nađene umnožene nezrele stanice, a slikovnim je metodama (CT, UZV) isključena proširenost bolesti izvan medijastinuma, zaključeno je da se radi o primarnom, neleukemijskom obliku medijastinalnog mijeloidnog sarkoma. Započeta je uvodna kemoterapija prema shemi „3+7“ u sklopu koje je bolesnica primila idarubicin 10 mg/m² tijekom 3 dana, te citarabin 100 mg/m² tijekom 7 dana. Nekoliko dana nakon početka terapije u bolesnice je zamijećen i izrazitiji otok desne strane vrata te je učinjen ultrazvučni pregled vrata obojenim doplerom. Budući da se verificiralo trombozu unutarnje jugularne vene liječena je i niskomolekularnim heparinom, nakon čega dolazi do rekanalizacije vene i regresije simptoma.

RASPRAVA

Mijeloidni sarkom je rijetka hematološka neoplazma koja nastaje ekstramedularnom proliferacijom nezrelih mijeloidnih stanica uz potpuni ili djelomični gubitak arhitekture tkiva (1). Prvi je put opisuje 1811. godine A. Burns (14), a naziv klorom prvi koristi A. King 1853. godine prema grčkoj riječi chloros (zelen) zbog zelene boje tumora koja nastaje aktivnošću enzima mijeloperoksidaze u tumorskim stanicama (12). U literaturi nalazimo brojne sinonime kao što su klorom, granulocitni sarkom, monocitni sarkom, mijeloblastom i ekstramedularni mijeloidni tumor (1,4). Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) od 2001. godine uvodi se termin mijeloidni sarkom (1). Premda se može javiti na bilo kojoj lokalizaciji u organizmu, najčešće sjelo su kosti (lubanja, paranazalni sinusi, prsna kost, rebra, kralješci), limfni čvorovi, koža, meko tkivo glave i vrata, gastrointestinalni trakt, testis i središnji živčani sustav (1-4). Mijeloidni sarkom medijastinuma, kakav je dijagnosticiran u naše pacijentice, vrlo je rijedak (5-7). Prema Byrd i sur. od 154 pacijenata s izoliranim mijeloidnim

sarkomom, samo je 7 imalo medijastinalni tumor (15). Yamauchi i Yasuda u 74 pacijenta s izoliranim mijeloidnim sarkomom nalaze 10% medijastinalnih (13). Mijeloidni sarkom se razvija u 2-8% pacijenata s AML te rjeđe u pacijenata s blastičnom transformacijom MDS ili CMN (6,8). Obično se javlja istodobno s pojavom leukemijske slike ili kasnije u toku bolesti, a vrlo se rijetko vidi kao izolirani entitet bez zahvaćanja koštane srži i perifernih krvi koji može mjesecima i godinama prethoditi razvoju leukemijske slike. U takvim slučajevima se vrlo često postavlja pogrešna dijagnoza, najčešće ne-Hodginovog limfoma (NHL) (5, 11-13). U prikazanom se slučaju radilo o tumorskoj tvorbi ograničenoj na medijastinum bez zahvaćanja koštane srži i perifernih krvi. Unatoč tome, pažljivom citomorfološkom analizom uz primjenu dodatnih tehnologija (citokemija, imunocitokemija) postavljena je ispravna dijagnoza. Yamauchi i Yasuda prikazuju da je u 47% (35/74) pacijenata s izoliranim mijeloidnim sarkomom inicijalno postavljena pogrešna dijagnoza. U 31 pacijenta postavljena je dijagnoza maligne limfoproliferativne bolesti (NHL, limfosarkom, histiocitni limfom, limfocitni sarkom i mijelom), a u 4 pacijenta dijagnoza eozinofilnog sarkoma i karcinoma. Točna dijagnoza postavljena je tek nakon razvoja leukemijske slike pregledom razmaza koštane srži i perifernih krvi (13). Prema radu Meis i sur. čak u 75% (12/16) pacijenata s izoliranim mijeloidnim sarkomom stanje je inicijalno pogrešno dijagnosticirano najčešće kao velikostanični limfom (9). U diferencijalnoj dijagnostici mijeloidnog sarkoma osim hematoloških neoplazmi (prvenstveno ne-Hodginovih limfoma kao što su limfoblastični limfom, Burkittov limfom, difuzni B velikostanični limfom te anaplastični velikostanični limfom) treba razmotriti i nehematološke neoplazme (slabo diferencirani karcinom, melanom i sarkom) (1,2,4,16), kao i neke nemaligne procese (upala, ekstramedularna hematopoeza) (4). Kod pacijenata s medijastinalnim tumorom poput naše bolesnice, uz najčešće entitete koji se vide na toj lokalizaciji (limfom, timom, metastatski karcinom, germinativni ili neurološki tumori) mora se razmišljati i o znatno rjeđem mijeloidnom sarkomu (5,6). Za postavljanje točne dijagnoze posebno kod izoliranog mijeloidnog sarkoma bez leukemijske slike često je neophodno morfološku analizu upotpuniti dodatnim tehnologijama kao što su citokemija, imunocitokemija, protočna citometrija, PCR i

citogenetika. Imunofenotipizacija nezrelih stanica, bilo imunocitokemijski i/ili na protočnom citometru, ima veliko značenje pri postavljanju točne dijagnoze posebno ako su morfološke karakteristike mijeloidne diferencijacije slabo izražene (1,16). Traweek sa sur. navodi da se 96% mijeloidnih sarkoma može ispravno dijagnosticirati uz korištenje imunohistokemijskog panela koji uključuje CD20, CD43, CD68 i MPO (17). U 95% pacijenata s izoliranim mijeloidnim sarkomom razvija se AML unutar razdoblja od 1 do 48 mjeseci (2,9). U pacijenata liječenih agresivnom kemoterapijom to je razdoblje duže u odnosu na pacijente liječene samo kirurški ili radioterapijom (13).

Yamauchi i Yasuda podijelili su 74 pacijenta s izoliranim mijeloidnim sarkomom u tri skupine prema provedenoj terapiji. U skupini pacijenata u kojih je učinjena samo kirurška resekcija tumora, razdoblje od postavljanja dijagnoze do pojave leukemijske slike bilo je najkraće (medijan 3 mjeseca), u skupini bolesnika liječenih lokalnim zračenjem medijan je bio 6 mjeseci, dok je u pacijenata koji su dobili sistemsku kemoterapiju to razdoblje bilo najduže (medijan 12 mjeseci) (13). Međutim, u pacijenata liječenih kemoterapijom bolji rezultati postignuti su kod onih liječenih kemoterapijom za AML nego kod pacijenata liječenih kemoterapijom koja se koristi za limfoproliferativne bolesti (13,18). Budući da se značajan postotak primarnih mijeloidnih sarkoma inicijalno pogrešno dijagnosticira (47-75%), najčešće kao NHL (9,13), to ima za posljedicu liječenje takvih pacijenata manje učinkovitim kemoterapijom za limfoproliferativne bolesti.

ZAKLJUČAK

U diferencijalnoj dijagnostici solidnih tumora građenih od nezrelih stanica tipa blasta treba razmišljati i o mijeloidnom sarkomu budući da je postavljanje točne dijagnoze neophodno za provođenje pravodobne i ispravne terapije. Slaba izraženost ili izostanak jasnih znakova mijeloidne diferencijacije može otežati morfološku dijagnostiku, a kako se radi o vrlo rijetkom entitetu koji svojom kliničkom prezentacijom često nalikuje limfomu, izolirani mijeloidni sarkom je dijagnostički izazov, kako za morfologe, tako i za kliničare.

LITERATURA

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
2. Dutta Roy S, Stafford JS, Scally J, Selvachandran SN. Granulocytic sarcoma of the breast antedating acute myelogenous leukemia. *Breast* 2004; 13: 242-6.
3. Ngu IWY, Sinclair EC, Greenaway S, Greenberg ML. Unusual presentation of granulocytic sarcoma in the breast. *Diagn Cytopathol* 2001; 24: 53-7.
4. D'costa GF, Hastak MS, Patil YV. Granulocytic sarcoma of breast: An aleukemic presentation. *Indian J Med Sci* 2007; 61: 152-5.
5. Wong WS, Loong F, Ooi GC, Tse TC, Chim CS. Primary granulocytic sarcoma of the mediastinum. *Leuk Lymphoma* 2004; 5: 1931-3.
6. Tsai MH, Yang CP, Chung HT, Shih LY. Acute myeloid leukemia in a young girl presenting with mediastinal granulocytic sarcoma invading pericardium and causing superior vena cava syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31: 980-2.
7. Ramasamy K, Lim Z, Pagliuca A, Devereux S, Ho AY, Mufti GJ. Acute myeloid leukaemia presenting with mediastinal myeloid sarcoma: report of three cases and review of literature. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 290-4.
8. Serefhanoglu S, Goker H, Aksu S i sur. Spinal myeloid sarcoma in two non-leukemic patients. *Intern Med* 2010; 49: 2493-7.
9. Meis JM, Butler JJ, Osborne BM, Manning JT. Granulocytic sarcoma in nonleukemic patients. *Cancer* 1986; 58: 2697-709.
10. Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Wen S i sur. Myeloid sarcoma is associated with superior event-free survival and overall survival compared with acute myeloid leukemia. *Cancer* 2008; 113: 1370-8.
11. Astall E, Yarranton H, Arno J, Marcus R. Granulocytic sarcoma preceding AML M0 and the diagnostic value of CD34. *J Clin Pathol* 1999; 52: 705-7.
12. Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Estey E i sur. Outcome in patients with nonleukemic granulocytic sarcoma treated with chemotherapy with or without radiotherapy. *Leukemia* 2003; 17: 1100-3.
13. Yamauchi K, Yasuda M. Comparison in treatments of nonleukemic granulocytic sarcoma: report of two cases and a review of 72 cases in the literature. *Cancer* 2002; 94: 1739-46.
14. Burns A. Head and Neck. London: Royce, 1811.
15. Byrd JC, Edenfield WJ, Shields DJ, Dawson NA. Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: a clinical review. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1800-16.

16. Cui Y, Zhou JL, Wu JH, Zhang JZ. Synchronous granulocytic sarcoma of the breast and spine: a case report and review of the literature. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 1854-56.

17. Traweck ST, Arber DA, Rappaport H, Brynes RK. Extramedullary myeloid cell tumors. An immunohisto-

chemical and morphologic study of 28 cases. *Am J Surg Pathol* 1993; 17: 1011-9.

18. Imrie KR, Kovacs MJ, Selby D i sur. Isolated chloroma: the effect of early antileukemic therapy. *Ann Intern Med* 1995; 123: 351-3.

S U M M A R Y

ISOLATED MYELOID SARCOMA INVOLVING THE MEDIASTINUM

**B. JELIĆ-PUŠKARIĆ¹, I. KARDUM-SKELIN^{1,5}, D. ŠUŠTERČIĆ¹, M. PAŽUR¹,
R. VRHOVAČ^{2,5}, D. RADIĆ-KRIŠTO², NJ. GREDELJ-ŠIMEC²,
D. OBRAD KOVAČEVIĆ³, J. PLAŠČAK³, S. GAŠPAROV^{4,5} and B. JAKŠIĆ^{2,5}**

¹Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics, ²Department of Internal Medicine, Division of Hematology, ³Department of Diagnostic and Interventional Radiology, ⁴Department of Pathology and Cytology and ⁵University of Zagreb School of Medicine, Zagreb, Croatia

Myeloid sarcoma is a rare extramedullary solid tumor consisting of immature myeloid cells and most commonly involving the bone, skin, lymph nodes, soft tissue, gastrointestinal tract and testis. Mediastinal myeloid sarcoma is very rare. There are two major types of myeloid sarcoma: granulocytic sarcoma and monoblastic sarcoma, according to immature cell type. Myeloid sarcoma is found in 2%-8% of patients with acute myeloid leukemia (AML). Myeloid sarcoma may develop before or concurrently with AML, or may be the initial manifestation of AML relapse in previously treated patients. Blast transformation of some form of myeloproliferative neoplasm or myelodysplastic syndrome may also manifest as myeloid sarcoma. A major differential diagnostic problem is isolated primary myeloid sarcoma without bone marrow and peripheral blood involvement, which may precede leukemic stage for months or years, and which is frequently misdiagnosed, mostly as malignant lymphoma. A case is presented of a 56-year-old female patient complaining of weakness, vertigo, dry cough and breathing difficulties. Clinical examination revealed enhanced vascular pattern on the right chest and right arm edema. Computed tomography (CT) of the thorax showed an expansive growth measuring 11 cm craniocaudally in the anterior mediastinum. Fine needle aspiration cytology of tumor mass yielded a scarcely cellular sample with individual atypical immature cells, fine chromatin structure and scarce cytoplasm with occasional granules and Auer rods. Considering the morphological, cytochemical and immunocytochemical characteristics of immature cells, the diagnosis of myeloid sarcoma was made and verified by histopathology of tumor biopsy sample. Immature cells were not found by analysis of bone marrow puncture sample, immunophenotyping of bone marrow cells and bone biopsy analysis. As immature cell proliferation was not detected in bone marrow and peripheral blood, while spread of the disease beyond the mediastinum was ruled out by imaging methods (CT, ultrasonography), it was decided to be a primary non-leukemic form of mediastinal myeloid sarcoma. Myeloid sarcoma should be taken in consideration on differential diagnosis of solid tumors because making an accurate diagnosis is necessary for timely initiation of appropriate therapy. Weakly expressed or lacking clear signs of myeloid differentiation may hamper morphological diagnosis. As isolated myeloid sarcoma is a very rare entity frequently resembling lymphoma in clinical presentation, it poses a major diagnostic challenge for both morphologists and clinicians.

Key words: isolated myeloid sarcoma, acute myeloid leukemia, mediastinum

ANTIAGREGACIJSKA TERAPIJA NAKON PERKUTANE KORONARNE INTERVENCIJE KOD BOLESNIKA S TROMBOCITOPENIJOM - PRIKAZ BOLESNIKA

HELENA JERKIĆ¹, TOMISLAV LETILOVIĆ^{1,3}, KRISTINA NARANČIĆ SKORIĆ¹, BOŠKO SKORIĆ²,
IVICA PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ¹, DARKO POČANIĆ¹, DAMIR KOZMAR¹ i STJEPAN KRANJČEVIĆ¹

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Služba za kardiologiju, ²Klinički bolnički centar Zagreb,
Klinika za bolesti srca i krvnih žila i ³Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Bolesnicima kojima je tijekom perkutane koronarne intervencije ugrađen stent potrebno je primijeniti dvostruku antiagregacijsku terapiju koja se sastoji od acetilsalicilne kiseline i najčešće klopidogrela. Navedena terapija je povezana s povoljnijim kliničkim ishodom uz cijenu nešto većeg rizika krvarenja. Katkada je ugradnja stenta indicirana i u bolesnika s trombocitopenijom. U takvih je bolesnika značajno veći navedeni rizik od krvarenja, a rizik od potencijalno fatalnog, trombotskog događaja je teško procijeniti. Zbog navedenog, bolesnici s ugrađenim stentom i trombocitopenijom poseban su klinički izazov. U ovom radu pokušat ćemo prikazati jedan od mogućih dijagnostičkih i terapijskih pristupa u liječenju takvih bolesnika.

Ključne riječi: trombociti, agregacija, acetilsalicilna kiselina, klopidogrel, trombocitopenija

Adresa za dopisivanje: Helena Jerkić, dr. med.
Služba za kardiologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica „Merkur“
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E- pošta: helena.jerkic@zg.t-com.hr

UVOD

Bolesnicima kojima je tijekom perkutane koronarne intervencije ugrađen stent potrebno je primijeniti dvostruku antiagregacijsku terapiju koja se sastoji od acetilsalicilne kiseline i najčešće klopidogrela u trajanju od 6 do 12 mjeseci (ovisno o vrsti stenta) (1). Povoljan učinak dvojne antiagregacijske terapije u tih bolesnika dokazan je velikim randomiziranim kliničkim studijama (2,3), a patofiziološki mehanizam se osniva na direktnom antiishemijskom učinku (4,5) kao i na prevenciji potencijalno fatalne tromboze u stentu (6). Individualna varijabilnost bolesnika koja može dovesti do neučinkovitosti navedene terapije, a naziva se rezistencijom, povezana je s nepovoljnim kliničkim ishodima (7,8) te je kao takva predmetom brojnih istraživanja, kako

povećane doze navedenih lijekova (9), tako i novih preparata (10,11). Sve navedene studije jednako su tako pokazale da dvojna antiagregacijska terapija povećava rizik krvarenja.

S druge strane postoje i bolesnici u kojih je smanjen bilo broj bilo učinkovitost trombocita, a za takve bolesnike ne postoje preporuke o adekvatnoj antiagregacijskoj terapiji.

Prikazujemo slučaj bolesnika u kojeg je mjesec dana nakon ugradnje stenta u koronarnu arteriju otkrivena trombocitopenija. Cilj rada je pokazati dijagnostičke metode korištene u otkrivanju potencijalno reverzibilnih uzroka trombocitopenije kao i metode korištene u procjeni adekvatnosti primijenjene antiagregacijske terapije.

PRIKAZ BOLESNIKA

Muškarcu u dobi od 73 godine je zbog novonastalih anginoznih tegoba s objektiviziranom ishemijom prednje srčane stijenke učinjena perkutana koronarna intervencija s ugradnjom stenta u lijevu koronarnu arteriju. Prije godinu dana je u sklopu akutnog koronarnog zbivanja učinjena perkutana koronarna intervencija s ugradnjom stenta u desnu koronarnu arteriju, kada je započeta dvojna antiagregacijska terapija u standardnoj dozi (klopidogrel 75 mg + acetilsalicilna kiselina 100 mg), koja je sada nastavljena.

Nakon mjesec dana, na kontrolnom pregledu se uoči novonastala trombocitopenija (vrijednosti u praćenju $38 - 62 \times 10^9$ trombocita/L). Bolesnik je bio bez subjektivnih tegoba te bez vidljivih znakova vanjskog krvarenja. S obzirom na moguću trombocitopeniju u sklopu primjene acetilsalicilne kiseline, isključili smo je iz terapije te je nastavljena terapija klopidogrelom u dozi 150 mg na dan. Učinjena je citološka punkcija koštane srži kojom se ne nađe znakova zatajenja koštane srži. Laboratorijskom obradom se isključi pseudotrombocitopenija. Direktni i indirektni test na antitrombocitna antitijela bio je negativan. U citološkom razmazu periferne krvi nismo našli elemente trombotske mikroangiopatije. Ultrazvučnim se pregledom utvrdi blago uvećana slezena.

Radi procjene stupnja inhibicije specifičnih puteva agregacije trombocita koji su inače meta dvojne antitrombocitne terapije učinjen je test agregacije trombocita metodom Multiplate® s adenzin difosfatom (ADP-test) i s arahidonskom kiselinom (ASPI-test) (12,13) koji su ukazali da su oba puta pojačano inhibirana («hiperreaktor») zbog čega je reducirana doza klopidogrela na 75 mg na dan. Na kontrolnom pregledu za 2 tjedna, na kojem se i dalje bilježi trombocitopenija, ponovljeni testovi agregacije trombocita ponovno pokazuju kako su oba mehanizma agregacije trombocita izrazito inhibirana. Kako je bolesnik bio bez vidljivih znakova vanjskog krvarenja te kako nije imao niti laboratorijskih znakova krvarenja, nastavljena je do tada propisana antiagregacijska terapija.

RASPRAVA

Postoje jasne preporuke o potrebi primjene dvojne antiagregacijske terapije u bolesnika u kojih je tijekom perkutane koronarne intervencije ugrađen

stent. Te su preporuke temeljene na brojnim velikim, randomiziranim, dvostruko slijepim kliničkim studijama kao i na poznatoj ulozi agregacije trombocita u patofiziologiji svih, a ponajprije akutnih oblika koronarne bolesti.

U kliničkoj se praksi katkad susreću bolesnici u kojih je smanjen broj trombocita, a u kojih je indicirana perkutana koronarna intervencija uz ugradnju stenta. Nažalost za takve bolesnike ne postoje niti dobro dokumentirana istraživanja niti jasne preporuke. Izvjesno je pak kako je u tih bolesnika rizik krvarenja na dvojnoj antiagregacijskoj terapiji dodatno povećan.

Racionalan pristup u takvim slučajevima jest ponajprije ukloniti potencijalne uzročnike te pokušati otkriti potencijalno reverzibilne uzroke trombocitopenije. U velikog broja bolesnika, pa tako i u našeg bolesnika, navedeni uzrok, nažalost, nije moguće pronaći ili ukloniti.

U tih se bolesnika najopravdanijim čini individualizirati antiagregacijsku terapiju na temelju rezultata testova agregacije trombocita s adenzin difosfatom te testova aspirinske rezistencije. Test agregacije trombocita s adenzin difosfatom, koji pokazuje adekvatnost terapije klopidogrelom, pokazao je kako je naš bolesnik hiperreaktor bez obzira na primijenjenu dozu klopidogrela. S druge pak strane, test aspirinske rezistencije također je pokazao hipereaktivnost bez obzira što bolesnik uopće nije bio na terapiji acetilsalicilnom kiselinom. Očito je stoga kako broj trombocita utječe na rezultate navedenih testova, ali se ipak čini kako su ti rezultati u skladu sa stanjem agregacijskog sustava bolesnika te su kao takvi pouzdani pokazatelji adekvatnosti terapije. Sljedeći mogući korak bio bi u potpunosti ukloniti antiagregacijsku terapiju, s obzirom da je bolesnik i dalje hiperreaktor na oba lijeka. Potpunom izostavljanju antiagregacijske terapije za sada nismo bili skloni obzirom na izostanak znakova krvarenja kao i na strah od potencijalno fatalnih komplikacija (tromboza stenta).

ZAKLJUČAK

Bolesnici s trombocitopenijom u kojih je iz bilo kojeg razloga potrebna dvojna antiagregacijska terapija klinički su izazov s obzirom na potencijalno fatalna krvarenja koja su u tom slučaju moguća. S druge pak strane, neopravdano izostavljanje dvojne antiagregacijske terapije može dovesti do zna-

čajnih nepovoljnih kliničkih ishoda čak i u bolesnika s trombocitopenijom. Individualizirani pristup, temeljen ponajprije na otkrivanju potencijalno reverzibilnih uzroka kao i na upotrebi novijih metoda procjene funkcije agregacijskog sustava, čine se najracionalnijim postupkom u takvim slučajevima.

L I T E R A T U R A

1. Wijns W, Kolh P, Danchin N i sur. Guidelines for myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2010; 31: 2501-55.
2. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without the loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting. The clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 2000; 102: 624-9.
3. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized trial. *JAMA* 2002; 288: 2411-20.
4. CAPRIE Steering Committee. A randomized, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk for ischemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-39.
5. CURE Steering Committee. Effects of clopidogrel addition in patients with acute coronary syndrome without ST segment elevation (CURE). *N Engl J Med* 2001; 345: 494-502.
6. Einstein EL, Anstrom KJ, Kong DF i sur. Clopidogrel use and long-term clinical outcomes after drug-eluting stent implantation. *JAMA* 2007; 297: 159-68.
7. Metzky S, Shenkman B, Guetta V i sur. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 3171-5.
8. Ciusset T, Frere C, Quilici J i sur. High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haem* 2006; 4: 542-9.
9. Mehta SR, Van de Werf F. A randomised comparison of a clopidogrel high loading and maintenance dose regimen versus standard dose, and high versus low dose aspirin in 25000 patients with acute coronary syndromes: results of CURRENT OASIS-7 trial: Paper presented at: European Society of Cardiology 2009 Congress, August 30, 2009; Barcelona, Spain.
10. Montalescot G, Wiviott SD, Braunwald E i sur. Prasugrel compared with clopidogrel in patients going for percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction (TRITON TIMI-38): double blind, randomized controlled trial. *Lancet* 2009; 373: 723-31.
11. Cannon CP, Harrington RA, James S i sur. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. *Lancet* 2010; 375: 283-93.
12. Milicic D, Skoric B, Lovric D. Drug-specific thienopyridine resistance in patient with recurrent coronary stent thrombosis. *J Invasive Cardiol* 2009; 21:E157-60.
13. Skoric B, Milicic D, Lovric D, Gornik I, Skoric KN, Sertic J. Initial patency of the infarct-related artery in patients with acute ST elevation myocardial infarction is related to platelet response to resperin. *Int J Cardiol* 2010; 140: 356-8.

S U M M A R Y

ANTIAGGREGATION THERAPY AFTER PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION IN A PATIENT WITH THROMBOCYTOPENIA: CASE REPORT

H. JERKIĆ¹, T. LETILOVIĆ^{1,3}, K. NARANČIĆ SKORIĆ¹, B. SKORIĆ²,
I. PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ¹, D. POČANIĆ¹, D. KOZMAR¹ and S. KRANJČEVIĆ¹

¹Merkur University Hospital, Department of Medicine, Division of Cardiology, ²Zagreb University Hospital Center, Department for Cardiovascular Diseases and ³University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia

Dual antiaggregation (antiplatelet) therapy is mandatory in patients having received a stent during percutaneous coronary intervention. This therapy usually consists of acetylsalicylic acid (100 mg per day) and clopidogrel (75 mg per day) for at least 6

to 12 months (depending on the type of stent). Such therapy has been shown to reduce significantly unwanted clinical events, although slightly increasing the risk of bleeding. Coronary stents must rarely be implanted in patients who have or develop thrombocytopenia. In such patients, the risk of bleeding is increased manifold. On the other hand, the risk of potentially fatal thrombotic events is unknown. In this case report, we present a patient who developed thrombocytopenia shortly (one month) after the stent had been implanted. After thorough clinical workup, we could not find the remediable cause of thrombocytopenia. Because of the potential of acetylsalicylic acid to induce thrombocytopenia, it was excluded from therapy and a double dose of clopidogrel (150 mg per day) was introduced. Then we decided to evaluate platelet function with the ADP aggregation test (which indicates the degree to which the function of platelets is blocked by clopidogrel) and aspirin resistance test (which indicates the degree to which the function of platelets is blocked by acetylsalicylic acid). In the first set of tests, the patient was shown to be hyperreactive to both substances. We then lowered the dose of clopidogrel to the standard dose and evaluated the function of platelets with the same tests two weeks later and the results were the same. Because the patient was without obvious and laboratory signs of bleeding, we decided not to change the prescribed antiplatelet therapy because of fear from potentially fatal thrombotic events. The use of dual antiplatelet therapy in patients with thrombocytopenia is particularly challenging. We believe that in such patients, firstly, the cause of thrombocytopenia should be sought for by thorough clinical investigation. If not found, as in our patient, tailoring of such therapy should be done using currently available aggregation tests. In such a way, patients could be protected from both excessive bleeding and potentially devastating thrombotic events. Unfortunately, this is a sole example and definite conclusions could only be made on larger studies.

Key words: platelets, aggregation, acetylsalicylic acid, clopidogrel, thrombocytopenia

ENDOMETRALNI KARCINOM SVIJETLIH STANICA U ATROFIČNOM ENDOMETRALNOM POLIPU – PRIKAZ BOLESNICE

SUZANA KATALENIĆ SIMON¹, INES KRIVAK BOLANČA¹, KARMELA ŠENTIJA¹,
GOJKO ZOVKO², MARIO PODGAJSKI², JOSIP VALETIĆ² i ANITA ŠKRTIĆ^{3,4}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku, ²Klinika za ženske bolesti i porode, ³Klinički zavod za patologiju i citologiju i ⁴Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Karcinom svjetlih stanica (KSS) je rijedak oblik endometralnog karcinoma neovisnog o estrogenu. Čini 1-5,5% svih endometralnih karcinoma. Najčešće se javlja u postmenopauzi, kao tumor slabijeg stupnja diferenciranosti, biološki agresivnijeg ponašanja i s lošijom prognozom. Histološki se može pojaviti kao solidni, tubularni, cistični ili papilarni oblik s karakterističnim malignim svjetlim stanicama. Ovo je prikaz izuzetno rijetkog slučaja u kojem je biološki agresivni tip tumora ostao ograničen unutar polipa endometrija. Sedamdesetdvogodišnjoj bolesnici s oskudnim krvarenjem u postmenopauzi učinjena je frakcionirana kiretaža, a oskudan materijal otežavao je patohistološku dijagnozu malignog procesa. Metodom direktnog uzimanja materijala četkicom iz materijala za citološku analizu materijal je bio obilniji. U podlozi stare krvi i mnoštva histiocitarnih stanica prisutne su atipične epitelne stanice, izraženih nukleola i nešto obilnijom citoplazmom. Uz suspektan ultrazvučni i pozitivan citološki nalaz učini se histerektomija s obostranom adneksantomijom. Na presjeku kroz korpus uterusa materijale je bilo ispunjeno polipoznom tvorbom, atrofičnim endometralnim polipom sa žarištem KSS endometrija bez vaskularne invazije kao i invazije miometrija. S obzirom na iskustvo u prikazanom slučaju mišljenja smo da je metodu direktnog uzimanja uzorka iz materijala četkicom i njegovu citološku analizu opravdano koristiti u dijagnostičkom protokolu u bolesnica oboljelih od endometralnih tumora.

Ključne riječi: citologija endometrija, aspirat materijala, karcinom svjetlih stanica endometrija

Adresa za dopisivanje: Suzana Katalenić Simon, dr. med.
Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19,
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 22 53419
E-pošta: suzana.simon@kb-merkur.hr, katalenicsimon.suzana@gmail.com

UVOD

Karcinom svjetlih stanica (KSS) je rijedak oblik karcinoma endometrija s pojavnošću 1-5,5% svih endometralnih karcinoma, pripada skupini endometralnih karcinoma neovisnih o estrogenima, agresivnog je kliničkog tijeka s lošom prognozom (1). Učestalost KSS je veća u žena u postmenopauzi; prosječna dob bolesnica kreće se u rasponu od 62 do 67 godina (2). Prve publikacije o KSS endometrija autora Silverberga i De Giorgija te Kurmana i Scullyja potječu iz ranih 1970-tih godina upravo zbog rijetke pojavnosti ovog tumora (3,4). Nove molekularne metode, međutim, do danas pokazuju oskudne i nedovoljno razjašnjene rezultate mo-

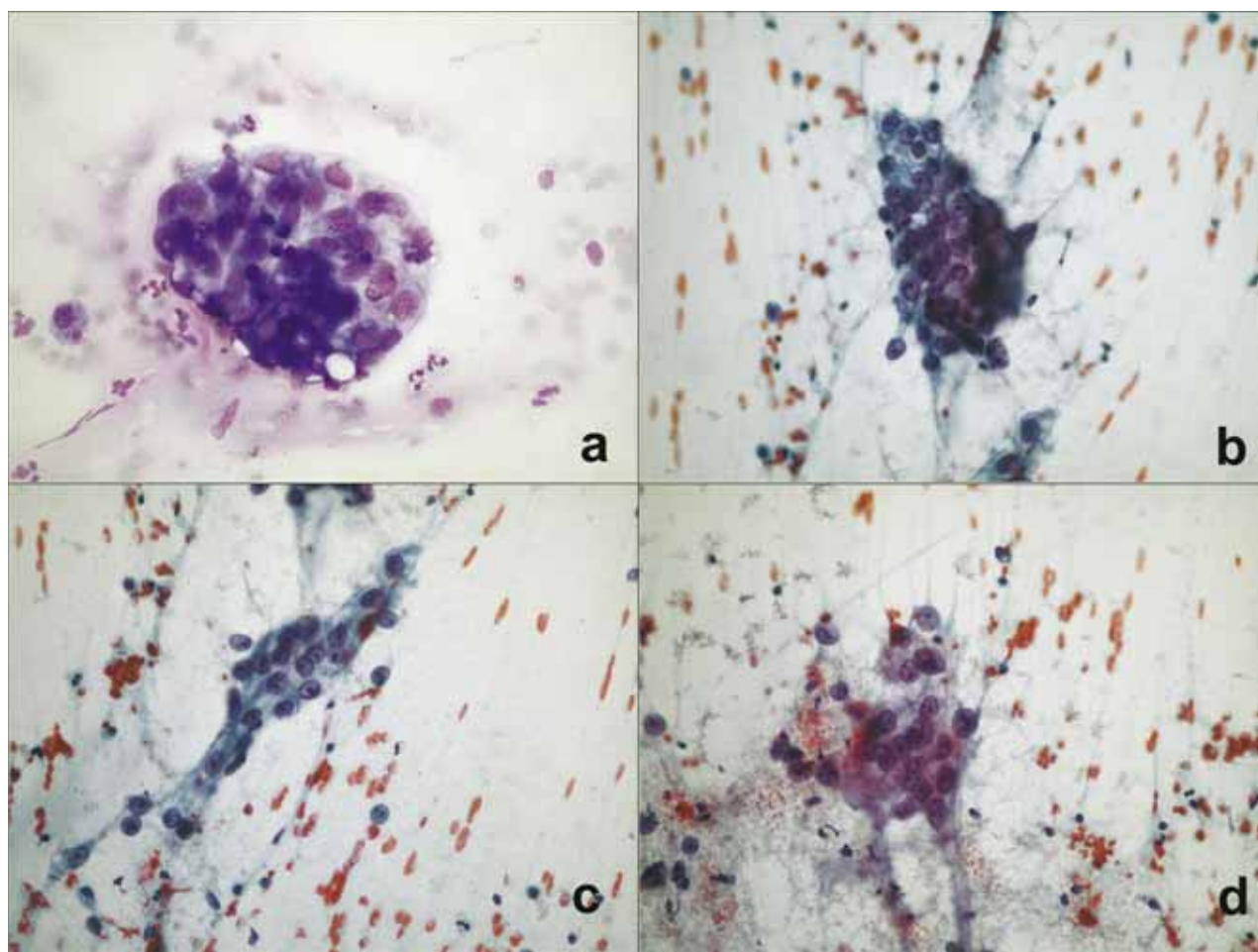
lekularnih promjena u patogenezi ovog karcinoma kao i modalitete optimalnog liječenja – kemoterapija; zračenje zdjelice s brahiterapijom; zračenje zdjelice sa zračenjem ili bez zračenja paraaortalnih limfnih čvorova uz kemoterapiju (1). Zbog morfološke sličnosti s karcinomom svjetlih stanica bubrega smatralo se da pripada tumorima podrijetlom od mezonefrosa, međutim, nalaz svjetlih malignih stanica u endometriju upućuje na podrijetlo od Müllerovih cijevi (5). KSS se može razviti i u jajniku, cerviksu ili u rodnici, s istim histološkim obilježjima - u obliku solidnih, tubularnih, cističnih ili papilarnih formacija. KSS pripada tumorima slabijeg stupnja diferenciranosti, izražene nuklearne

atipije i biološki agresivnog tijeka. U trenutku dijagnosticiranja bolesnice su često već u uznapredovalom stadiju bolesti. Rijetko je tumor ograničen u endometriju kao polipozna tvorba (6). Petogodišnje preživljenje prema izvještaju FIGO (*Federation Internationale de Gynecologie et Ostetrique*) iz 2006. godine iznosi 62,5% i pripada karcinomima lošije prognoze (1).

PRIKAZ BOLESNICE

Sedamdesetdvogodišnja bolesnica zaprimljena je u Kliniku za ženske bolesti i porode zbog oskudnog krvarenja. Ultrazvukom je prikazan zadebljani endometrij debljine 15 mm i nešto slobodne tekućine u maloj zdjelici. Materijal dobiven frakcioniranom kiretažom bio je oskudan. Patohistološka analiza

materijala ukazivala je na endometriju sitnostanične strome sa žlijezdama obloženima jednorednim do pseudostratificiranim endometralnim epitelom bez mitotske aktivnosti, te manje nakupine i pojedinačne epitelne stanice umjerene polimorfije jezgara, grubljeg grudastog kromatina. Serumska razina tumorskog biljega Ca125 iznosila je 43,8 U/mL (norm do 35). Mjerenjem Ca125 tijekom sljedećih dvaju mjeseca uočene su niže serumske vrijednosti (Ca125 39,27 U/mL). Ultrazvukom je prikazan ponovo zadebljani endometrij debljine 10 mm sa častog izgleda što ispunjava materišće. Analizom vaginalnog, cervikalnog i endocervikalnog (VCE) citološkog uzorka nije nađena abnormalnost epitela već izražena estrogena stimulacija epitela što je predstavljalo odstupanje s obzirom na dob bolesnice. Ponovljenom frakcioniranom kiretažom materijal je bio vrlo oskudan, a žarišta detritusa s degenerativno promijenjenim epitelnim stanicama bila su nedostatna za dijagnozu. Budući da se



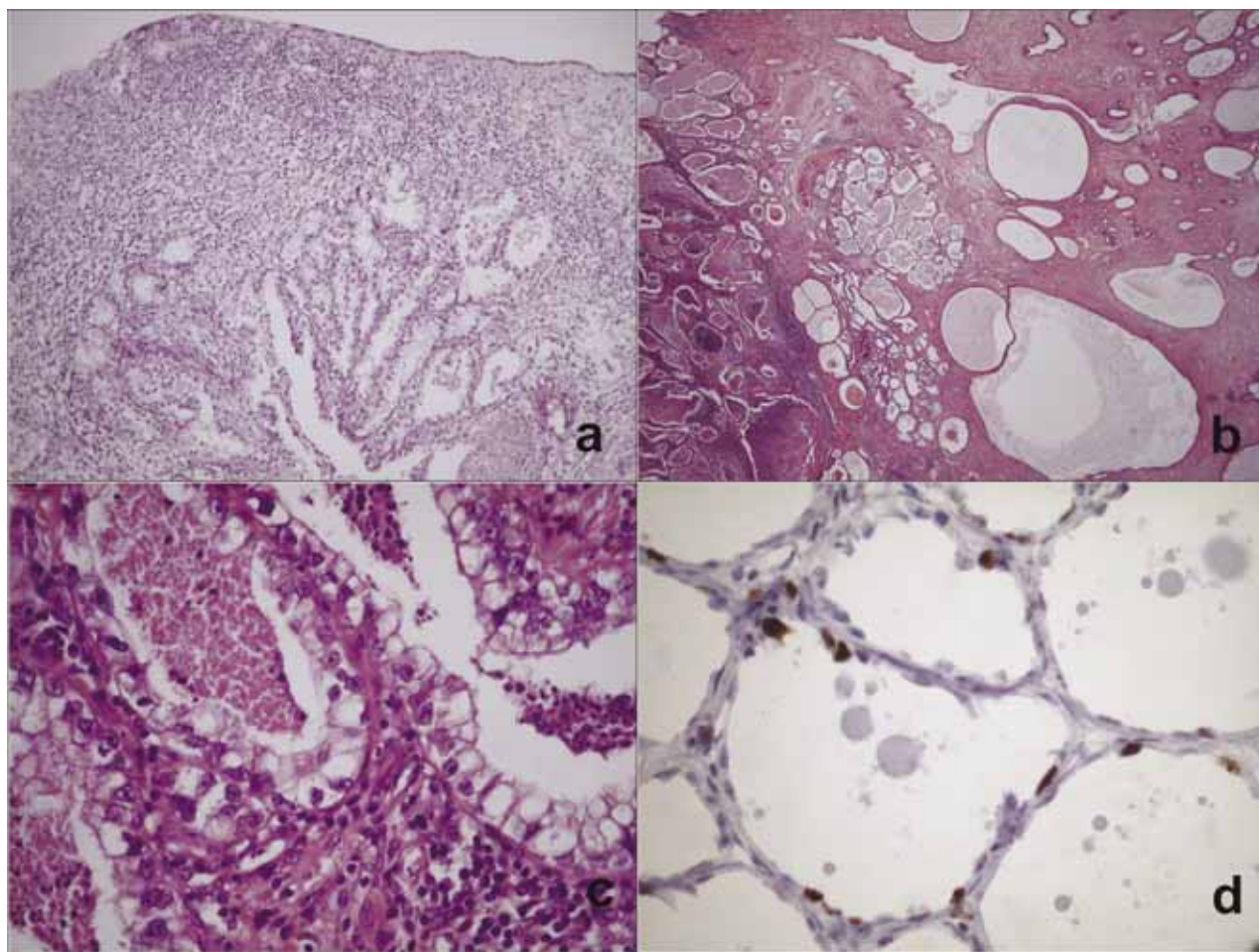
Sl. 2. a,b,c - Patohistološka slika karcinoma svijetlih stanica endometrija u atrofičnom endometralnom polipu (a,b, povećanje x40; c, povećanje x400; bojenje HE). d, imunohistokemijsko bojanje MIB jezgara tumorskih stanica u karcinomu svijetlih stanica endometrija (d, povećanje x 400).

frakcioniranom kiretažom u dva navrata nije dobio zadovoljavajući materijal za patohistološku dijagnozu, paletu dijagnostičkih postupaka se proširilo na primjenu metode direktnog uzimanja materijala materišta četkicom (*uterobrush*). Navedenom metodom dobiveni materijal bio je celularniji. Citološka analiza ukazivala je na nakupine suspektne žlijezdane stanice endocervikalnog tipa, povećanih hiperkromatskih jezgara s naglašenim nukleolima (sl. 1a,b,c,d), kao i pojedinačne atipične gole jezgre izraženih nukleola i gustog kromatina.

U pozadini preparata prevladavaju histiociti i stara krv. S obzirom na opisane promjene u materijalu materišta postavila se dijagnoza suspektne intraepitelne lezije, adenokarcinoma endocervikalnog tipa. Na temelju navedenog te suspektne ultrazvučnog nalaza učinjena je histerektomija s obostranom adnektomijom. Intraoperativnom citološkom analizom ispirka peritoneja nisu bile nađene morfološki suspektne stanice. Patohisto-

loškom analizom na presjeku u kavumu materništa uočila se polipozna tvorba veličine 4x3,5x1,5 cm glatke površine, na presjeku pseudocistična sa solidnim žarištem promjera 1 cm. Morfološki je polipozna tvorba bila građena od rahle vezivne strome unutar koje su se nalazile žlijezde obložene atrofičnim endometralnim epitelom te je promjena ukazivala na atrofični endometralni polip. Opisano solidno žarište bilo je građeno od umnoženih žlijezdanih formacija obloženim atipičnim epitelnim stanicama srednje obilnih svijetlih citoplazmi, hiperkromatskih jezgara s izraženim nukleolima i tek po kojim „*hobnail*“ formacijom uz prisutan stanični detritus (sl. 2 a,b,c,d).

Tumor je dopirao do površine polipozne tvorbe ali bez vaskularne invazije kao i invazije miometrija. Imunohistokemijskim bojanjem MIB (DakoCytomation Denmark) 20-30% jezgara tumorskih stanica bilo je pozitivno. Na temelju morfološke slike postavilo se dijagnozu karcinoma svijetlih stanica



Sl. 1. Citološka slika malignih svijetlih stanica u endometriju dobivenih uterobrushom (bojenje a. po MGG x400; b,c,d po Papanicolaou x400)

endometrija. S obzirom na ograničenost malignog procesa nije bilo potrebno dodatno liječenje bolesnice već redovite kliničke i ultrazvučne kontrole u kojima su tijekom petnaest mjeseci nalazi bili u granicama normale.

RASPRAVA

Karcinom svijetlih stanica endometrija karakteriziran je malignim, svijetlim stanicama - „clear cell“, koje citološki nije uvijek moguće prepoznati zbog slabije diferenciranosti stanica, raznolikosti histoloških tipova tumora endometrija, prisutnosti različitih tumorskih komponenata u istom uzorku kao i veličine i proširenosti tumorskog procesa (7-12). U prikazu ovog slučaja primjenom metode frakcionirane kiretaže u dva navrata uzorak za patohistološku analizu nije bio dostatan za potvrdu malignog procesa te je indicirano uzimanje materijala iz materijala četkicom (*uterobrush*). U literaturi rezultati direktnog uzimanja materijala iz materijala četkicom ukazuju na pouzdanost metode jer je materijal obilniji i celularniji što se i potvrdilo u prikazu ove bolesnice (13-16). Aspiratom je dobiven dostatan materijal, brojne očuvane epitelne stanice suspektne na adenokarcinom endocervikalnog podrijetla. Brojni autori navode direktno uzimanje materijala iz materijala četkicom korisnom i često upotrebljavanom metodom u analiziranju endometralnih promjena (8,-19). U studiji Klemija i sur. osjetljivost analize navedenih citoloških obri-saka u dijagnostici malignih procese bila je 91,7%, a specifičnost 92,4% (20). Razlog visokog postotka dijagnostičke točnosti je upravo taj što i nekoliko tumorskih stanica na citološkim preparatima omogućuje dijagnozu malignog procesa, a to se potvrdilo i u ovom slučaju. Osjetljivost i specifičnost dijagnosticiranja malignog procesa povećava se upotrebom citoloških i patohistoloških metoda u analizi materijala (20). Kei i sur. su prikazali slučaj endometralnog karcinoma ograničenog u fundusu materijala. Uzimanje materijala i posljednja patohistološka analiza bila je otežana zbog položaja tumora u materijalu, dok je uzimanje materijala direktnom metodom četkice iz endometrija i postavljanje citološke dijagnoze bilo olakšano (21). Mogućnost analize pozadine preparata još je jedan od razloga koji pomažu u točnijoj dijagnozi

u citološkim uzorcima. U našem slučaju u pozadini citološkog preparata bilo je obilje stare krvi i pjenušavih histiocita, ali bez znakova tumorske dijateze i bez kontaminacije stanicama endocerviksa. U literaturi se navodi, da iako je tumor minimalan ili bez nekroze i krvarenja, tumorska dijateza je češće vidljiva u citološkim preparatima (16). U prikazanom slučaju citološkom analizom materijala postavljena sumnja na neoplastični proces pokazala se točnom, ali bez subtipizacije histološkog tipa karcinoma. S obzirom da je KSS endometrija rijedak tumor, a drugi histološki tipovi tumora endometrija kao i netumorske lezije mogu sadržavati svijetle stanice dijagnoza KSS endometrija je otežana (22). U skupinu netumorskih lezija koje predstavljaju dijagnostičke poteškoće ubrajaju se mikroglandularna hiperplazija i fenomen Arias-Stella endometralnih stanica. Diferencijalnu poteškoću daju i tumori kao što su stromalni tumori glatkih mišića, disgerminom, metastatski tumori bubrega i trofoblastični tumor (22). Diferencijalno dijagnostički dolazi u obzir i sekretorni tip karcinoma endometrija, serozni karcinom te karcinom žumanjčane vreće.

Analizom imunocitokemijskog i imunohistokemijskog bojanja opisanih promjena olakšano je, ali u nekim slučajevima ne i u potpunosti omogućeno, razlikovanje navedenih od KSS endometrija. U KSS-a endometrija p53 češće je pozitivan nego u seroznog karcinoma endometrija, a od tumora žumanjčane vreće razlikuje se po izostanku karakterističnih Schiller-Duvalovih tjelešaca i nedostatku alfa-fetoproteina u serumu (23). U ovom slučaju imunohistokemijskim bojanjem MIB 20-30% jezgara tumorskih stanica bilo je pozitivno što se podudara s rezultatima u literaturi (24).

Petogodišnje preživljenje bolesnica oboljelih od KSS-a endometrija kreće se u rasponu od 21% do 75% (6,-27). Uzrok takvog širokog raspona preživljenja je taj što su korišteni različiti kriteriji za dijagnozu KSS. Pristup liječenju karcinoma svijetlih stanica endometrija identičan je tipu liječenja endometroidnog tipa adenokarcinoma endometrija. Dodatno liječenje radioterapijom ili kemoterapijom je individualno (1). U ovom slučaju u bolesnice nije učinjena dodatna radioterapija, jer je tumor bio ograničen na endometriju, bez znakova invazije u miometriju. Bolesnica se kontrolirala kliničkim pregledima i kontrolama ultrazvukom u šestomjesečnim razmacima.

ZAKLJUČAK

Usprkos oskudnim rezultatima citološke dijagnostike karcinoma svijetlih stanica endometrija u literaturi, mišljenja smo da je metodu direktnog uzimanja uzorka iz materijala četkicom i njegovu citološku analizu opravdano koristiti u dijagnostičkom protokolu endometralnih tumora, jer ne samo da upućuje na krajnju dijagnozu već i skraćuje vrijeme dijagnostičke obrade u bolesnica. Važan razlog je visoki postotak dijagnostičke osjetljivosti metode što je potvrđeno i u drugim studijama, jer se maligni proces može potvrditi samo na temelju nekoliko tumorskih stanica u citološkim preparatima.

LITERATURA

1. Gadducci A, Cosio S, Spirito N, Cionini L. Clear cell carcinoma of the endometrium: a biological and clinical enigma. *Anticancer Research* 2010; 30: 1327-34.
2. Abeler VM, Vergote IB, Kjørstad KE, Trope CG. Clear cell carcinoma of the endometrium. Prognosis and metastatic pattern. *Cancer* 1996; 78: 1740-47.
3. Silverberg SG, De Giorgi LS. Clear cell carcinoma of the endometrium. Clinical, pathologic, and ultrastructural findings. *Cancer* 1973; 31: 1127-40.
4. Kurman RJ, Scully RE. Clear cell carcinoma of the endometrium: an analysis of 21 cases. *Cancer* 1976; 37: 872-82.
5. Katzenstein AA, Mazur MT, Morgan TE i sur. Proliferative serous tumors of the ovary. Histological features and prognosis. *Am J Surg Pathol* 1978; 2: 339-55.
6. Hung WC, Chai CY, Huang al i sur. Expression of cyclin D1 and c-Ki-ras gene product in human epithelial ovarian tumors. *Hum Pathol* 1996; 27:1324-28.
7. Koss LG, Schreiber K, Oberlander SG, Moursouris HF, Lesser M. Detection of endometrial carcinoma and hyperplasia in asymptomatic women. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 335-40.
8. Kuebler DL, Nikrui N, Bell DA. Cytologic features of endometrial papillary serous carcinoma. *Acta Cytol* 1989; 33: 120-6.
9. Kusuyama Y, Yoshida M, Imai H, Kosomichi T, Mabuchi Y, Yokota H. Secreting carcinoma of the endometrium. *Acta Cytol* 1989; 33: 127-30.
10. Lozowski MS, Mishriki Y, Solitare GB. Factors determining the degree of endometrial exfoliation and their diagnostic implications in endometrial adenocarcinoma. *Acta Cytol* 1986; 30: 623-7.
11. Reagan JW, Ng ABP. The cells of endometrial cancer. U: Wied GL, Keebler CM, Koss LG, Reagan JW, ur. *Compendium on Diagnostic Cytology: Tutorials of Cytology*. Chicago, Illinois: Tutorials of Cytology, 1988, 194.
12. Schneider ML, Wortmann M, Weigel A. Influence of the histologic and cytologic grade and the clinical and postsurgical stage on the rate of endometrial carcinoma detection by cervical cytology. *Acta Cytol* 1986; 30: 616-22.
13. Bibbo M. The vakutage method in the detection of endometrial cancer and its precursors. U: Wied GL, Keebler CM, Koss LG, Reagan JW, ur. *Compendium on Diagnostic Cytology: Tutorials of Cytology*. Chicago, Illinois: Tutorials of Cytology, 1988, 213.
14. Milan AR, Markley RL. Endometrial Cytology by a new technic. *Obstet Gynecol* 1973; 42: 469-75.
15. Palermo VG. Interpretation of endometrium obtained by the endo-Pap sampler and a clinical study of its use. *Diag Cytopathol* 1985; 1: 5-12.
16. Alan BP, Ng AB. Endometrial hyperplasia and carcinoma and extrauterine cancer. U: Bibbo M, ur. *Comprehensive Cytopathology: Endometrial carcinoma. Cytology from Direct Endometrial Samples*. Philadelphia: WB Saunders, 1991, 270-9.
17. Kaunitz AM, Masciello AS, Ostrowski M, Rovira EZ. Comparison of endometrial biopsy with the endometrial Pipelle and Vabra aspirator. *J Reprod Med* 1988; 33: 427-31.
18. LaPolla JP, Nicosia S, McCurdy C i sur. Experience with the Endopap device for the cytologic detection of uterine cancer and its precursors: A comparison of the EndoPap with fractional curettage and hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 29: 297-30219.
19. Iversen OE, Segadal E. The value of endometrial cytology. A comparative study of the Gravlee Jet-Washer, Isaacs cell sampler, and endoscan versus curettage in 600 patients. *Obstet Gynecol Surv* 1985; 40: 14-20.
20. Kondo E, Tabata T, Koduka Y i sur. What is the best method of detecting endometrial cancer in outpatients?-endometrial sampling, suction curettage, endometrial cytology. *Cytopathology* 2008; 19: 28-33.
21. Kei K, Manabu Y, Haruko J i sur. Diagnostic usefulness of endometrial aspiration cytology for endometrial cancer cases with normal curettage findings. *Acta Cytol* 2005; 49: 509-12.
22. Vang R, Barner R, Wheeler DT, Strauss BL. Immunohistochemical staining for Ki-67 and p53 helps distinguish endometrial Arias-Stella reaction from high-grade carcinoma, including clear cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 223-33.
23. Ronnett BM, Zaino RJ, Hedrick Ellenson L, Kurman RJ. Endometrial carcinoma. Clear cell carcinoma. U: Kurman RJ, ur. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. New York: Springer, 2002, 535-38.
24. Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, Kurman RJ. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen and progesterone receptors. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 103-11.

terone receptor expression. Hum Pathol 1998; 29: 551-8.

25. Afzal S, Lalani EN, Poulsom R i sur. MT1-MMP and MMP-2 mRNA expression in human ovarian tumors. Possible implications for the role of desmoplastic fibroblasts. Hum Pathol 1998; 29: 155-65.

26. Boyle P, Maisonneuve P, Autier P. Towards cancer control in woman. J Epidemiol Biostat 1998; 3: 137-68.

27. Chuaqui RF, Zhuang Z, Emmert-Buck MR i sur. Genetic analysis of synchronous mucinous tumors of the ovary and appendix. Hum Pathol 1996; 27: 165-71.

S U M M A R Y

CLEAR CELL CARCINOMA OF THE ENDOMETRIUM CONFINED TO ATROPHIC ENDOMETRIAL POLYP - CASE REPORT

S. KATALENIĆ-SIMON¹, I. KRIVAK-BOLANČA¹, K. ŠENTIJA¹,
G. ZOVKO², M. PODGAJSKI², J. VALETIĆ² and A. ŠKRTIĆ^{3,4}

¹*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cyto genetics, Division of Gynecological Cytology and Cyto genetics,* ²*Department of Gynaecology and Obstetrics,* ³*Department of Clinical Pathology and Cytology and* ⁴*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Clear cell carcinoma is a rare form of endometrial carcinoma inline type II estrogen-independent. It accounts for only 1% to 5.5% of all endometrial carcinomas. It is usually detected in postmenopausal women, who are older than those with endometrioid carcinoma. Clear cell carcinoma may exhibit solid, papillary, tubular and cystic patterns. The malignant cells are characterized by a moderate amount of clear or foamy cytoplasm; however, its recognition as a clear cell type of cancer cytologically is not often possible. The tumor is usually poorly differentiated, tends to be high grade, with deep myometrial invasion, lymphovascular space invasion, and metastasis in pelvic lymph node. That is why this tumor has a poor prognosis, as in our case of a 72-year-old woman with symptoms of deficient uterine bleeding. In a period of two months, two suction endometrial curettages were performed. The material obtained by endometrial curettage for histopathologic verification was very scanty. The assessment described an inactive endometrium with degenerative epithelial cells in scanty necrotic background. Direct endometrial samples with uterobrush yielded a finding of atypical epithelial cells of open etiology with dense chromatin and prominent nucleoli, also with foam cell histiocytes and old blood in the background. Cytologic diagnosis of intraepithelial lesion, possible adenocarcinoma was made. Ultrasonography of the uterus was suspect of neoplasm. After surgery, the pathologic diagnosis of endometrial clear cell carcinoma was made. It was a rare case of aggressive type of endometrial carcinoma confined to an atrophic endometrial polyp. In conclusion, we might say that direct endometrial sample can provide accurate diagnosis of endometrial tumor, especially when the endometrial tumor is a small one, thus saving time for diagnostic testing. This is based on the potential of cytology to make malignant diagnosis possible even with a few tumor cells on the slide.

Key words: endometrial cytology, uterobrush, endometrial clear cell carcinoma

HEPATOCELULARNI KARCINOM PRIMARNO DIJAGNOSTICIRAN CITOLOŠKOM PUNKCIJOM METASTATSKOG PROCESA U ZDJELIČNOJ KOSTI

BRANISLAV KOCMAN¹, IKA KARDUM-SKELIN^{2,6}, TAJANA FILIPEC-KANIŽAJ^{3,6},
ANNA MRZLJAK^{3,6}, SLAVICA NAUMOVSKI-MIHALIĆ³, ŽELJKO VIDAS⁴,
DRAGICA OBAD KOVAČEVIĆ⁵ i IVICA KOCMAN¹

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za kirurgiju, ²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, ³Klinika za unutarnje bolesti, ⁴Služba za urologiju, ⁵Zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju i ⁶Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Hepatocelularni karcinom (HCC) u većini se slučajeva pojavljuje u bolesnika sa cirozom jetre nastalom zbog kronične infekcije virusom hepatitisa C (HCV). Opisujemo slučaj bolesnika s hepato-renalnim sindromom nastalim kao posljedica ciroze na bazi HCV infekcije, kod kojeg primarni tumor u jetri nije dijagnosticiran rutinskom obradom, već je dijagnoza postavljena citološkom punkcijom opsežne osteolitičke promjene u zdjeličnoj kosti u sklopu preoperativne transplantacijske obrade. Zbog neadekvatnosti donorske jetre (zbog tromboze arterije hepaticke) odustalo se od transplantacijskog zahvata te je bolesnik vraćen na konzervativnu terapiju. Iako metastaze HCC nisu rijetke, rijetko se nađe opsežna koštana infiltracija, a da se primarni tumor dostupnim metodama ne dijagnosticira rutinski.

Ključne riječi: hepatocelularni karcinom, koštane metastaze, citološka punkcija

Adresa za dopisivanje: Branislav Kocman, dr. med.
Klinika za kirurgiju
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10 000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 2253 321
E-pošta: branislav.kocman@kb-merkur.hr

UVOD

Hepatocelularni karcinom (HCC) je primarni maligni tumor jetre podrijetla stanica jetrenog parenhima (1). U oko 80% novodijagnosticiranih slučajeva prisutna je ciroza jetre, najčešće uzrokovana alkoholom te virusom hepatitisa B (HBV) ili C (HCV) (2). Brojne epidemiološke studije opisuju jasnu vezu između kronične viralne infekcije i nastanka HCC (3). Vaskularna invazija i hepatitis C statistički su značajni neovisni čimbenici preživljenja i recidiva bolesti. HCC metastazira najčešće u pluća, regionalne limfne čvorove, peritoneum i nadbubrežne žlijezde. Incidencija koštanih metastaza HCC je vrlo niska, a ako su prisutne prema učestalosti najčešće su u kralješcima, nakon čega slijede zdjelica i rebra (4). Osim resekcije jetre, ortotropna

transplantacija jetre (OLT) je terapija izbora za bolesnike s HCC i uznapređovalom jetrenom bolesti. Uprkos napretku u dijagnostici i liječenju, dugoročna prognoza uznapređovalog HCC s metastazama još je uvijek loša.

PRIKAZ BOLESNIKA

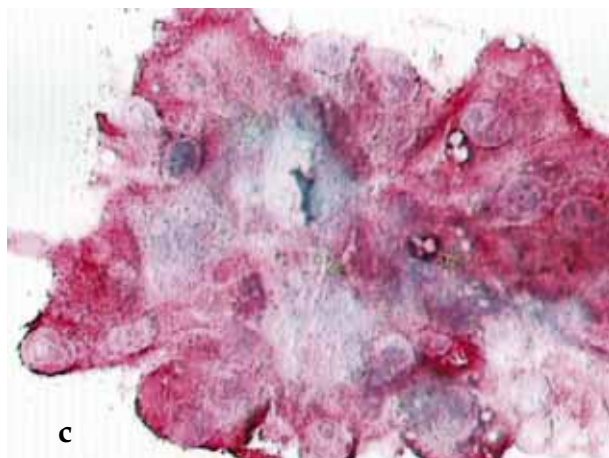
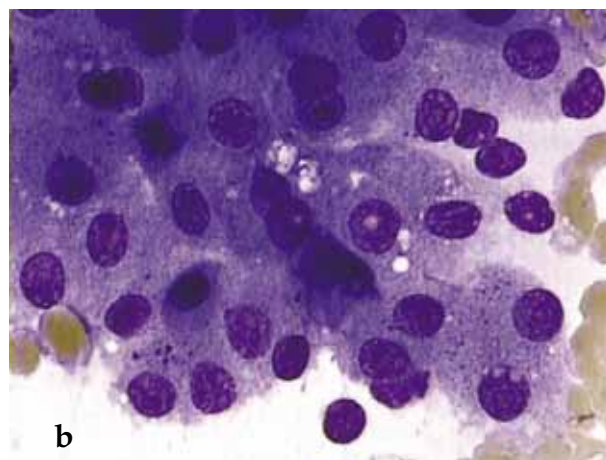
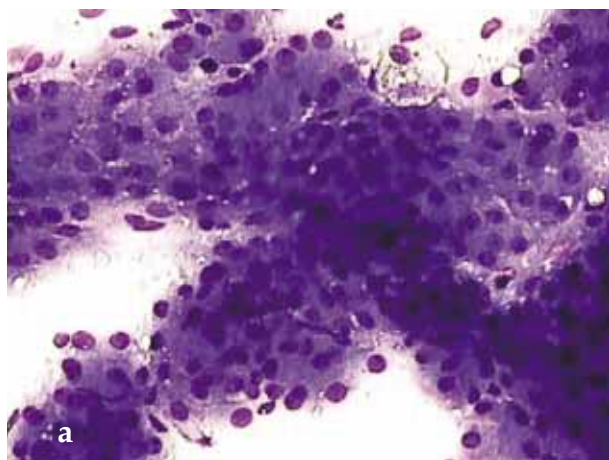
Bolesniku je 2002. godine ustanovljena HCV-RNA pozitivna ciroza jetre, tada već prisutna portalna hipertenzija s hipersplenizmom i trombocitopenijom zbog čega je bila kontraindicirana antiviralna terapija. U 11. mjesecu 2006. godine prvi put je bila prisutna hepatalna dekompenzija uz izrazito visok

ikterus i subjektivno svrbež kože. Unatoč evakuaciji ascitesa i diuretskoj terapiji, ascites je bio refraktoran te se bolesnik stavlja na listu za transplantaciju jetre.

Godine 2007., tada u dobi od 54 godine, primljen je u Jedinicu intenzivne skrbi u KB Merkur s kliničkom slikom hepato-renalnog sindroma.

U laboratorijskim nalazima bile su prisutne visoke vrijednosti aspartat-aminotransferaze (AST) 318 U/L (referentne vrijednosti 11-38); alanin-aminotransferaze (ALT) 738 U/L (referentne vrijednosti 12-48); ukupnog bilirubina 50 μ mol/L (referentne vrijednosti 3-20); ureje 29,4 mmol/L (normalne vrijednosti 2,8-8,3); kreatinina 420 μ mol/L (referentne vrijednosti 79-125) te blago povišena vrijednost alkalne fosfataze (ALP) 145 U/L (referentne vrijed-

nosti 60-142). Ultrazvučni nalaz jetre prikazao je jetru nepravilnih kontura, makronodularne građe, difuzno hiperehogenije, grublje inhomogene strukture, ali bez jasnih UZV znakova za postojanje žarišnih lezija. Vrlo sličan nalaz nađen je i na CT-u gdje je jetra bila također nehomogene strukture, bez jasno vidljivih žarišnih lezija na nativno učinjenim presjecima (zbog tehničkih razloga nije se mogla učiniti kontrastna pretraga). Međutim, na CT slikama zdjelice bila je vidljiva opsežna osteoliza desne crijevne kosti koja je dopirala do desnog sakro-ilijačnog zgloba što se potvrdilo i ultrazvučnim pregledom parasakralnog područja uz desno krilo ilijačne kosti, gdje se u komparaciji s lijevom stranom našla destrukcija kosti s vidljivom mekotkivnom inhomogenom i neoštro ograničenom masom koja je mjerila oko 10x4 cm. Učinjena je citološka punkcija pod kontrolom ultrazvuka iglom za punkciju koštane srži uz primijenjenu lokalnu



Slika 1. Hepatocelularni karcinom u punktatu metastatskog procesa iz zdjeljenoj kosti: a) May-Grünwald Giemsa, x400; b) May-Grünwald Giemsa, x1000; c) imunocitokemijski izrazito pozitivne stanice na alfa fetoprotein, LSAB, x1000; d) imunocitokemijski izrazito pozitivne stanice na CK18, LSAB, x1000

anesteziju 2%-tnom otopinom ksilokaina. U izrazito celularnim razmazima nađene su brojne nakupine atipičnih stanica sličnih hepatocitima (sl. 1a), ali izražene anizonukleoze, vidljivih nukleola, obilnije bazofilne citoplazme s vidljivim zrcima žučnog pigmenta (sl. 1b). Imunocitokemijskom obradom stanice su pokazivale pozitivnost na α -feto protein (AFP) (sl. 1c), CK18 (sl. 1d), CK8, a bile su negativne na CK19, Ca19,9 i CEA. Nalaz je odgovarao hepatocelularnom karcinomu. Učinjena analiza tumorskih biljega pokazala je uredne vrijednosti CEA 2,0 (referentne vrijednosti 0-3 ng/mL) i Ca19,9 12 (referentne vrijednosti 0-37 kIU/L) te porast AFP 12 (referentne vrijednosti <5,8 kIU/L).

Zbog neadekvatnosti donorske jetre (zbog tromboze arterije hepaticke) i metastatskog procesa u području ilijačne kosti odustalo se od transplantacijskog zahvata te je bolesnik premješten na Kliniku za unutarnje bolesti na konzervativnu terapiju. S obzirom na opće stanje bolesnika bila je indicirana palijativna antidolorozna iradijacija u dvije frakcije s ukupno planiranom dozom TD 1200 cGy/2x. Bolesnik je bio u Salzburgu zbog konzultacije, ali radioterapija nije bila realizirana, budući da je vrlo brzo došlo do hepatalne kome te umire unutar mjesec dana od postavljanja dijagnoze metastatskog hepatocelularnog karcinoma.

RASPRAVA

Hepatocelularni karcinom je karcinom rasprostranjen diljem svijeta s visokom pojavnosti u područjima s visokom rasprostranjenosti kronične virusne infekcije jetre, posebno hepatitis B i C virusom. U slučajevima HCC sa cirozom, HCV infekcija je prisutna u 27-73%, a u bolesnika s HCC bez ciroze, HCV infekcija u 3-54% (5). HCC je najčešći primarni tumor jetre koji ima preživljenje manje od godine dana nakon primarne dijagnoze u neliječenim slučajevima. Metastaze HCC u različitim organima se često viđa, u više od polovice tumora prisutne su regionalne metastaze (6). Pluća, regionalni limfni čvorovi, bubrezi, kosti i suprarenalne žlijezde su relativno česta mjesta (7). Koštane metastaze HCC-a prema nekim autorima čine oko 14-28% svih me-

tastatskih lokalizacija te neoplazme, locirane u ilijačnoj kosti, femuru, humerusu i rebrima. Zadnjih godina opisuju se i neobične lokacije kao čeljusti, desni, lubanja, falanga prsta itd. (8). Koštane metastaze HCC, osim u sklopu diseminacije same bolesti, mogu se naći i u slučajevima klinički neprepoznatog tumora u jetri (9,10). U slučajevima citološke dijagnostike dijagnoza se potvrđuje imunocitokemijski pozitivnom reakcijom na AFP (11), izrazito specifičan za HCC, osim za hepatoidnu varijantu tumora žumanjčane vreće. Ti se posljednji razlikuju po tome što se češće javljaju u mlađoj populaciji, a imunocitokemijski su pozitivni na placentarnu alkalnu fosfatazu (PLAP). U diferencijalnoj dijagnozi dobro diferencirani hepatocelularni karcinom može biti problem prema regenerativnim i/ili reparatornim promjenama te hepatocelularnim adenomima u punktatu jetre, ali nije dijagnostički problem prema metastatskim promjenama. Umjereni diferencirani i slabo diferencirani HCC velikih stanica je diferencijalno-dijagnostički problem prema metastatskim karcinomima, metastatskim tumorima germinativnog podrijetla i melanomu. Slabo diferencirani HCC malih stanica treba odvojiti od metastatskih malostaničnih karcinoma s neuroendokrinom diferencijacijom, metastatskih lobularnih karcinoma dojke i malignih limfoma. Osim AFP i PLAP, ranije spomenutih, ostali monoklonalni biljezi korisni u diferencijalnoj dijagnozi ostalih primarnih i metastatskih tumora su: panleukocitni biljeg - LCA, nisko- i visokomolekularni citokeratini, tireoglobulin, vimentin, S-100, HMB45, karcinoembrionalni antigen (CEA), hormonski receptori dojke (estrogeni i progesteroni), neuron specifična enolaza (NSE), tumorski biljezi (PSA, Ca 19,9) (9). Definitivna dijagnoza HCC indicira ultrazvučnu i/ili CT pretragu jetre te određivanje razine AFP u serumu (12). Hepatocelularni karcinom je drugi najčešći primarni tumor jetre u djece starije od 4 godine. Opisane su multiple koštane metastaze u 11-godišnjeg djeteta (13). Opisani su slučajevi HCC u ilijačnoj kosti bez dokaza primarnog tumora pri dijagnozi te povoljnog ishoda i 10 godina nakon terapije kemoembolizacijom i radioterapijom, nakon koje je nastala kompletna regresija tumora u zdjeličnoj kosti (14). Postoji mišljenje da bi HCC uvijek trebalo uzeti u obzir u diferencijalnoj dijagnozi bolesnika koji se prezentiraju s koštanim metastazama (15).

U našem slučaju hepatocelularni karcinom je inicijalno dijagnosticiran citološkom punkcijom iz metastatskog procesa u zdjeličnoj kosti u sklopu preoperativne pripreme za ortotopnu transplantaciju jetre u bolesnika s hepato-renalnim sindromom nastalim zbog ciroze jetre uzrokovane HCV infekcijom. I nakon dodatne obrade ultrazvukom i CT, osim nehomogene strukture jetre nije se našlo lokalizirane lezije, ali je naknadno učinjen AFP bio povišen.

ZAKLJUČAK

Citološka punkcija je pouzdana tehnika za brzu dijagnostiku gotovo svakog organa u tijelu, uključujući i lezije na kostima. U slučaju hepatocelularnog karcinoma bilo primarnog ili metastatskog tumora uz karakterističnu citološku sliku, imunocitokemijska analiza pomaže u definitivnoj dijagnozi.

LITERATURA

1. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA i sur. *Cancer. U: Principles and Practice of Oncology*. 8th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, 1.
2. El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000; 160: 3227-30.
3. Benvegna L, Gios M, Boccatto S, Alberti A. Natural history of compensated viral cirrhosis: a prospective study on the incidence and hierarchy of major complications. *Gut* 2004; 53: 744-9.
4. Takashi G, Takahiro D, Kouichi M i sur. Skull metastasis from hepatocellular carcinoma with chronic hepatitis B. *World J Gastrointest Oncol* 2010; 2: 165-8.
5. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. He-

patocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: 35-50.

6. Dinesh Chandra Doval, Komal Bhatia, Ashok Kumar Vaid, Kumar Prabhash, Amarnath Jena, Digant Hazarika. Bone metastases from primary hepatocellular carcinoma simulating multiple myeloma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 308-10.

7. Duggal R, Garg M, Kalra N, Srinivasan R, Chawla Y. Spleen metastasis from hepatocellular carcinoma: report of a case with diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 2010; 54: 783-6.

8. Fontana T, Siciliano M, Franceschelli A, Annicchiarico BE, Rossi P, Bigotti G, Bombardieri G. An atypical bone metastasis of hepatocellular carcinoma: case report and review of the literature. *Clin Ter* 2004; 155: 447-51.

9. Suterwala S, Volk EE, Danforth RD. Aspiration biopsy of osseous metastasis of occult hepatocellular carcinoma: Case report, literature review, and differential diagnosis. *Diagn Cytopathol* 2001; 25: 63-7.

10. Ascani S, Liberati F, Farabi R, Cristallini EG. Fine needle aspiration biopsy diagnosis of a bone metastasis from an occult carcinoma of the liver. A case report. *Acta Cytol* 1995; 39: 547-9.

11. Gattuso P, Reyes CV. Fine needle aspiration cytology of hepatocellular carcinoma manifested as bone metastasis. *South Med J* 1989; 82: 793-5.

12. Omura K, Kawaura Y, Murakami N, Morita K, Iwa T, Sasaki S. A hepatocellular carcinoma revealed by paraplegia caused by a vertebral metastasis. *Gan No Rinsho* 1989; 35: 1448-52.

13. Lucarini S, Fortier M, Leaker M, Chhem R. Hepatocellular carcinoma bone metastasis in an 11-year-old boy. *Pediatr Radiol* 2008; 38: 111-4.

14. Junko Takahama, Toshiaki Taoka, Nagaaki Marugami i sur. Hepatocellular carcinoma of the iliac bone with unknown primary. *Skeletal Radiology*, Volume 39, Number 7, 721-724, DOI: 10.1007/s00256-010-0891-7.

15. Attili VS, Babu KG, Lokanatha D, Bapsy PP, Ramachandra C, Rajshekar H. Bone metastasis in hepatocellular carcinoma: need for reappraisal of treatment. *J Cancer Res Ther* 2008; 4: 93-4.

S U M M A R Y

HEPATOCELLULAR CARCINOMA INITIALLY DIAGNOSED BY FINE NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY OF THE PELVIC BONE METASTASIS

B. KOCMAN¹, I. KARDUM-SKELIN^{2,6}, T. FILIPEC-KANIŽAJ^{3,6}, A. MRZLJAK^{3,6},
S. NAUMOVSKI-MIHALIĆ³, Ž. VIDAS⁴, D. OBAD KOVAČEVIĆ⁵ and I. KOCMAN¹

*¹Merkur University Hospital, Department of Surgery, ²Department of Clinical Cytology and
Cytogenetics, ³Department of Internal Medicine, ⁴Department of Urology, ⁵Institut of Diagnostic
and Interventional Radiology and ⁶University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Hepatocellular carcinoma mostly develops in patients with liver cirrhosis due to chronic hepatitis C virus (HCV) infection. A case is presented of a patient with hepatorenal syndrome as a sequel of liver cirrhosis due to HCV infection. Primary tumor of the liver was not diagnosed by routine procedures, but by fine needle aspiration cytology of the extensive osteolytic lesion of the pelvic bone, performed as part of the pre-transplantation workup. Transplantation procedure was abandoned because of inappropriate donor liver (hepatic artery thrombosis), and palliative pain-relieving irradiation was recommended. However, hepatic coma developed very rapidly and the patient died within a month of the diagnosis of metastatic hepatocellular carcinoma. Although hepatocellular carcinoma metastases are not rare, massive bone infiltration from a primary tumor undetectable by routine methods is not frequently encountered.

Key words: hepatocellular carcinoma, bone metastases, fine needle aspiration cytology

MULTIFOKALNI EPITELOIDNI HEMANGIOENDOTELIOM JETRE LIJEČEN ORTOTOPNOM TRANSPLANTACIJOM JETRE – PRIKAZ BOLESNIKA

BRANISLAV KOCMAN¹, IKA KARDUM-SKELIN^{2,5}, TAJANA FILIPEC-KANIŽA^{3,5},
DINKO ŠKEGRO³, ŽELJKO VIDAS⁴, STIPE JADRIJEVIĆ¹ i VESNA ČOLIĆ-CVRLJE^{3,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za kirurgiju, ²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku, ³Klinika za unutarnje bolesti, ⁴Služba za urologiju i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Multifokalni epiteloidni hemangioendoteliom (HE) jetre je rijetki primarni tumor različitog tijeka bolesti. Opisujemo slučaj 27-godišnje bolesnice s multiplim ultrazvučnim promjenama u jetri suspektnima na metastatski tumor jetre. Tumorski biljezi u serumu nisu bili povišeni, a klinička obrada pluća, gastrointestinalnog i ginekološkog trakta nisu potvrdili postojanje primarnog procesa. Učinjena je citološka punkcija koja je isključila metastatski proces, kao i primarni tumor jetrenih stanica. Citomorfološka slika uz karakterističan imunofenotip endotelnih stanica krvnih žila (pozitivnost na CD31 i CD34) te visoku proliferativnost dokazanu analizom regija nukleolarne organizacije (AgNOR-a) i DNA aneuploidiju upućivala je na dijagnozu angiosarkoma. Patohistološki nalaz je odgovarao epiteloidnom hemangioendoteliju. Deset godina nakon ortotopne transplantacije jetre bolesnica je na redovitim kontrolama bez recidiva bolesti. HE u jetri karakterizira multifokalnost, što isključuje resekciju te je transplantacija jetre metoda izbora. Naročito zbog toga je preoperativna dijagnostika izuzetno važna za njegovo razlikovanje u diferencijalnoj dijagnozi hemangioendotelioma prema drugim primarnim i metastatskim tumorima jetre.

Ključne riječi: epiteloidni hemangioendoteliom, citološka punkcija, transplantacija jetre

Adresa za dopisivanje: Branislav Kocman, dr. med.
Klinika za kirurgiju
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10 000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 2253 321
E-pošta: branislav.kocman@kb-merkur.hr

UVOD

Epiteloidni hemangioendoteliom (HE) je rijetki tumor krvožilnog podrijetla, koji može zahvatiti kosti, jetru, bubrege, duboka meka tkiva, mišiće, kožu i centralni živčani sustav. Multifokalna bolest se nađe u oko 10% slučajeva (1). Weiss and Enzinger su HE po prvi put 1982. godine opisali u jetri kao poseban entitet (2,3). Javlja se u dobi od 12 do 86 godina, češće u žena nego muškaraca s omjerom 2:1. Oralna kontracepcija se spominje kao mogući uzrok u mladih žena, ali bez jasne potvrde. Bolest se manifestira nelagodnom i bolovima u gornjem dijelu abdomena, gubitkom na tjelesnoj težini, hepatomegalijom, a rijetko s Budd-Chiarijevom sindromom.

PRIKAZ BOLESNICE

Bolesnica u dobi od 27 godina primljena je na Kliniku za unutarnje bolesti KB Merkur 2001. godine radi sumnje na metastatski proces u jetri nepoznatog primarnog sijela. Od kraja 1999. godine imala je bolove u epigastriju koji su se širili pod oba rebrena luka, a godinu dana prije hospitalizacije izgubila je 8 kg. Tada učinjenom obradom (ultrazvukom i kompjuteriziranom tomografijom) prikazalo se povećana jetra s brojnim žarišnim lezijama u oba režnja promjera 15-25 mm (sl. 1). U laboratorijskim nalazima nađene su normalne vrijednosti bilirubina, aspartat aminotrasferaze (AST) i alanin aminotrasferaze (ALT); blago povišene vrijednosti gama-glutamil-transpeptidaze (GGT) 63 U/L

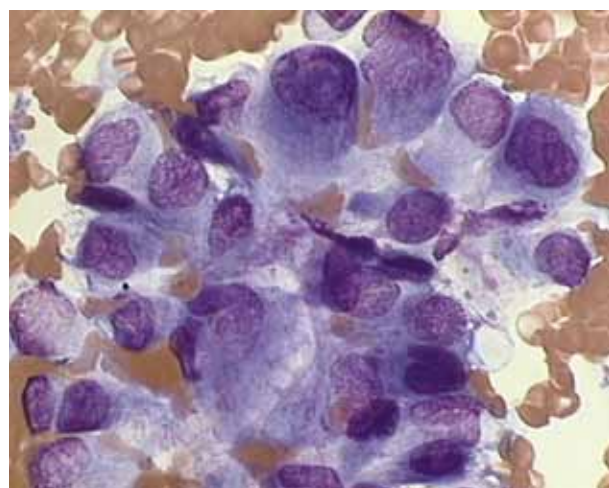
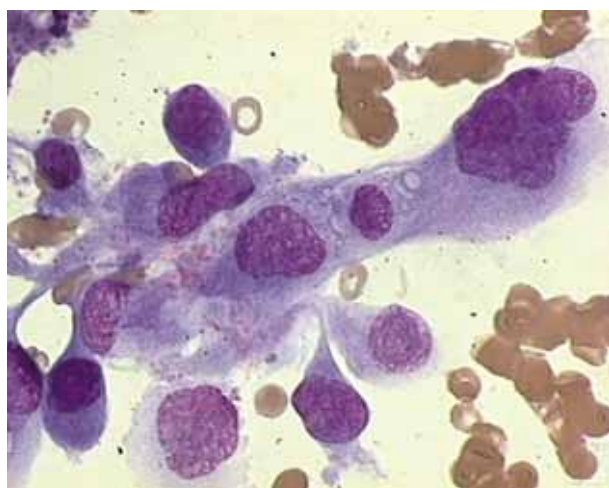
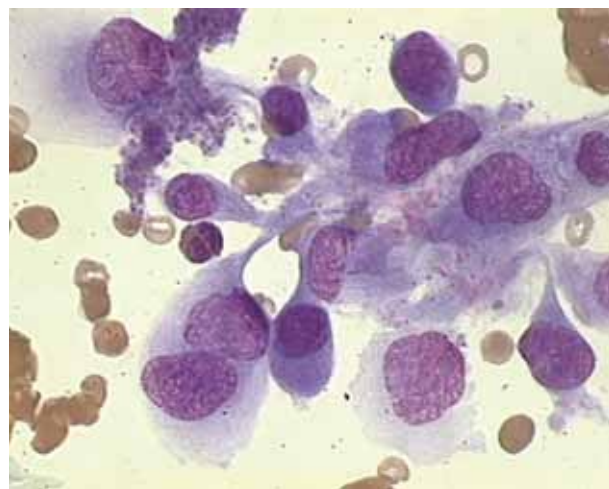
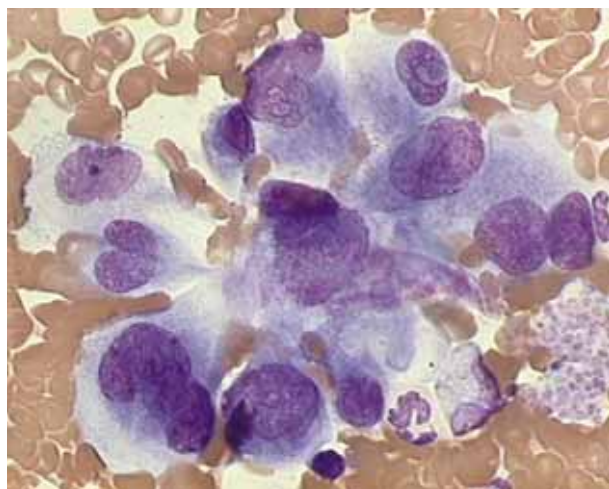
(referentni raspon 9-35), alkalne fosfataze 149 U/L (referentni raspon 50-125) i fibrinogena 5,5 g/L (referentni raspon 1,8-3,5). Učinjeni tumorski biljezi: karcinoembrionalni antigen (CEA), α -feto protein (AFP), Ca125, Ca 15,3, i β -HCG bili su uredni. Rtg



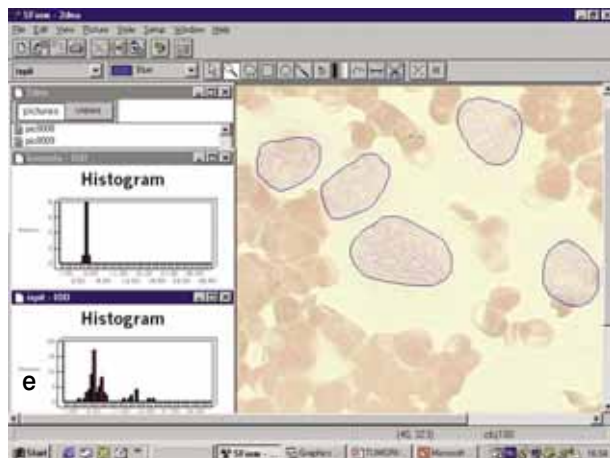
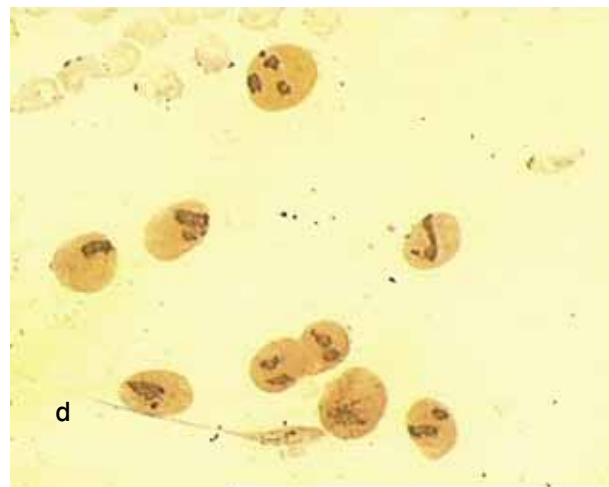
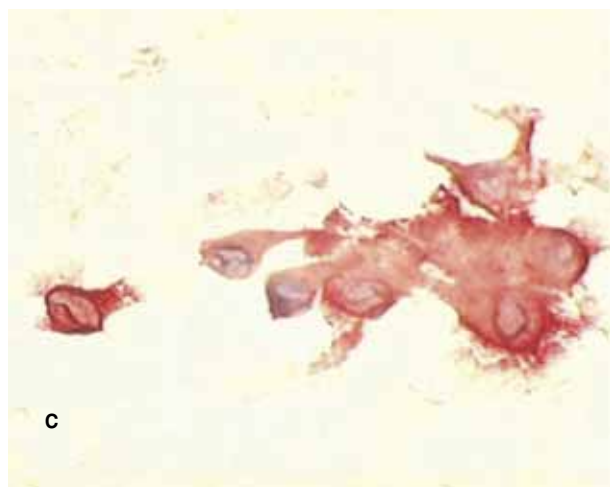
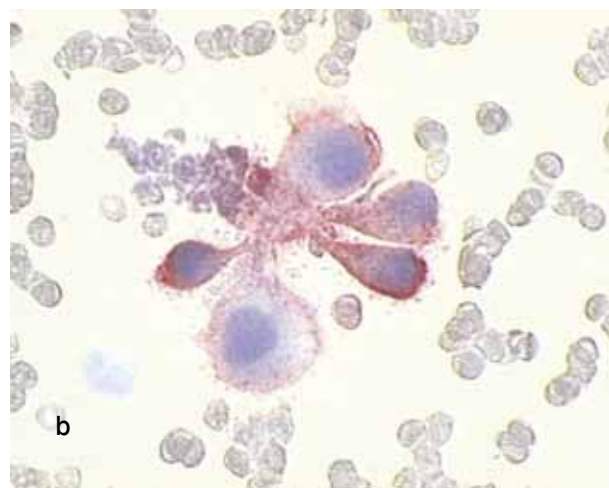
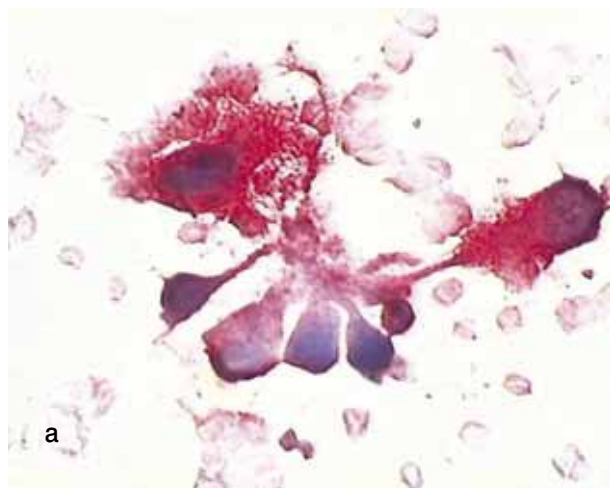
Sl.1. Ultrazvučni nalaz multiplih hipoehogenih promjena u jetri

pluća, gastroskopija te ginekološki pregled također su bili uredni.

Pod kontrolom ultrazvuka učinjena je citološka punkcija. U citološkim razmazima uz dosta hepatocita i nakupina žučnih vodova, nađene su pojedinačne i u nakupinama pleomorfne stanice nepravilnih jezgara, izražene anizonukleoze, obilnije blijedo bazofilne citoplazme. Mjestimično su stanice formirale strukture poput lumena (sl. 2). Imunocitokemijski su tumorske stanice bile jako pozitivne na vimentin, CD34 (sl. 3a), CD31 (sl. 3b) i vimentin (sl. 3c), a negativne na epitelne biljege, dezmin, glatko-mišićni aktin (SMA), neuron specifičnu enolazu (NSE), kromogranin, CD68 i CD117. Analizom regije nukleolarne organizacije (AgNOR) prikazane srebrom nađeni su brojni nepravilni AgNOR-i (sl. 3d), a statičkom („image“) DNA citometrijom uočena je aneuploidija stanica (sl. 3e). Morfološka slika uz imunofenotip te visoku proliferativnost i DNA aneuploidiju upućivala je dijagnozu angiosarkoma.



Sl. 2. Citološka slika epitelioidnog hemangioendotelioma: May-Grünwald-Giemsa (1000x)



Sl. 3. Citološka slika epiteloidnog hemangioendotelioma: a) imunocitokemijski stanice pozitivne na CD34 (LSAB, 1000x), b) imunocitokemijski stanice pozitivne na CD31 (LSAB, 1000x), c) imunocitokemijski stanice pozitivne na vimentin (LSAB, 1000x), d) citokemijska reakcija srebrom regija nukleolarnog organizatora (AgNOR), e) DNA histogram s prisutnom aneuploidijom

U cilindru jetrenog tkiva dobivenom biopsijom širokom iglom („core“ biopsijom) nađena je progresivna proliferacija sinusoidnih prostora, neoplastičnih stanica i vezivne strome u relativno dobro uočljivom zonalnom rasporedu. Tako su žučni vodovi očuvani, čak i umnoženi, kao i dio periportalnih hepatocita. U srednjoj zoni bila je prisutna značajna atrofija hepatocita zbog neoplastične obliteracije sinusoida, a perivenularno arhitektura je bila gotovo potpuno poremećena umnoženim vezivom i neoplastičnim stanicama. Stanice su bile vretenastog, okruglastog ili zvjezdolikog oblika, umjereno polimorfnih jezgara s mjestimice vidljivim nukleolima, a mitoze nisu nađene. Stanice su formirale kratke tračke ili različito velike lumene, a mjestimično su se uočavali i sitni intracitoplazmatski lumeni. Imunohistokemijski stanice su bile CD34 i CD 31 pozitivne, a svi ostali biljezi negativni. Ki67 proliferacijski biljeg bio je pozitivan tek u rijetkim pojedinim stanicama. Zaključak je bio

da takav nalaz najprije odgovara epiteloidnom hemangioendoteliumu.

Učinjena je ortotopna transplantacija jetre po metodi *piggy-back* uz kreiranje koledoho-jejunalne anastomoze po Rouxu, uz drenažu po Wützelu. Eksplantirana bolesna jetra je bila veličine 24x16x8 cm. Makroskopski je parenhim jetre bio prožet brojnim tumorskim čvorovima 0,5-5 cm, relativno dobro ograničenim, bjelkasto-smeđkaste boje, relativno čvrstim na prerezu. Histološki je tumorsko tkivo bilo građeno kao i u prethodnoj biopsiji od tračaka i pojedinačnih neoplastičnih stanica uklopljenih u obilno čvrsto vezivo. Deset godina nakon transplantacije bolesnica je na redovitom kontrolama bez recidiva bolesti.

RASPRAVA

Epiteloidni hemangioendotelium je rijetki, dobro diferencirani tumor građen od endotelinih stanica krvnih žila širokog spektra biološkog ponašanja. Ime HE je osmišljeno kako bi se opisala neoplazma s karakteristikama između hemangioma i sarkoma. Do tada su u literaturi postojali sinonimi: anaplastični angiosarkom niskog stupnja malignosti, celularni hemangiom, histocitni hemangiom i angioendotelium. Čini 1% svih krvožilnih neoplazmi i lokalno je agresivan (4).

Za razliku od angiosarkoma koji su najčešći primarni sarkomi u jetri, HE se u jetri može vidjeti kao metastatski proces, rijetko kao primarni tumor (5). Ponaša se kao sporo rastuća neoplazma intermedijalnog malignog potencijala. Klinička slika može biti vrlo različita, često asimptomatska ili nespecifična. U nekih bolesnika uzrokuje bolove u gornjem dijelu abdomena i gubitak tjelesne težine. U većine bolesnika laboratorijski nalazi pokazuju minimalna odstupanja jetrenih nalaza (blago povećanje serumskog bilirubina, alkalne fosfataze i aspartat transferaze). Fizikalni nalaz je također nespecifičan, može uključivati hepatomegaliju i žuticu (3). Vrlo se rijetko prezentira kao jedno žarište u jetri, najčešće u desnom režnju, dok se u preko 80% slučajeva radi o multifokalnom procesu (6). Ultrazvučni nalaz, iako nespecifičan za vaskularne tumore i može se zamijeniti s metastatskim karcinomom ili Budd-Chiarijevim sindromom, je od velike

važnosti. Prisustvo hepatomegalije i multiple hipohogene UZV promjene zahtijevaju daljnju obradu. U našem slučaju ultrazvučna slika je upućivala na metastatski proces nepoznatog podrijetla. Za razliku od UZV nalaza, kompjuterizirana tomografija (CT) se u literaturi opisuje kao velika pomoć pri diferenciranju multiplog HE od ostalih vaskularnih tumora te primarnih i metastatskih tumora jetre zbog karakterističnog nalaza: uvlačenje kapsule jetre zbog fibroznih struktura, hipervaskularizacije centralnog dijela lezije i periferno povećanje otpora (7,8).

U većini slučajeva opisanih u literaturi dijagnoza je postavljena na osnovi biopsije ili uzorka dobivenog nakon kirurške resekcije. Bez obzira na karakterističnu histološku sliku, HE može imitirati druge vaskularne tumore i metastatske karcinome te su opisani slučajevi HE histološki dijagnosticirani kao kolangiokarcinomi, fibrolamelarni hepatocelularni karcinomi, sarkomi i metastatski karcinomi (2,7). Dijagnoza postavljena na osnovi citologije opisana je u svega nekoliko slučajeva. Do sada su opisane različite citološke karakteristike što i dalje čini problem složenim (9). Često se citološki opisuju kao neoplazme sastavljene od interanastomozirajućih epiteloidnih stanica koje tvore intracitoplazmatske lumene. Veliku pomoć citološkoj slici čini imunocitokemijsko određivanje staničnih biljega karakterističnih za endotele stanice krvnih žila (CD31, CD34 i FVIII-RAg - von Willebrandov faktor) te uz histološku sliku i elektronsko-mikroskopsku evaluaciju dovode do prave dijagnoze (10). I u našem slučaju je citološka dijagnoza odgovarala tumoru vaskularnog podrijetla, iako je zbog visoko proliferativnosti i aneuploidije ukazivala na sliku angiosarkoma (11). Biološko ponašanje tumora ne prati uvijek izgled stanica. Klinička slika je nepredvidiva, neki bolesnici imaju fulminantni tijek, dok drugi imaju višegodišnje preživljenje, čak i bez terapije (12). Terapija uključuje resekciju dijela jetre (ako je moguće), transplantaciju jetre, kemoterapiju, zračenje i/ili imunomodulatorne terapije (12,13). Izbor terapije ovisi o stanju bolesnika, a ortotopna transplantacija je metoda izbora u slučajevima s multifokalnim promjenama bez metastaza (7). U naše je bolesnice učinjena transplantacija jetre, a bolesnica je nakon 10 godina na redovitom kontrolama bez recidiva bolesti.

ZAKLJUČAK

HE je rijetki tumor u jetri. Izuzetno je važno njegovo razlikovanje u diferencijalnoj dijagnozi prema drugim vaskularnim, kao i primarnim i metastatskim tumorima jetre, koristeći radiološke i imunocito/histokemijske metode, jer je dugotrajno preživljenje moguće, naročito ako postoji mogućnost ortotropne transplantacije jetre.

LITERATURA

1. Haap M, Kötter I, Horger M i sur. Disseminated epithelioid hemangioendothelioma mimicking symptoms of systemic vasculitis. *Onkologie* 2005; 28: 429-32.
2. Weiss SW, Enzinger FM. Epithelioid hemangioendothelioma: a vascular tumor often mistaken for carcinoma. *Cancer* 1982; 50: 970-81.
3. Earnest FIV, Johnson CD. Hepatic epithelioid hemangioendothelioma. *Radiology* 2006; 240: 295-8.
4. <http://www.bonetumor.org/unknown-tumor-type-soft-tissue/epithelioid-hemangioendothelioma>
5. Ishak KG, Sesterhean IA, Goodman MZD, Rabin L, Stromeyer FW. Epithelioid hemangioendothelioma of the liver: a clinicopathologic and follow-up study of 32 cases. *Hum Pathol* 1984; 15 :839-52.
6. Makhoulouf HR, Ishak KG, Goodman ZD. Epithelioid hemangioendothelioma of the liver: a clinicopathologic study of 137 cases. *Cancer* 1999; 85 (3): 562-82.
7. Akça S, Süleymanlar İ, Dinçer D i sur. Hepatic epithelioid hemangioendothelioma treated with orthotopic liver transplantation: a case report. *Turk J Gastroenterol* 2002; 13: 221-5.
8. Shin MS, Carpenter JT, Ho KJ. Epithelioid hemangioendothelioma: CT manifestations and possible linkage to vinyl chloride exposure. *J Comput Assist Tomogr* 1991; 15: 505-7.
9. Gupta R, Mathur SR, Gupta SD i sur. Hepatic epithelioid hemangioendothelioma: A diagnostic pitfall in aspiration cytology. *CytoJournal* 2009, 6: 23.
10. Soslow RA, Yin P, Steinberg CR, Yang GCH. Cytopathologic features of hepatic epithelioid hemangioendothelioma. *Diagn Cytopathol* 1997; 17: 50-3.
11. Kardum-Skelin I, Jelić-Puškarčić B, Milas M, Vidić-Paulišić I, Jakić-Razumović J, Šeparović V. Fine Needle Aspiration Cytology of Breast Angiosarcoma - Case Report. *Coll Antropol* 2010; 34: 645-4.
12. Hirohashi S, Blum HE, Ishak KG i sur. Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts. U: Hamilton SR, Aaltonen LA, ur. Pathology and Genetics. Tumours of the Digestive System. World Health Organisation Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2000, 157-202.
13. Filipec Kanižaj T, Čolić Cvrlje V, Mrzljak A i sur. Epithelioid hemangioendothelioma in patient with liver transplantation. *Coll Antropol* 2010; 34: 177-80.

SUMMARY

MULTIFOCAL EPITHELIOID HEMANGIOENDOTHELIOMA TREATED BY LIVER TRANSPLANTATION - CASE REPORT

B. KOCMAN¹, I. KARDUM-SKELIN^{2,5}, T. FILIPEC-KANIŽAJ^{3,5},
D. ŠKEGRO³, Ž. VIDAS⁴, S. JADRIJEVIĆ¹ and V. ČOLIĆ-CVRLJE^{3,5}

¹*Merkur University Hospital, Department of Surgery,* ²*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics,* ³*Department of Internal Medicine,* ⁴*Department of Urology and* ⁵*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Multifocal epithelioid hemangioendothelioma of the liver is a rare primary tumor with a variable course of disease. A case is presented of a 27-year-old female patient with multiple hepatic lesions on ultrasonography, suspect of metastatic tumor of the liver. Serum tumor markers were not elevated, while clinical examination of the lungs, gastrointestinal and gynecologic systems did not confirm the presence of a primary tumor process. Metastatic tumor and primary hepatocellular tumor were ruled out by fine needle aspiration cytology. Along with a characteristic immunophenotype of the vascular cell endothelium (positive for CD31 and CD34), high proliferation demonstrated by the analysis of argyrophilic nucleolar organization regions (AgNOR) and

DNA aneuploidy, cytomorphological pattern suggested the diagnosis of angiosarcoma. Histopathologic finding corresponded to epithelioid hemangioendothelioma. Ten years after orthotopic liver transplantation, the patient is free from disease relapse, with regular follow up testing. Hemangioendothelioma of the liver is characterized by multifocality, which excludes resection; thus, liver transplantation is the method of choice. Therefore, preoperative diagnostic workup is of utmost importance to differentiate it from other primary and metastatic tumors of the liver.

Key words: epithelioid hemangioendothelioma, fine needle aspiration cytology, liver transplantation

PREOPERATIVNA CITOLOŠKA DIJAGNOZA KARCINOMA JAJOVODA - PRIKAZ BOLESNICE

INES KRIVAK BOLANČA¹, VANJA FENZL^{2,4} i VLASTIMIR KUKURA^{2,3}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju, Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku,

²Klinika za ženske bolesti i porode, ³Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet i

⁴Zdravstveno veleučilište, Zagreb, Hrvatska

Karcinom jajovoda je rijetka i izvanredno agresivna neoplazma koja se vrlo rijetko dijagnosticira u početnim stadijima bolesti. Prikazujemo slučaj 56-godišnje nulipare s tubarnim karcinomom stadija Ic (FIGO). Preoperativno, na cervikovaginalnom razmazu nađene su atipične žljezdane stanice ektrauterinog podrijetla. Nakon frakcionirane kiretaže patohistološkim analizom potvrđena je sumnja na neoplastični proces ektrauterinog podrijetla. Na temelju tih nalaza zaključilo se o mogućnosti prisustva maligne tvorbe u abdomenu. Učinjena je histerektomija s bilateralnom adnektomijom i omentektomijom nakon čega je potvrđeno da se radi o primarnom adenokarcinomu desnog jajovoda (alveo-medularnog tipa). Intraoperativno su nađene maligne stanice u ispirku male zdjelice. Oba jajovoda su bila okludiranih abdominalnih ušća te se pretpostavilo da su nađene tumorske stanice u vaginalnom razmazu prošle šupljinom maternice do rodnice, gdje su detektirane Papa testom. Pacijentica je primila postoperativno 6 ciklusa kemoterapije ciklofosamidom i cisplatinom. Deset godina od postavljanja dijagnoze pacijentica je zdrava i kontrolni nalazi upućuju da nema tragova primarne bolesti.

Ključne riječi: karcinom jajovoda, citologija, Papa test

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Ines Krivak Bolanča, dr. med.
Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku
Zavod za kliničku citologiju
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10 10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: ibolanca@inet.hr

UVOD

Primarni karcinom jajovoda je rijetka neoplazma i čini približno tek 1% svih malignoma u ženskom genitalnog traktu (1). Javlja se u svim životnim razdobljima, ali ipak je najčešći u žena između 50. i 60. godine života. Preoperativna dijagnoza je vrlo teška, prvenstveno zbog odsustva patognomoničnih simptoma koji uključuju vaginalni iscjedak ili krvarenje (1) i palpabilnu adneksalnu masu obično jednostranu. Povremeno se žene žale na bol u donjem dijelu abdomena.

Prema DiSaiau, oko četvrtine svih pacijentica s karcinomom jajovoda ima abnormalan Papa test i pozitivan nalaz endometralnog aspirata (2). Nažalost,

ne postoji tipičan izgled i opis malignih stanica za ektrauterino podrijetlo, stoga je u većini slučajeva izuzetno teško utvrditi primarno sjelo tumora i/ili histološke subtipove. Broj nađenih abnormalnih stanica je promjenjiv bez obzira na kliničko stupnjevanje bolesti. Ako u uzorcima aspirata materišta nalazimo maligne cilindrične stanice uz uredne endometralne i stromalne stanice bez tumorske dijateze to upućuje da se radi o ektrauterinom procesu (3). Odsustvo tumorske dijateze prisutno je u gotovo 80% uzoraka endometralnih aspirata koji sadrže maligne stanice (3,4).

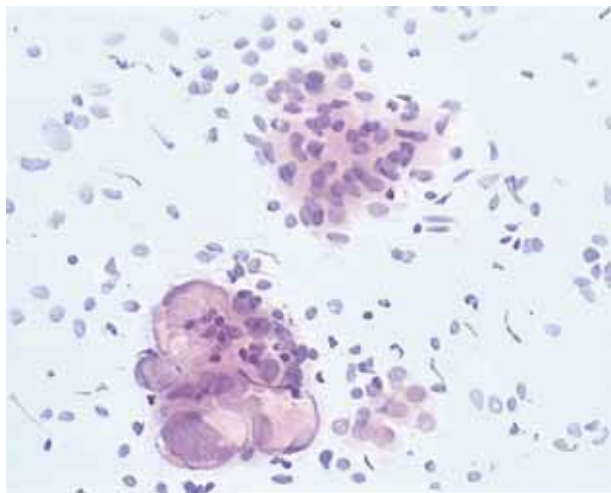
Serumska vrijednost biljega Ca 125 nije specifičan parametar i uobičajeno je povišen u višim kliničkim stupnjevima bolesti ženskog genitalnog trakta (3).

Ponekad je u početnom stupnju bolesti moguće ultrazvučnom tehnikom otkriti ekspanzivnu tumorsku masu u području adneksa (5).

Histološki je najčešći karcinom jajovoda adenokarcinom (5,6).

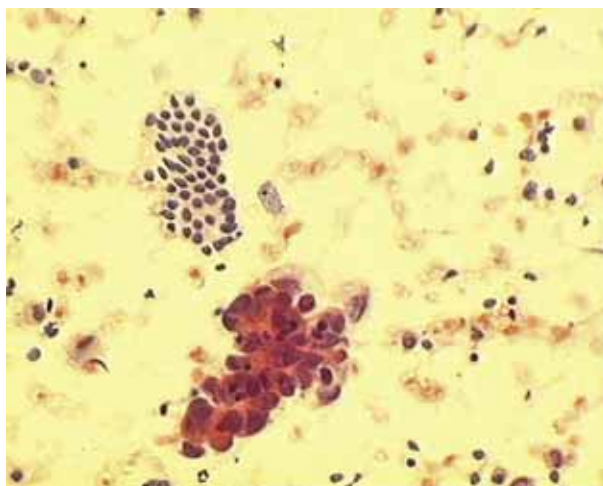
PRIKAZ BOLESNICE

Na Kliniku za ginekologiju i ženske bolesti primljena je 56-godišnja pacijentica, nulipara, s atipičnim glandularnim stanicama nađenima na rutinski učinjenom Papa testu. Prethodni Papa test, uzet dvije godine prije prijma, bio je u granicama normale. Prilikom prijma u bolnicu pacijentici je ponovljen cervikovaginalni razmaz. Ponovno su nađene abnormalne cilindrične stanice u obliku papilarnih nakupina, ali bez znakova tumorske dijateze (sl. 1). Učinjen je i aspirat materišta gdje su također uočene maligne stanice povećanih jezgara, grubog kromatina s mjestimično vidljivim nukleolima, vrlo slične onima nađenima Papa testom (sl. 2). Patohistološki nalaz kiretiranog materijala pokazao je prisustvo malignih cilindričnih stanica vanmaterničnog podrijetla, bez abnormalnosti endometralnih stanica.



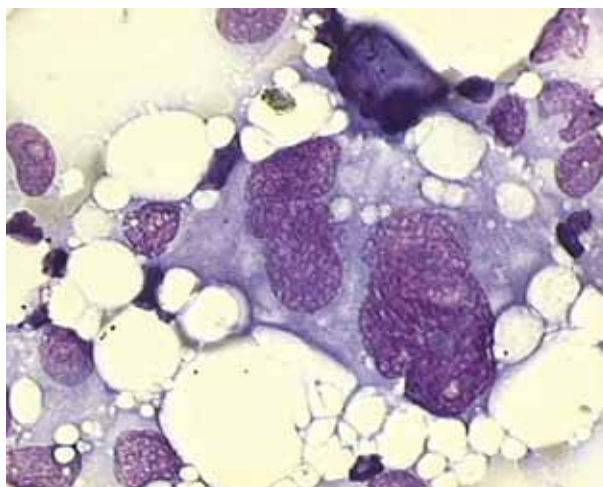
Sl. 1. Maligne žlijezdane stanice u atrafičnom cervikalnom razmazu (MGG X 450)

Serumske vrijednosti biljega CA-125 bile su unutar referalnih vrijednosti - 5, 0 U/mL. Kliničkim pregledom, ultrazvučnim i doplerskim mjerenjima

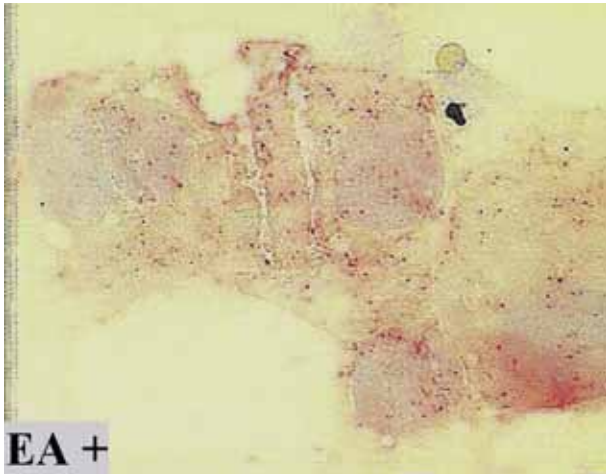


Sl. 2. Maligne i inaktivne žlijezdane stanice u endometralnom aspiratu bez tumorske dijateze (Papa X 450)

nisu uočena odstupanja od normalnih vrijednosti. Na temelju nalaza malignih cilindričnih stanica u Papa testu i u kiretiranom materijalu pristupilo se dijagnostičkoj laparotomiji tijekom koje nisu nađeni makroskopski morfološki elementi koji bi upućivali na malignu bolest zdjeličnih organa. Sumnja na postojanje tubarne maligne bolesti pretpostavljena je nakon nalaza obostrane abdominalne okluzije jajovoda te je učinjena histerektomija, obostrana adnektomija i omentektomija. Intraoperativno je uzet ispirak Douglasovog prostora i citološki analiziran. Nađene su pojedinačne stanice hiperkromatskih jezgara s uvećanim, višestrukim nukleolima. Morfološki se posumnjalo na prisustvo epitelnih stanica u ispirku što je i dokazano imunocitokemijskim bojanjem na epitelni antigen (EA by DAKO) (sl. 3,4).



Sl. 3. Maligne stanice u ispirku peritoneuma (MGG X 1050)



Sl. 4. Pozitivno EA bojanje (epithelial antigen) X 1050

Konačan patohistološki nalaz potvrdio je da se radi o primarnom adenokarcinomu desnog jajovoda (gr. II/III, alveo-medularnog tipa, pT1aNxMx). Tumor veličine 1,0x0,7x0,6 cm invadirao je do polovice mišićnog sloja jajovoda. Maternica, jajnici i omentum nisu pokazivali nikakve znakove abnormalnosti. Budući da je peritonealni ispirak upućivao na prisustvo malignih stanica, pacijentica je primila postoperativnu kemoterapiju u šest mjesčnih ciklusa ciklofosfamida i cisplatina.

Pacijentica je kontrolirana osam godina kliničkim i ultrazvučnim pregledima te godišnjim kontrolama serumskih vrijednosti CA-125. Pet godina nakon zahvata učinjen je PET SCAN i nisu nađeni nikakvi znakovi recidiva primarne ginekološke bolesti. Pacijentica je bila dobrog zdravlja i bez recidiva maligne bolesti.

RASPRAVA

Točnu dijagnozu karcinoma jajovoda izuzetno je teško utvrditi zbog ograničenosti metoda dokazivanja i zbog kasnih simptoma koji se javljaju tek u uznapredovalim stadijima bolesti. Najčešći simptomi koji su prisutni uključuju bol u zdjelici ili donjem dijelu trbuha često udruženim s krvarenjem iz vagine (3,7). Prema Benedet i Warshalu postoji trijas simptoma (tzv. *hydrops tubae profluens*) (1,7). Čine ga vodenasti vaginalni iscjedak, zdjelčna bol tipa kolika te palpabilna adneksalna masa. U 15% pacijentica to mogu biti vodeći simptomi i smatraju se specifičnima za neoplazme jajovoda, ali se, nažalost, relativno rijetko javljaju (8,9).

Preoperativna dijagnoza neoplazme jajovoda može se postaviti na temelju nalaza adenokarcinomskih stanica jajovoda u cervikovaginalnom uzorku u oko četvrtine svih pacijentica koje boluju od karcinoma jajovoda (2). Nalaz malignih stanica u aspiratu materišta i kiretiranom materijalu je češći i kreće se od 50% do 80% slučajeva (3,10). Takeshima sa sur. ponudio je citološki opis malignih stanica karcinoma jajovoda i razlikuje ih od malignih stanica primarnog endometralnog adenokarcinoma (3). Po njemu se maligne stanice podrijetla jajovoda češće nalaze u manjim, oskudnijim nakupinama, koje su degenerativno promijenjene, ali nalaze se bez prateće tumorske dijateze i drugih abnormalnosti endometralnih stanica. Na temelju toga opisa posumnjali smo u prikazane pacijentice na karcinom jajovoda. Nađene su maligne stanice bile u kuglastim papilarnim nakupinama, povećanih jezgara, uočljivih i prominentnih nukleola, grubog kromatina i vakuoliziranih citoplazmi. Tipično, u uzorku Papa testa nije nađena tumorska dijateza isto kao i u aspiratu materišta. Samo na temelju morfologije gotovo je nemoguće razlikovati stanice endometralnog karcinoma od stanica karcinoma jajnika ili jajovoda budući da je opis stanica praktički jednak (10). Međutim, ako se na cervikovaginalnim razmazima nađu nakupine malignih stanica i to bez znakova tumorske dijateze, kao što je to bilo u prikazanom slučaju, mora se misliti na vanmaterično podrijetlo procesa.

U preoperativnoj dijagnostici malignih tumora zdjelčnih organa koristimo se ultrazvučnom dijagnostikom. Prema Kurjaku, transvaginalnom pretragom uz upotrebu tehnike Doplera u boji, moguće je otkriti područja neovaskularizacije unutar jajovoda određivanjem dijastoličkog protoka kroz promjenu i određivanjem PI i RI indeksa (engl. PI - *Pulsality Index*; engl RI - *Resistance Index*) (5). U prikazanom slučaju ultrazvučni i klinički nalaz nisu upućivali na patološke promjene.

Ca-125 je tumorski biljeg koji je nađen kod celomičnih epitelnih neoplazmi. Malkasian i suradnici su u kasnim 80-tim godinama prošlog stoljeća ukazali da se na maligni proces u zdjelici mora misliti ako su vrijednosti biljega iznad 65 U/mL (11).

Kod prikazane pacijentice citološka dijagnoza malignoma vanmateričnog podrijetla je potvrđena patohistološkom verifikacijom nakon kiretaže. Intraoperativno, tijekom dijagnostičke laparotomi-

je, uzet je uzorak iz Douglasovog prostora za citološku analizu. U uzorku su nađene maligne stanice. Danas je uobičajeno uzimati uzorak Douglasovog prostora za citološku analizu kod intraabdominalnih operacija pacijentica koje boluju od maligne bolesti ili u kojih se sumnja da imaju malignu bolest u zdjelici (12,13). Time se dobiju podaci o kliničkom stupnju bolesti. Radi otežanog morfološkog razlikovanja malignih stanica i reaktivnih mezotelnih stanica (13-15) upotrijebili smo imunocitokemijsko bojanje na epitelni antigen (EA by DAKO). Usprkos tomu što bojanje nije specifično za karcinom jajovoda, ovim smo putem dokazali prisustvo malignih stanica u uzorku. Time je određen klinički stupanj bolesti kao Ic po FIGO klasifikaciji (12,16). Dijagnoza abnormalnosti jajovoda je vrlo često slučajan nalaz prilikom laparotomije. U literaturi su relativno rijetki slučajevi invazivnog karcinoma jajovoda koji su dijagnosticirani cervikovaginalnom citologijom (1,10). Safret je opisao čak slučaj karcinoma jajovoda *in situ* (17), a Salvador sa suradnicima je, pregledom literaturnih podataka, uočio da je tubarna sluznica primarni izvor gotovo svih slučajeva seroznih karcinoma u zdjelici i naglašena je potreba za probirom patologije donjeg dijela genitalnog trakta žene (18).

Za postavljanje dijagnoze karcinoma jajovoda uz kliničke i radiološke podatke svakako treba uključiti i određivanje serumske razine biljega CA-125. Istodobno se ne smije zaboraviti na prednosti i mogućnosti citologije cervikovaginalnog razmaza i/ili aspirata materijata koji iako nisu metode izbora za probir, svakako mogu dati vrijedne podatke i postaviti dijagnozu. Podaci koje daje citologija peritonealnih uzoraka su izuzetno vrijedni za kliničko stupnjevanje bolesti (16).

ZAKLJUČAK

Prikaz bolesnice ukazuje da citološka pretraga, iako nespecifična, može biti vrijedna metoda u postavljanju dijagnoze karcinoma jajovoda. Rijetki su slučajevi u kojima se dijagnoza može postaviti preoperativno, na temelju nalaza malignih stanica u cervikalnim obriscima. Ako se nađu nakupine malignih žljezdanih stanica u razmazima genitalnog trakta bez pridruženih znakova za tumorsku dijatezu, mora se pomisliti na mogućnost karcinoma jajovoda, iako su tada rijetke i većim dijelom degenerativno promijenjene, što otežava dijagnozu.

Stanice malignog tumora jajovoda se puno češće, gotovo u polovici svih slučajeva, nalaze u endometrialnim aspiratima. Često se nađu pojedinačne maligne stanice, ili u manjim papilarnim nakupinama, ponekad degenerativno promijenjene ali bez znakova tumorske dijateze. Citološka pretraga ispirka peritoneuma izvodi se rutinski kod svih intraabdominalnih operacija na pacijenticama koje imaju ili za koje se sumnja da imaju neku ginekološku neoplazmu. Time se osiguravaju važni podaci za daljnje terapijske postupke i prognozu bolesti. Za točnu evaluaciju uzoraka iz abdomena, osobito za diferenciranje malignih žljezdanih stanica od reaktivno promijenjenih mezotelnih stanica upotrebljava se paleta monoklonalnih antitijela kojima se, imunocitokemijskim bojanjem može dokazati prisustvo malignih epitelnih stanica te stoga utjecati i sudjelovati u kliničkom stupnjevanju bolesti.

Citologija ima bez sumnje važnu ulogu u procesu probira premalignih i malignih bolesti ženskog genitalnog trakta osobito kod promjena na vratu maternice. Međutim, nikako se ne smije zaboraviti njezina uloga i u kliničkom stupnjevanju ginekoloških bolesti zbog detekcije malignih epitelnih stanica u peritonealnim uzorcima kao i mogućnosti koje nudi detekcijom i dijagnostikom drugih malignih bolesti ženskih spolnih organa.

LITERATURA

1. Warshal DP, Burgelson ER, Aikins JK, Rocereto TF. Post-hysterectomy fallopian tube carcinoma presenting with a positive Papanicolaou smear. *Obstetr Gynecol* 1999; 94: 834-6.
2. DiSaia PJ, Creasman WT. *Clinical gynecologic oncology*. 4th ed. St. Louis: Mosby, 1993, 458-65.
3. Takeshima N, Hirai Y, Yamauchi K, Hasumi K. Clinical usefulness of endometrial aspiration cytology and CA-125 in the detection of fallopian tube carcinoma. *Acta Cytol* 1997; 41: 1445-50.
4. Ng ABP. Endometrial hyperplasia and cancer and extrauterine cancer. U: Bibbo, ur. *Comprehensive cytopathology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997, 293-6.
5. Kurjak A, Kupesic S, Jacobs I. Pre-operative diagnosis of the primary fallopian tube carcinoma by dimensional static and power. Doppler sonography. *Ultrasound Obst Gynecol* 2000; 15: 246-51.

6. Liapis A, Michailidis E, Deligeoroglou E, Kondipafiti A, Konidaris S, Creatsas G. Primary fallopian tube cancer - a ten year review. Clinopathological study of 12 cases. Eur J Gynaecol Oncol 2004; 25: 522-24.
7. Benedet JL, Miller DM. Tumors of fallopian tube: clinical features, staging and management. U: Coppleson M, Monaghan JM, Morrow CP, Tattersall MHN, ur. Gynecologic oncology: fundamental principles and clinical practice. 2nd ed. Edinburgh, London, Melbourne, New York and Tokyo: Churchill Livingstone; 1992, 853-60.
8. Piura B, Rabinovich A. Primary carcinoma of the fallopian tube: study of 11 cases. Eur J Obstet Gynecol 2000; 91: 169-75.
9. Minato H, Shimizu M, Hirokawa M, Fujiwara K, Manabe T. Adenocarcinoma in situ of the fallopian tube: A case report. Acta Cytol 1998; 42: 1455-7.
10. Podobnik M, Singer Z, Ciglar S, Bulic M. Preoperative diagnosis of primary fallopian tube carcinoma by transvaginal ultrasound, cytological findings and CA-125. Ultrasound Med Biol 1993; 19: 587-91.
11. Malkasian GD, Knap RC, Lavin PT i sur. Preoperative evaluation of serum CA-125 levels in premenopausal and postmenopausal patients with pelvic masses: Discrimination of benign from malignant disease. Am J Obstet Gynecol 1988; 159: 341-6.
12. Kim HS, Song YS. International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging system revised: what should be considered critically for gynecologic cancer? J Gynecol Oncol 2009; 20: 135-6.
13. Kübler HC, Kühn W, Rummel HH, Schmidt W. Diagnosis of occult fallopian tube cancers by intraoperative peritoneal cytology. Geburtshilfe Frauenheilkd 1988; 48: 116-8.
14. Takeshima Y, Amatya VJ, Kushitani K, Inai K. A useful antibody panel for differential diagnosis between peritoneal mesothelioma and serous ovarian carcinoma in Japanese cases. Am J Clin Pathol 2008; 130: 771-9.
15. Sadeghi S, Ylagan LR. Pelvic washing cytology in serous borderline tumours of the ovary using Thin Prep: are there cytologic clues to detecting tumor cells? Diagn Cytopathol 2004; 30: 313-9.
16. Zuna RE, Behrens A. Peritoneal washing cytology in gynecologic cancers: long-term follow-up of 355 patients. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 980-7.
17. Safret A, Bösch, Bannwart F, Rinderknecht B, Hafner HU. Carcinoma in situ of the fallopian tube presenting as a positive Pap smear. Acta Cytol 2004; 48: 462-4.
18. Salvador S, Gilks B, Köbel M, Huntsman D, Rosen B, Miller D. The fallopian tube: Primary site of most pelvic high-grade serous carcinoma. Int J Gynecol Cancer 2009; 19: 58-64.

S U M M A R Y

PREOPERATIVE DIAGNOSIS OF FALLOPIAN TUBE CARCINOMA BY CYTOLOGY

I. KRIVAK BOLANČA¹, V. FENZL^{2,4} and V. KUKURA^{1,3}

¹*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics, Division of Gynecologic Cytology and Cytogenetics,* ²*Department of Gynecology and Obstetrics,* ³*University Zagreb, School of Medicine and* ⁴*University of Applied Health Studies, Zagreb, Croatia*

Carcinoma of the fallopian tube is a rare, extremely aggressive neoplasm that is uncommonly diagnosed in early stages of the disease. We present a case of a 56-year-old nulliparous patient with tubal carcinoma stage Ic (FIGO). Preoperatively, the only suspect finding were atypical glandular cells of extrauterine origin presented on a routine Papanicolaou smear. Histopathologic finding of D&C implicated the same suspicion of extrauterine genital malignancy. After hysterectomy with bilateral adnexectomy and omentectomy, histopathology confirmed stage I primary adenocarcinoma of the right fallopian tube (alveomedullary type) with positive intraoperative cytology of Douglas pouch lavage. As the patient had bilateral occlusion of the tubes, we presumed that tumor cells were leaking through the uterus into the vagina, and we were luckily alerted within the pathological cervical smear to the possible presence of a malignancy in the abdomen. The patient received 6 courses of cyclophosphamide and cisplatin chemotherapy postoperatively. Two years after the diagnosis, the patient is healthy, without a trace of primary malignant disease. Cytology undoubtedly plays a vital role as a screening tool in the detection of premalignant and malignant diseases of the female genital tract, particularly lesions in the uterine cervix. However, its role in clinical staging of gynecologic diseases should not be underestimated either, due to its ability to detect malignant epithelial cells in peritoneal samples as well as for its detecting and diagnostic value in other malignant gynecologic diseases.

Key words: fallopian tube carcinoma, cytology, Papanicolaou smear

EKSTRAMEDULARNA INFILTRACIJA KOLONA U BOLESNIKA S MULTIPLIM MIJELOMOM - PRIKAZ BOLESNIKA I PREGLED LITERATURE

INGA MANDAC ROGULJ¹, BOJANA AĆAMOVIĆ¹, TAJANA FILIPEC-KANIŽAJ^{2,5},
SLAVKO GAŠPAROV^{3,5}, DELFA RADIĆ-KRIŠTO¹, ANA PLANINC-PERAICA^{1,5},
ELIZABETA ČOROVIC-ARNERI⁴ i SLOBODANKA OSTOJIĆ KOLONIĆ^{1,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju, ²Zavod za gastroenterologiju,

³Klinički zavod za patologiju i citologiju, ⁴Opća bolnica Dubrovnik, Odjel za internu medicinu, Dubrovnik i

⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Ekstramedularna infiltracija multiplog mijeloma u probavni sustav je rijetka i uglavnom je dosad opisana u pojedinačnim prikazima bolesnika. Najčešće su zahvaćeni želudac i tanko crijevo, a najrjeđe debelo crijevo. Bol u trbuhu, rektalno krvarenje, intermitentne proljevaste stolice, mršavljenje, intolerancija napora mogu biti dio kliničke slike, a dijagnoza se postavlja analizom bioptata sluznice probavnog sustava. Nema posebnih terapijskih smjernica za liječenje multiplog mijeloma s ekstramedularnom infiltracijom kolona. Često se bolesnike s lokaliziranom infiltracijom podvrgava kirurškom zahvatu, a opisivano je i liječenje radioterapijom jer su ti tumori radiosenzitivni. Liječenje se može provesti pulsevima deksametazona u kombinaciji sa ciklofosfamidom, vinkristinom, melfalanom i prednizonom ili talidomidom ili bortezomibom kao monoterapijom. U nekih je bolesnika postignut dobar terapijski odgovor mijeloablativnom terapijom s transplantacijom autoložnih ili alogeničnih matičnih stanica. S obzirom da se radi o bolesti s rijetkom kliničkom slikom koja je dijagnostički i terapijski izazov, prikazujemo tijek bolesti, dijagnostički postupak i liječenje 66-godišnjeg bolesnika s multiplim mijelomom i infiltracijom debelog crijeva.

Ključne riječi: multipli mijelom, probavni sustav

Adresa za dopisivanje: Inga Mandac Rogulj, dr. med.
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: imandac@yahoo.com

UVOD

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije, plazma stanični tumori svrstavaju se u ovih nekoliko skupina: monoklonalna gamapatija neodređenog značenja, izolirani plazmocitom kosti i ekstramedularni plazmocitom, multipli mijelom (asimptomatski mijelom, nesekretorni mijelom, plazmastična leukemija), bolesti odlaganja imunoglobulina i osteosklerotični mijelom (1).

Multipli mijelom čini oko 10% svih hematoloških neoplazmi. Širenje multiplog mijeloma u ekstramedularna sijela je rijetko i uglavnom zahvaća jetru,

slezenu i limfne čvorove. Probavni sustav je rijetko zahvaćen u multiplom mijelomu, a infiltrati se najčešće mogu naći u želucu i tankom crijevu. Najrjeđe je zahvaćeno debelo crijevo (2). Prikazujemo bolesnika a multiplim mijelomom i ekstramedularnom infiltracijom debelog crijeva te pregled literature.

PRIKAZ BOLESNIKA

Na Hematološki odjel Kliničke bolnice Merkur u ožujku 2010. godine primljen je 66-godišnji muškarac s bolovima u trbuhu, mišićima i kralježnici od

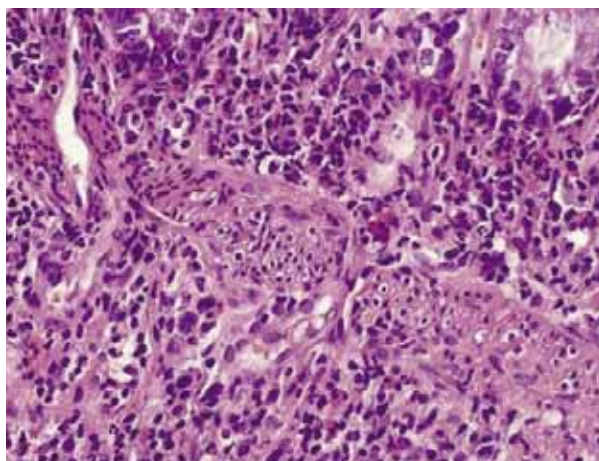
kjih je patio već dva mjeseca. Žalio se je na osjećaj slabosti i umora, a u posljednja tri mjeseca izgubio je oko 30 kg tjelesne težine. Od ranije se liječio zbog šećerne bolesti tipa 2, a u prosincu 2009. godine prebolio je akutni infarkt srca zbog čega mu je ugrađen stent. U kliničkom statusu kod dolaska uočavala se bljeđa koža i sluznice. U hematološkim nalazima bila je prisutna izraženija mikrocitna anemija (E $3 \times 10^{12}/L$, Hb 76 g/L, Hct 0,24 L/L, MCV 79,2 fl), uz ubrzanu sedimentaciju eritrocita (SE 140 mm/3,6ks), povišen C-reaktivni protein (CRP 109,1 mg/L), beta-2-mikroglobulin (3,5 mg/L), te M-komponentu u gama frakciji elektroforeze proteina u serumu (ukupni proteini 68,2 g/L, gama+M 22,7g/L). Imunoelektroforetskim određivanjem sa specifičnim protutijelima za teške i lagane lance imunoglobulina, u serumu je nađen monoklonski imunoglobulin klase IgA, tipa laganog lanca KAPPA, a u urinu monoklonski slobodni lagani lanci tipa KAPPA (Bence Jones Kappa). Imunofiksacijom seruma nađene su dvije monoklonske vrpce imunoglobulina A KAPPA tipa (IgA 16,5 g/L). Citološkom punkcijom koštane srži nađe se normocelularni punktati s dobro zastupljenom eritropoezom te bujnom granulocitnom i trombocitnom uz mjestimice brojnije plazma stanice od 2% do 10% u grubljem partiklu. Oko 5% od svih nukleiranih stanica bilo je pozitivno na CD138. Imunofenotipizacijom stanica koštane srži u području ostalih mononuklearnih stanica nađen je manji udio plazma stanica s fenotipom dviju populacija:

1. CD45 +, CD38 strong+, CD138+, CD19+, CD56-
 2. CD45+, CD38 strong+, CD138+, CD56+, CD19-
- s klonalnim izražajem lakih lanaca imunoglobulina KAPPA.

U cilindru kosti je nađena intersticijska infiltracija kao i manje nakupine atipičnih plazma stanica gradusa I, manjim dijelom gradusa II (30%) što je ukazivalo u prilog multiplog mijeloma. Metodom FISH nisu nađene promjene translokacije lokusa IGH, ni delecije regije 13q34, a citogenetski nalaz je opisao kariotip 45,X,-Y/46,XY(15), hipodiploidni klon s gubitkom Y kromosoma u 5 metafaza.

Ultrazvukom abdomena nađena je zadebljana stijenka završnog dijela sigmoidnog kolona zbog čega je učinjena dodatna dijagnostička obrada.

Kompjuteriziranom tomografijom prsnog koša i abdomena nije nađeno značajnijih infiltrata ni limfadenopatije. Kompletnom kolonoskopijom proksimalno od 30-cm cijelom dužinom debelog crijeva nađene brojne ulceracije, a u hepatalnoj fleksuri, poprečnom dijelu debelog crijeva i na 70-cm i 60-cm ulceracije s polipoidnim izbočenjima sluznice i spontanom krvarenjem. Patohistološki opis biopsata tkiva uzetih tijekom kolonoskopije u svim uzorcima lamina proprie i muskularis proprie pokazuje infiltrate brojnim plazma stanicama gradusa I i dijelom gradusa II, a što odgovara infiltratima multiplog mijeloma (sl. 1). Na rentgenogramu skeleta nisu nađene osteolitičke lezije.



Sl. 1. Sluznica debelog crijeva. Subepitelno infiltracija atipičnim plazma stanicama. Hemalaun&eosin, 60x

S obzirom na dijagnozu multiplog mijeloma (Durie Salmon stadij IIIA) s ekstramedularnom infiltracijom kolona, započeto je liječenje parenteralnom primjenom deksametazona, a nastavljeno sa 8 ciklusa kemoterapije po shemi COP (prvi dan ciklofosamid 750 mg/m²; vinkristin 1,4 mg/m², a tijekom 5 dana prednizon 60 mg/m²) koje je primao svaka tri tjedna.

Reevaluacijom nakon provedenih 8 ciklusa terapije po shemi COP, nađeno je da je postignut zadovoljavajući terapijski odgovor s dobrim kliničkim stanjem bolesnika, urednim hematološkim i biokemijskim nalazima, bez infiltracije koštane srži i sluznice crijeva plazma stanicama te urednim nalazom kolonoskopije.

RASPRAVA

Multipli mijelom je maligna proliferacija plazma stanica. Ekstramedularna infiltracija u probavni sustav je rijetka i nalazi se u oko 10% do 20% bolesnika (3).

Ekstramedularna infiltracija kolona se češće pojavljuje u muškaraca (prema nekim podacima omjer muškaraca prema ženama je 5:3), a bolesnici su uglavnom u dobi od 35 do 85 godina, iako su takve infiltracije opisivane i u mlađih bolesnika. Klinička manifestacija je različita, a najčešći simptomi su bol u trbuhu, povraćanje i gubitak tjelesne težine koji se mogu pojaviti nekoliko dana pa i do 10-ak godina prije postavljanja dijagnoze (2-4). Najčešće zahvaćena područja kolona su cekum, sigmoidni kolon i rektum, a infiltracija u okolne organe, osim u limfne čvorove, se ne opisuje. Radiološki se može naći polipoidna tvorba ili stenozirajuća lezija, multipli polipi ili ulkusi koje je ponekad teško razlučiti od upalne bolesti crijeva ili adenokarcinoma (4). Dijagnoza ekstramedularne infiltracije multiplog mijeloma najčešće je histološka. Diferencijalno dijagnostički infiltrat treba razlikovati od nekih tipova limfoma (difuzni velikostanični ne-Hodgkinov limfom), slabo diferenciranih karcinoma i plazma staničnog granuloma (5).

Pretraživanjem po medicinskim predmetnim naslovima (MeSH) u Medline bazi našli smo 7 opisanih slučajeva bolesnika s multiplim mijelomom i infiltracijom u debelo crijevo, a oko 400 radova uz predmetnice „multipli mijelom i probavni sustav“ koji opisuju zahvaćenost bilo kojeg dijela probavnog sustava. Zanimljiv je podatak da se mijelomska infiltracija u probavnom sustavu uoči tek na obdukciji, jer ako bolesnik nema simptome probavnog sustava, rijetko se u sklopu dijagnostičke obrade multiplog mijeloma, učini i obrada probavnog sustava.

Savannasankha je objavio prikaz slučaja bolesnika a plazmacitomom kojem je prva manifestacija bolesti bilo krvarenje iz gastrointestinalnog sustava. Nakon učinjene ezofagogastroduodenoskopije i kolonoskopije čiji je nalaz bio uredan, kompjuteriziranom tomografijom abdomena nađena je tvorba u tankom crijevu. Učinjena je eksplorativna laparotomija, a patohistološkom analizom tvorbe nađen je infiltrat plazmocitoma. Poremećaji hemostaze koji zahvaćaju sve koagulacijske parametre mogu dovesti do krvarenja ili trombotskih komplikacija

u bolesnika s multiplim mijelomom. Povećani rizik trombotskih komplikacija povezan je i s primjenom kemoterapije, kortikosteroida, talidomida i eritropoetina koji se koriste u liječenju (6).

Giampado Talamo i sur. su opisali 24 od ukupno 2584 (0,9%) bolesnika s multiplim mijelomom koji su imali zahvaćen probavni sustav. Srednja je dob tih bolesnika bila 54 godine, s jednakom učestalošću pojave, u muškaraca i žena. U trenutku dijagnoze probavni sustav je bio zahvaćen u tri bolesnika, a u 21 bolesnika je zahvaćen kasnije tijekom te bolesti. Bolest je u početku bila asimptomatska u 10 od 24 bolesnika, a infiltracija kolona je nađena slikovnim dijagnostičkim metodama (CT/PET). Oko 67% bolesnika imalo je povišenu aktivnost LDH, a prosječan postotak plazma stanica u koštanoj srži bio je oko 60%. Morfologija plazma stanica u infiltriranom biopatu bila je klasificirana kao gradus I u tri, gradus II u 14 i gradus III u 7 bolesnika. Autori su primijetili kako je plazmablastična morfologija (gradus III plazma stanica) i postojanje nepovoljnih citogenetskih abnormalnosti u koštanoj srži, značajno češća u bolesnika sa zahvaćenim probavnim sustavom, nego u ostalih bolesnika a multiplim mijelomom. U većine bolesnika nije nađena povišena razina IgA, unatoč činjenici što tu klasu protutijela stvara limfno tkivo unutar probavnog sustava. Monosomija 13, koja je poznata kao najjači negativan prognostički čimbenik u multiplom mijelomu, uočena je u oko 46% bolesnika a infiltracijom u probavnom sustavu, a bila je opisana u oko 15% svih bolesnika a multiplim mijelomom. Autori su pokazali kako su infiltracije probavnog sustava postale simptomatske zbog izravne zahvaćenosti specifičnog organa, mehaničkog pritiska tumorske mase i zbog stvaranja malignog ascitesa (7).

Takve je bolesnike potrebno podvrgnuti kirurškom zahvatu kada postoje popratne komplikacije zbog dugotrajnih krvarenja ili opstrukcije. Radioterapija se pokazala učinkovitom u liječenju u lokaliziranih infiltracija. Ipak, multipli mijelom je sistemna bolest, pa je najčešće potrebno primijeniti i sistemnu kemoterapiju (COP = ciklofosamid, vinkristin, prednizon; VAD = vinkristin, adriamicin, deksametazon; VBMCP = vinkristin, karmustin, melfalan, ciklofosamid, prednizon; EDAP = etopozid, deksametazon, citarabin, cisplatin) (3,7,8). U našeg je bolesnika postignut zadovoljavajući terapijski odgovor uz liječenje sistemnom kemoterapijom po shemi COP.

Talamo i sur. su u 13 bolesnika s transplantatom (9 autolognih, 4 alogeničnih) pokazali kompletan terapijski odgovor u tri bolesnika, djelomičan terapijski odgovor u devet bolesnika, dok je u jednog bolesnika došlo do progresije bolesti ubrzo nakon transplantacije (7). Zomas i sur. su opisali bolesnika s multiplim mijelomom liječenog transplantacijom alogeničnim perifernim matičnim stanicama od srodnog davatelja u kojeg je devet mjeseci nakon transplantacije došlo do relapsa s ekstramedularnom infiltracijom u kožu. Odlučili su se nastaviti liječenje infuzijom donorskih limfocita, ali nije bilo pozitivnog terapijskog učinka (8). Lokhorst i sur. su prikazali učinak infuzije donorskih limfocita kod 27 bolesnika s relapsom multiplog mijeloma nakon transplantacije alogeničnih perifernih matičnih stanica. U 14 bolesnika je došlo do terapijskog odgovora pri čemu je u šest bolesnika postignut potpuni terapijski odgovor. Autori su istaknuli važnost ponavljajućih infuzija donorskih limfocita, osobito u onih bolesnika kod kojih nije postignut zadovoljavajući terapijski odgovor nakon prve infuzije donorskih limfocita (9). Prognoza bolesnika s multiplim mijelomom i ekstramedularnom infiltracijom probavnog sustava je loša, unatoč agresivnom terapijskom pristupu. M. Varettoni i sur. su kod 58 bolesnika s ekstramedularnom infiltracijom mijeloma od ukupno 1003 bolesnika s multiplim mijelomom, pokazali značajno kraće vrijeme do progresije bolesti (18 mjeseci u odnosu na 30 mjeseci) i značajno kraće ukupno preživljenje (oko 15 mjeseci) (10).

U bolesnika s ekstramedularnom infiltracijom mijeloma nameće se dijagnostička dilema radi li se o solitarnom plazmocitomu ili multiplom mijelomu s ekstramedularnom infiltracijom. Ako se radi o solitarnom plazmocitomu, bolesnike se liječi radioterapijom. Kod infiltracije crijeva s komplikacijama potrebno je resekirati tumorskom bolešću zahvaćeni dio crijeva. Kako je u našeg bolesnika nalaz citološke punkcije koštane srži bio uredan, u početku se smatralo da se radi o solitarnom plazmocitomu u debelom crijevu. Međutim, patohistološki nalaz koštane srži i imunofenotipizacija koštane srži su ukazali da se radi o multiplom mijelomu. Naknadno pristigli nalaz kariograma učinjenog na stanicama koštane srži s kromosomskim promjenama tipičnim za multipli mijelom potvrdio je dijagnozu multiplog mijeloma. Iako bi zbog infiltracije kolona sa znakovima krvarenja trebalo učiniti resekciju crijeva, komorbiditet bolesnika to nije dopuštao.

Iz navedenog je vidljivo koliko je važno provesti dijagnostički postupak koji će dovesti do točne dijagnoze da bi se izabrao najbolji način liječenja u svakog pojedinog bolesnika

L I T E R A T U R A

1. McKenna RW, Kyle RA. Plasma cell neoplasms. U: Swerdlow HS, ur. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, 2008, 200-13.
2. Gupta V, Nahak B, Sakhuja P, Agarwal AK, Kumar N, Mishra PK. Primary isolated extramedullary plasmacytoma of colon. *World J Surg Oncol* 2007; 5: 47
3. Lattuneddu A, Farneti F, Lucci E, Garcea D, Ronconi S, Saragoni L. A case of primary extramedullary plasmacytoma of the colon. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 289-91.
4. Baumgartner BR, Hartmann TM. Extramedullary plasmacytoma of the colon. *Am J Gastroenterol* 1985; 80: 1017-9.
5. Ligato S, El-Naggar A, Cleary KR, Manning J. Extramedullary plasmacytoma mimicking primary colonic carcinoma in a patient with Crohn's disease. *Arch Pathol Lab Med* 1996; 120: 279-82.
6. Suvannasankha A, Abonour R, Cummings OW, Liangpunsakul S. Gastrointestinal plasmacytoma presenting as gastrointestinal bleeding. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008; 8: 309-11.
7. Talamo G, Cavallo F, Zangari M i sur. Clinical and biological features of multiple myeloma involving the gastrointestinal system. *Haematologica* 2006; 91: 964-7.
8. Zomas A, Stefanoudaki K, Fisis M, Papadaki T, Mehta J. Graft-versus-myeloma after donor leukocyte infusion: maintenance of marrow remission but extramedullary relapse with plasmacytomas. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1163-5.
9. Lokhorst HM, Schattenberg A, Cornelissen JJ i sur. Donor lymphocyte infusions for relapsed multiple myeloma after allogeneic stem-cell transplantation: predictive factors for response and long-term outcome. *J Clin Oncol* 2000; 18: 3031-7.
10. Varettoni M, Corso A, Pica G, Mangiacavalli S, Pascutto C, Lazzarino M. Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple myeloma: a longitudinal study on 1003 consecutive patients. *Ann Oncol* 2010; 21: 325-30.

S U M M A R Y

EXTRAMEDULLARY MULTIPLE MYELOMA OF THE COLON - CASE PRESENTATION AND LITERATURE REVIEW

I. MANDAC ROGULJ¹, B. AĆAMOVIĆ¹, T. FILIPEC-KANIŽAJ^{2,5}, S. GAŠPAROV^{3,5}, D. RADIĆ-KRIŠTO¹, A. PLANINC-PERAICA^{1,5}, E. ĆOROVIĆ-ARNERI⁴ and S. OSTOJIĆ KOLONIĆ^{1,5}

¹Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Division of Hematology, ²Division of Gastroenterology, ³Department of Pathology and Cytology, ⁴General Hospital Dubrovnik, Department of Internal Medicine, Dubrovnik and ⁵University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia

Multiple myeloma with gastrointestinal infiltration is rare, and it has been usually described in some case reports or case series. Stomach and small intestine are mostly involved, while large bowel involvement is very rare. Multiple myeloma should be considered in the differential diagnosis of some other diseases of the large bowel associated with weight loss, diarrhoea, malabsorption, frequent lumbar pain, effort intolerance. Colonoscopic biopsy followed by histopathological examination is essential for the diagnosis of multiple myeloma. Multiple myeloma with extramedullary infiltration of the colon has no well defined treatment guideline. Localised infiltration of gastrointestinal tract could be treated by surgical resection, but as these tumors are radiosensitive, radiotherapy has also been used. Chemotherapy with pulsed dexamethasone and afterwards a combination of cyclophosphamide, vincristine, melphalan and prednisone has been described in some case studies. Some patients were treated with other therapies including thalidomide, bortezomib, autologous or allogeneic stem cell transplantation. The clinical presentation, diagnosis and therapy may be challenging, so we present a 66-year old patient with extramedullary multiple myeloma of the colon who was treated at our Department.

Key words: multiple myeloma, gastrointestinal involvement

MULTIPLI MIJELOM U BOLESNIKA S DUGOGODIŠNJOM KRONIČNOM LIMFOCITNOM LEUKEMIJOM - PRIKAZ BOLESNIKA I PREGLED LITERATURE

INGA MANDAC ROGULJ¹, DELFA RADIĆ-KRIŠTO¹, VIBOR MILUNOVIĆ¹,
SLOBODANKA OSTOJIĆ KOLONIĆ^{1,3}, BILJANA JELIĆ-PUSKARIĆ¹ i ANA PLANINC-PERAICA^{1,3}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju,

²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku i ³Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Rijetko se u istog bolesnika dijagnosticira kronična limfocitna leukemija (KLL) i multipli mijelom. U dostupnoj literaturi većinom su opisani pojedinačni prikazi bolesnika. U većine bolesnika multipli mijelom je dijagnosticiran nekoliko godina nakon što je postavljena dijagnoza KLL. Pojedini su autori analizirajući svoja iskustva naveli kako su neki bolesnici s KLL-om samo opservirani, a kod drugih je liječenje KLL-a bilo u tijeku kad im je dijagnosticiran multipli mijelom. U nekim je radovima navedeno da terapija koja se primjenjuje u bolesnika s KLL-om može inducirati nastanak sekundarne neoplazme, pa tako i multiplog mijeloma. Prikazujemo tijek bolesti i liječenje 72-godišnjeg bolesnika s KLL-om u tijeku koje je dijagnosticiran i multipli mijelom. Istodobno postojanje dviju hematoloških neoplazmi može biti dijagnostički problem, ali je istodobno i terapijski izazov u izboru načina liječenja.

Ključne riječi: kronična limfocitna leukemija, sekundarna neoplazma, multipli mijelom

Adresa za dopisivanje: Inga Mandac Rogulj
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: imandac@yahoo.com

UVOD

U bolesnika s hematološkom neoplazmom rijetko se kad pojave klinički znakovi još jedne hematološke neoplazme. Izuzetno je rijetka pojava plazmocitoma u tijeku liječenja kronične limfocitne leukemije (KLL) u istog bolesnika. Kronična limfocitna leukemija i multipli mijelom su hematološke neoplastičke bolesti nastale u različitim stadijima sazrijevanja limfocita. Kada se u jednog bolesnika dijagnosticiraju obje bolesti, moguće je da se radi o istom klonu ili pak o neovisnom razvoju dvaju hematoloških poremećaja koji potječu iz različitih klonova limfatičnih stanica B staničnog podrijetla (1). Pojava dviju hematoloških tumorskih bolesti je dijagnostički i terapijski izazov. U ovom je radu prikazan tijek bolesti i liječenje 72-godišnjeg bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom u tijeku koje je dijagnosticiran i multipli mijelom.

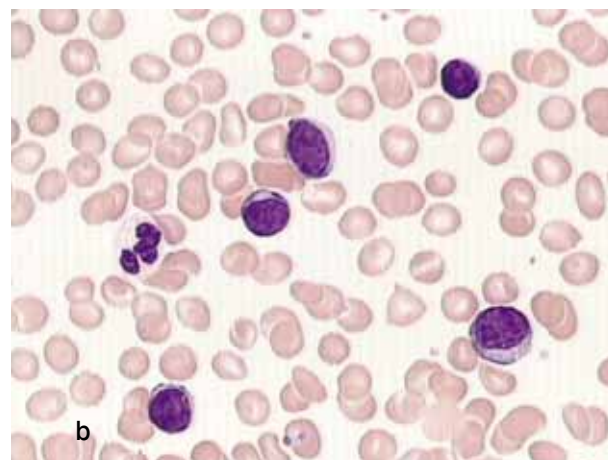
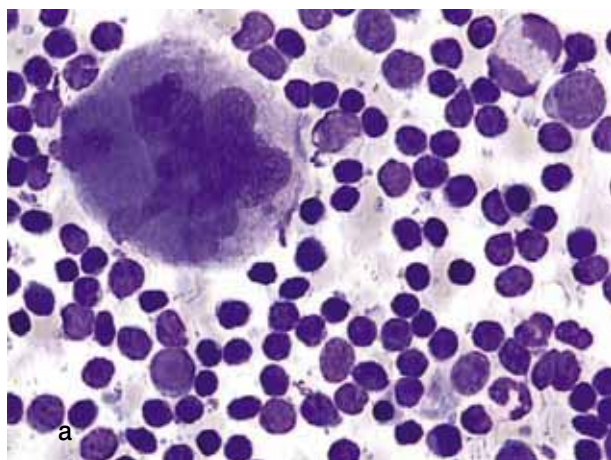
PRIKAZ BOLESNIKA

U bolesnika rođenog 1939. g. dijagnosticirana je 1999. g. KLL (B-fenotipa), male tumorske mase pa nije ni započeta terapija za KLL. U studenom 2003. g. hospitaliziran je zbog opće slabosti i malaksalosti. Obradom je nađena autoimuna hemolitička anemija uzrokovana toplim antitijelima. Citološkom punkcijom koštane srži nađena je eritroblastopenija, rijetki megakariociti i infiltracija malim limfocitima (70%) (sl. 1). Protočnom citometrijom stanica koštane srži u području B limfocita nađen je fenotip CD19+CD20+CD23+CD5+CD38+/- i monoklonalni laki lanci kappa slabog izražaja. Započeta je terapija prednizonom u dozi 80 mg/dan i bolesnik se ubrzo oporavio, nije bilo laboratorijskih pokazatelja hemolitičke nemije. U ožujku 2004. g. hospitaliziran je u Kliničkoj bolnici Merkur zbog kompresivne frakture kralježaka Th12 i L1. Bole-

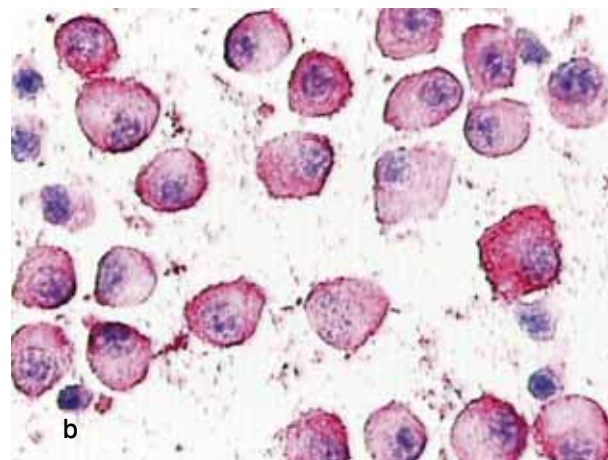
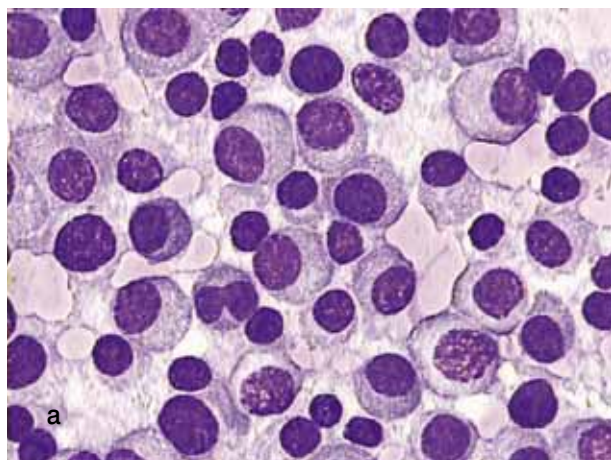
sniku je predložena citološka punkcija promijenjenih kralježaka čemu nije bio sklon. Provedena je radioterapija kralježaka nakon čega se nastavio kontrolirati u hematološkoj ambulanti. U lipnju 2006. g. u nalazima se uočava autoimuna hemolitička anemija pa je liječen ciklofosfamidom i prednisonom, te ciklosporinom. Kontrolna citološka punkcija koštane srži opisuje tada normocelularni punktata uz umnožene male limfocite, nešto prolimfocita i zarezanih oblika (ukupno 67%), a ostali hematološko-biokemijski nalazi odgovaraju KLL-u i autoimunoj hemolitičkoj anemiji. U rujnu 2009. g. bolesnik dolazi na redovitu hematološku kontrolu. Bolesnik sam primjećuje zadebljanje sternalnog kraja desne klavikule. Na kontrolnom CT-u prsnog koša u području sternalnog kraja klavikule uočava se endostoza kosti s ekspanzivnom mekotkivnom tvorbom koja fragmentira kortikalis opisanog dije-

la kosti. Bolesnik ni tada nije bio sklon citološkoj punkciji tvorbe, pa je provedena radioterapija navedenog područja bez prethodne citološke verifikacije. Liječenje je povremeno bilo otežano zbog infekcija respiratornog sustava (sinusitis, pneumonija) u sklopu hipogamaglobulinemije zbog čega je jednom mjesečno dobivao pripravke ljudskih imunoglobulina.

U veljači 2010. g. bolesnik primjećuje tvorbu frontoparijetalno lijevo. Citološkom punkcijom navedene tvorbe nađene su brojne krupne atipične (neke binuklearne i multinuklearne) plazma stanice, proplazmociti i plazmoblasti (sl. 2a) pozitivni na CD138 (sl. 2b) i CD56. Biopsijom koštane srži nađena je hipocelularna koštana srž s difuznom infiltracijom malih limfocita, limfoplazmacitoidnih oblika i plazma stanica uz nešto veće transformi-



Sl. 1. Kronična limfocitna leukemija: a) punktata koštane srži, b) razmaz periferne krvi, May-Grünwald Giemsa, x1000



Sl. 2. Atipične plazma stanice u punktatu promjene na čelu - frontoparijetalno. a) May-Grünwald Giemsa, x1000 ; b) imunocitokemijski CD138 pozitivne plazma stanice (LSAB, x1000)

rane oblike limfatičnih stanica (ZAP-70 pozitivne) (sl. 1 i 2). Hematološki nalazi su ukazivali na leukocitozu sa limfocitozom ($L 77,12 \times 10^9/L$, ly 75%), umjerenu anemiju (E 3,24 Hb 106, MCV 104,6 L) a broj trombocita (Tr 178) i sedimentacija eritrocita (SE 30) su bili u referentnim vrijednostima, dok je koncentracija beta-2-mikroglobulina bila povećana (6,6 mg/L). Imunoelektroforeza proteina u serumu bila je uredna. U kliničkom statusu nađena je periferna limfadenopatija i splenomegalija. Citološka punkcija aksilarnog limfnog čvora odgovarala je KLL/SLL s limfoplazmacitoidnom diferencijacijom. Protočnom citometrijom stanica limfnog čvora nađen je povećani udio B limfocita fenotipa (CD45+CD19+CD20+CD5+CD23+CD38+CD22+/-) s klonalnim izražajem lakih lanaca imunoglobulina (kappa) slabog intenziteta, čiji je fenotip odgovarao atipičnoj B-KLL. Plazma stanice bile su prisutne u oko 2% ostatnih mononuklearnih stanica te nisu zadovoljavale kriterije za multipli mijelom. S obzirom na progresiju limfoproliferativnog poremećaja nastavljeno je liječenje s osam ciklusa terapije po shemi COP-R (ciklofosamid, onkovin, prednison, rituksimab), a zbog osteolitičkih lezija na kostima lubanje i patoloških fraktura u području torakalne i lumbalne kralježnice, započeta je terapijom pamidronata koji je primao u infuziji jednom mjesečno. U listopadu je provedena radioterapija plazmocitoma lijevo frontoparijetalno. Reevaluacija stanja bolesti nakon kemoterapije i radioterapije učinjena je u prosincu 2010. g. i nađeno je da je stanje zadovoljavajuće. Hematološki i biokemijski parametri bili su uredni, nije nađeno novih osteolitičkih lezija, a u kliničkom statusu nije bilo periferne limfadenopatije niti organomegalije.

RASPRAVA

Istodobna pojava dvaju hematoloških poremećaja dijagnostički je i terapijski izazov. Važno je utvrditi stanično podrijetlo i prirodu poremećaja, jer se iz takvih podataka mogu dobiti podaci o biologiji tumora (2). U našeg su bolesnika rezultati kliničkih, morfoloških i radioloških pretraga pokazali da boluje od kronične limfocitne leukemije koja se kasnije komplicirala eritroblastopenijom i autoimunom hemolitičkom anemijom. Nakon deset godina dijagnosticiran je i multipli mijelom.

Pojava KLL-a i multiplog mijeloma u istog bolesnika je ranije opisivana u literaturi, a često je u većine bolesnika bilo potrebno razjasniti koji se od dva poremećaja prvi očitovao. U nekim su slučajevima oba poremećaja nastala iz istog klona, dok su se u nekima razvijali iz različitih klonova s istodobnim kliničkim očitovanjem. U većini se slučajeva dijagnozu mijeloma postavilo jednu do 15 godina nakon dijagnoze KLL-a. U radovima u kojima je opisivana istodobna pojava KLL-a i multiplog mijeloma, bolesnici su imali lošiju prognozu s brзом progresijom bolesti i ozbiljnim infekcijama. Vrlo rijetko je dijagnoza multiplog mijeloma prethodila KLL-u (2).

U našeg je bolesnika, dijagnoza multiplog mijeloma postavljena 11 godina nakon dijagnoze KLL-a, iako nije isključena mogućnost da se je multipli mijelom pojavio nakon 5 godina s obzirom na patološke frakture u području kralježnice zbog kojih je provedena radioterapija. KLL se može transformirati u različite entitete, najčešće u prolimfocitnu leukemiju i velikostanični limfom (Richterov sindrom). U takvim se slučajevima radi o dediferencijaciji, dok je transformacija u multipli mijelom pojava monoklonalnih plazma stanica u koštanoj srži koje su krajnje diferencirani B limfociti. Pojedini su autori u pokušaju da razjasne podrijetlo početnog klona proučavali lake lance imunoglobulina i analizirali preuredbu gena imunoglobulina. Monoklonalni imunoglobulini se mogu uočiti u serumu u 1% do 5% bolesnika s KLL-om (3-6). Nekoliko je autora pokazalo veliku učestalost sekundarnih neoplazmi u bolesnika s KLL-om. Ne-Hodgkinov limfom je opisan u oko 3% bolesnika, Hodgkinova bolest u 0,5%, a multipli mijelom u 0,1% bolesnika s KLL-om. Maurice Richter je 1928. godine prvi opisao pojavu agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma u bolesnika s KLL-om (7). Robak i sur. opisali su plazmablastičnu varijantu difuznog velikostaničnog limfoma u bolesnika s KLL-om liječenog kladribinom. Plazmablastični limfom se razvio četiri godine nakon postavljene dijagnoze KLL-a i 1,5 godinu nakon liječenja kladribinom. Na terapiju VAD-om (vinkristin, doksorubicin, deksametazon) nije postignut nikakav učinak, a parcijalni terapijski odgovor postignut je nakon kemoterapije po shemi CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednison). Pretpostavka je autora bila da je odvojeni plazmablastični klon nastao nakon

prolongirane imunosupresije kladribinom (7). Pavliša i suradnici su prikazali dva bolesnika s neliječenom KLL u kojih se nakon 4 godine razvila akutna mijeloična leukemija (AML-M2) (8).

Hanganu je 2002. g. opisao sedam bolesnika (dvi-je žene, pet muškaraca) sa sindromom multiplih tumora (u jednog su bolesnika dijagnosticirane najmanje dvije neoplazme). Razdoblje između trenutka dijagnosticiranja dviju neoplazme bilo je između 2 do 23 godine u 6 slučajeva, a u jednog su se bolesnika obje neoplazme pojavile istodobno. Hematološki poremećaji su bili multipli mijelom, kronična granulocitna leukemija, KLL, a od solidnih tumora maligni melanom, planocelularni karcinom, karcinom štitnjače, hemangiosarkom i genitalni tumori (9).

Prikaz bolesnika kojem je dijagnosticiran multipli mijelom nakon liječenja KLL fludarabinom, opisali su Patriarca i sur. Kronična limfocitna leukemija je dijagnosticirana četiri godine prije multiplog mijeloma. Autori u početku nisu sa sigurnošću mogli utvrditi je li multipli mijelom nastao iz zasebnog klona ili je nastanku pridonio fludarabin izazivajući imunosupresiju. Analiza protočnom citometrijom pokazala je izražaj lambda lanaca na monoklonalnim B limfocitima, dok su plazma stanice izražavale kappa lance, a preuredba gena za teški lanac imunoglobulina potvrdila je postojanje dvju različitih klonova, od kojih je jedan bio prisutan u perifernoj krvi. Bolesnik je liječen autolognom transplantacijom matičnih stanica, a reevaluacijom nakon 18 mjeseci nije se moglo detektirati klon KLL-a, dok je postojalo 15% do 20% klonalnih plazma stanica u koštanoj srži (10).

Fludarabin može interferirati s razinom IL-4, koji se nalazi u mikrokolišu KLL-a, i moguće je da se smanjivanjem razine IL-4 potiče sazrijevanje B-limfocita u plazma stanice. Ali za takve zaključke bi trebalo provesti dodatna istraživanja radi razjašnjenja kako kemoterapija KLL-a (FED = fludarabin, ciklofosfamid, deksametazon; FCR = fludarabin, ciklofosfamid, rituksimab) utječe na razvoj multiplog mijeloma (11). Melih Aktan i sur. su opisali bolesnika s KLL-om kojem je dijagnoza nesekretornog multiplog mijeloma postavljena 7 godina nakon dijagnoze KLL-a. Bolesnik je zbog KLL-a intermitentno liječen klorambucilom i prednizolonom.

Klonalna povezanost dvaju poremećaja dokazana je usporedbom izotipova i idiotipova teških i lakih lanaca imunoglobulina (12). Tomas Pika i sur. su prikazali 78-godišnju bolesnicu kojoj je pet godina nakon što joj je dijagnosticirana kronična limfocitna leukemija, postavljena sumnja na meningeom uz fokalne neurološke simptome. Učinjenom perioperativnom patohistološkom analizom tvorbe veličine oko 33x75 mm s infiltracijom dure i destrukcijom kosti, nađen je infiltrat miješanih polimorfnih plazmocita s izražajem CD138, CD79a i lakih lanaca kappa tipa što odgovara plazmocitomu. Bolesnica je liječena s pet ciklusa terapije po shemi CTD (ciklofosfamid, talidomid, deksametazon) i radioterapijom zahvaćenog područja na glavi, te je postignut zadovoljavajući terapijski učinak (13).

Svi ovi, a i brojni drugi prikazi bolesnika, ukazuju na to da bolesnici s KLL-om imaju povećani rizik obolijevanja od sekundarnih hematoloških i nehematoloških neoplazmi. Manusow i Weinerman su 1975. godine objavili rezultate retrospektivne studije na 102 bolesnika s KLL-om i pokazali su kako je kod njih dvaput veći rizik za bilo koji maligni tumor, a osam puta veći rizik za maligne tumore kože (14).

Za B-KLL je karakterističan deficit stanične i humoralne imunosti uz hipogamaglobulinemiju, kvantitativni i funkcionalni poremećaj T-limfocita, a neke su studije pokazale kako takvi poremećaji imunološkog sustava mogu utjecati na razvoj sekundarnih neoplazmi. Mutageni učinak i jatrogena imunosupresija izazvana purinskim analogima koji se koriste u liječenju KLL-a, mogu povećati rizik za razvoj sekundarnih neoplazmi (15).

Moguće je da je u našeg bolesnika došlo do pojave novog klona koji je doveo do pojave multiplog mijeloma. Primijenjena je kombinacija citostatika koja je bila učinkovita u liječenju obje hematološke neoplazme uz adjuvantnu radioterapiju. U bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom moguća je pojava sekundarnih neoplazmi. Slučaj našeg bolesnika, kao i ostali koji su dosad opisani, potiču dijagnostičare da pojavu novih tumorskih infiltrata podvrgnu daljnjim diagnostičkim postupcima. Iako su one najčešće manifestacija osnovne bolesti, u tih bolesnika može nastati nova neoplazma čije rano otkrivanje daje više izgleda da će provedeno liječenje biti uspješno.

L I T E R A T U R A

1. Sucker C, Kramer A, Moos M, Goldschmidt H. Concomitant chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma, proof of common clonal origin. *Chinese-German J Clin Oncol* 2004; 3: 81-4.
2. Srinivasan S, Schiffer CA. Concurrent B-cell chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma treated successfully with lenalidomide. *Leuk Res* 2009; 33: 561-4.
3. Brouet JC, Femand JP, Laurent G i sur. The association of chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: A study of eleven patients. *Br J Haematol* 1985; 59: 55-66.
4. Femand JP, James JM, Herait P i sur. Associated chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma: Origin from a single clone. *Blood* 2001; 66: 291-3.
5. Pines A, Ben-Bassat I, Selzer G i sur. Transformation of chronic lymphocytic leukemia to plasmacytoma. *Cancer* 1984; 54: 1904-7.
6. Jakšić B, Planinc-Peraica A, Minigo H, Vitale B. Prognostička vrijednost određivanja serumskih imunoglobulina u kroničnoj limfocitnoj leukemiji. *Libri Oncol* 1985; 14:73-80.
7. Robak T, Urbanska-Rys H, Strzelecka B i sur. Plasmablastic lymphoma in a patient with chronic lymphocytic leukemia heavily pretreated with cladribine: an unusual variant of Richter's syndrome. *Eur J Haematol* 2001; 67: 322-7.
8. Pavliša G, Ostojić Kolonić S, Minigo H, Kardum-Skelin I, Kardum-Paro MM, Jakšić B. Acute leukemia in patients with untreated chronic lymphocytic leukemia: a report of two cases with remarkably similar time cluster. *Leukemia and Lymphoma* 2006; 47: 950-2.
9. Hanganu E. The multiple tumor syndrome. Personal experience. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2002; 107: 338-42
10. Patriarca F, Gaidano G, Capello D, Zaja F, Fanin R, Baccarani M. Occurrence of multiple myeloma after fludarabine treatment of a chronic lymphocytic leukemia: evidence of a biclonal derivation and clinical response to autologous stem cell transplantation. *Haematologica* 2000; 85: 982-5.
11. Kay NE, Han L, Bone N, Williams G. Interleukin 4 content in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) B cells and blood CD8+ T cells from B-CLL patients: impact on clonal B-cell apoptosis. *Br J Haematol* 2001;112: 760-7.
12. Aktan M, Akkaya A, Doğan O, Dincol G. Chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma in the same patient: Case report. *Leukemia and Lymphoma* 2003; 44: 1421-4.
13. Pika T, Bacovsky J, Vaverka M. Unusual manifestation of multiple myeloma: focal affection of central nervous system in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2009;153: 271-3.
14. Manusow D, Weinerman BH. Subsequent neoplasia in chronic lymphocytic leukemia. *JAMA* 1975; 232: 267-9.
15. Dasanu CA, Alexandrescu DT. Risk for second nonlymphoid neoplasms in chronic lymphocytic leukemia. *Med Gen Med* 2007; 9: 35.

S U M M A R Y

MULTIPLE MYELOMA IN A PATIENT WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA - CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW

I. MANDAC ROGULJ I¹, D. RADIĆ-KRIŠTO¹, V. MILUNOVIĆ¹, S. OSTOJIĆ KOLONIĆ^{1,3}, B. JELIĆ-PUŠKARIĆ² and A. PLANINC-PERAICA^{1,3}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Division of Hematology, ²Department of Clinical Cytology and Cytogenetics and ³University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

The occurrence of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and another B-cell neoplasm in the same patient is a rare event and is mostly described in the literature as single case reports. In most cases reported in the literature, CLL was diagnosed several years before multiple myeloma. Some patients were only observed for CLL without therapy, whereas others had already been treated for CLL when the diagnosis of myeloma was established. Some authors came to a conclusion that therapy used for treating CLL can induce some secondary neoplasms, like multiple myeloma. We present a male patient who was diagnosed with multiple myeloma 11 years after B-CLL had been diagnosed. Two hematologic neoplasms in one patient could be a diagnostic problem, but also a therapeutic challenge.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, secondary neoplasm, multiple myeloma

AKUTNO ZATAJENJE BUBREGA KAO PRVA MANIFESTACIJA KRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE

INGA MANDAC ROGULJ¹, INGRID PRKAČIN^{2,5}, MIRJANA SABLJAR-MATOVINOVIĆ², DANICA GALEŠIĆ LJUBANOVIĆ^{3,5} i DUNJA ŠUŠTERČIĆ⁴

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju, ²Zavod za nefrologiju, ³Klinička bolnica Dubrava, Zavod za patologiju, ⁴Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

U prosincu 2005. godine 55-godišnji bolesnik hospitaliziran je zbog akutnog zatajenja funkcije bubrega i zbog sumnje na hemoragijsku vrućicu. U fizikalnom statusu dominirala je splenomegalija (ultrazvučno slezena 18 cm, palpatorno 11 cm) uz trombocitopeniju i anemiju u hematološkim nalazima. Učinjena je biopsija bubrega, a patohistološki nalaz opisivao je limfoproliferativnu bolest malih limfocita B fenotipa s pozitivnim lambda lancima. Citološkom i patohistološkom analizom koštane srži uz protočnu citometriju postavilo se dijagnozu kronične limfocitne leukemije bez apsolutne limfocitoze u perifernoj krvi. Započeta je terapija kortikosteroidima (metilprednizolon 80 mg iv), a nastavljeno terapiju prednizonom (Decortin 20 mg tbl) uz klorambucil (Leukeran 16 mg tbl) tijekom tri dana. Uz navedenu terapiju dolazi do porasta broja trombocita, pada razine kreatinina i oporavka bubrežne funkcije. Provedeno je 6 ciklusa terapije prednizonom i klorambucilom na koji je postignut zadovoljavajući terapijski učinak uz uredne hematološke parametre i blažu splenomegaliju pa je liječenje nastavljeno prednizonom u dnevnoj dozi od 10 mg. Naš bolesnik je jedan od dosad opisanih s akutnim zatajenjem bubrežne funkcije kao rijetkom komplikacijom kronične limfocitne leukemije. Biopsija bubrega je potrebna za potvrdu dijagnoze. Bubrežna funkcija se može potpuno oporaviti na odgovarajuću terapiju, a u našeg je bolesnika do njenog oporavka došlo uz terapiju klorambucilom i prednizonom.

Ključne riječi: akutno zatajenje bubrežne funkcije, kronična limfocitna leukemija

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Ingrid Prkačin, dr. med.
Zavod za nefrologiju,
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10 000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: ingrid.prkacin@gmail.com

UVOD

Kronična limfocitna leukemija (KLL) je limfoproliferativna bolest kod koje je broj B limfocita veći od $5 \times 10^9/L$ u perifernoj krvi, bez obzira na postojanje ili nepostojanje ekstramedularne infiltracije organa i tkiva. Infiltracija B limfocitima se može naći u bilo kojem organu, najčešće u slezeni, jetri i limfnim čvorovima. Vrlo su rijetki prikazi bolesnika s KLL i posljedičnim akutnim zatajenjem funkcije bubrega u kojih je infiltracija bubrega leukemijskim stanicama dokazana biopsijom bubrega.

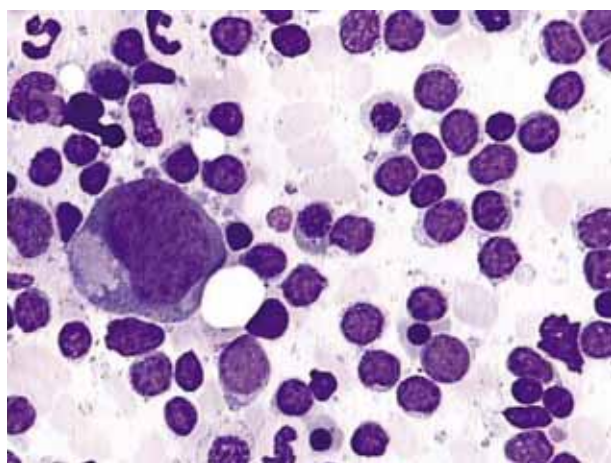
Ovo je prikaz bolesnika s akutnim zatajenjem bubrežne funkcije zbog leukemijske infiltracije bubrega kao prvom manifestacijom KLL.

PRIKAZ BOLESNIKA

U prosincu 2005. godine u našoj je Klinici hospitaliziran 55-godišnji bolesnik zbog akutno nastalog zatajenja funkcije bubrega sa sumnjom na sistemsku bolest vezivnog tkiva. U kliničkom statusu dominirala je splenomegalija (slezena ultrazvučno 190x70 mm), u hematološkim nalazima anemija (Hb 81

g/L) s trombocitopenijom ($Tr\ 78 \times 10^9/L$), uz uredne vrijednosti leukocita ($L\ 5,14 \times 10^9/L$) i apsolutnog broja limfocita ($2,46 \times 10^9/L$). U biokemijskim nalazima uočena je povišena razina kreatinina (273 $\mu\text{mol/L}$), ureje 16,8 mmol/L , urata 530 $\mu\text{mol/L}$. Ultrazvuk bubrega opisao je desni bubrežni veličine oko 101 mm, prosječne širine parenhima 14 mm, pravilnog centralnog hilusnog efekta, a lijevi bubrežni veličine 106 mm, prosječne širine parenhima 14 mm, urednog centralnog hilusnog efekta. U sedimentu urina nađena je leukociturija, eritrociturija i cilindri. Zbog nejasne etiologije akutnog zatajenja bubrega učinjena je biopsija bubrega, a nalaz je ukazivao na limfoproliferativnu bolest malih limfocita fenotipa B s pozitivnim lambda lancima, uz umjerenu intersticijsku fibrozu i tubularnu atrofiju. S obzirom na nalaz biopsije bubrega učinjena je dodatna hematološka obrada. Razmaz periferne krvi pokazao je povećan udio atipičnih limfocita uz uredne vrijednosti ukupnog broja leukocita ($L\ 5,14 \times 10^9/L$, $ly\ 41\%$, $atip\ ly\ 14\%$), a protočna citometrija stanica periferne krvi nađena je u području limfocita, populaciji koja iskazuje u većini biljege B limfocita fenotipa $CD19+CD20+CD5+CD38+CD23-/+$ s klonalnim izražajem lakih lanaca imunoglobulina lambda srednje jačine.

Citološka punkcija koštane srži opisala je normocelularan punkt uz umnožene male $CD20$ pozitivne limfocite (37% limfocita) te nešto prolimfocita (4%) uz velike nakupine u grubom partiklu (sl. 1). Morfologija limfocita u koštanoj srži odgovarala je kroničnoj limfocitnoj leukemiji, a što je potvrđeno i



Sl. 1. Punktat koštane srži s umnoženim malim limfocitima, May-Grünwald Giemsa, $\times 1000$

protočnom citometrijom stanica koštane srži (B limfociti fenotipa $CD19+CD20+CD38+CD5+CD23-/+$ s klonalnim izražajem lakih lanaca imunoglobulina lambda srednje jačine), što odgovara sindromu B-kronične limfocitne leukemije. Započeta je terapija kortikosteroidima (prednizon 20 mg tbl) i klorambucilom (16 mg) tijekom 6 ciklusa na koju je postignut zadovoljavajući terapijski učinak. Nastavilo se terapiju održavanja prednizonom u dozi od 10 mg/tbl.

U veljači 2009. godine bolesnik je hospitaliziran radi ponovne biopsije bubrega kojom se nađe gusti infiltrat malim limfocitima B imunofenotipa uz izraženiju intersticijsku fibrozu i tubularnu atrofiju. Nastavljena je terapija održavanja prednizonom u dozi 10 mg/dan. Kontrolni hematološki i biokemijski nalazi su zadovoljavajući ($L\ 3,90 \times 10^9/L$) uz urednu diferencijalnu krvnu sliku i periferni razmaz krvi, blažu trombocitopeniju ($Tr\ 110 \times 10^9/L$), dok je vrijednost kreatinina 128 $\mu\text{mol/L}$.

RASPRAVA

Infiltracija bubrega opisana je u oko 63-90% svih bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom, ovisno o podacima pojedinih autora (1).

Oštećenje bubrežne funkcije bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom može se manifestirati opstruktivnom uropatijom, akutnom nefropatijom zbog viška mokraćne kiseline (sindrom lize tumora), hemolizom, glomerulopatijama (od kojih su najčešće membranoproliferativni glomerulonefritis s krioglobulinima, fokalni ili difuzni proliferativni glomerulonefritis, nefropatija lakih lanaca, primarna amiloidoza) i najrjeđe leukemijskom infiltracijom bubrega, kao što je bio slučaj u ovoga bolesnika. Oštećenje bubrežne funkcije zbog leukemijskog infiltrata dosad je opisivano u bolesnika s akutnom leukemijom. Vrlo su rijetki prikazi bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom kod kojih je opisan i patohistološki nalaz biopsije bubrega. U svih je opisanih slučajeva u bubrežnom parenhimu nađen masivni intersticijski infiltrat limfocitima koji su imali isti fenotip kao i limfociti iz periferne krvi (2).

Barcos i sur. su analizirali obdukcijske nalaze 109 bolesnika s KLL i u 63% našli infiltraciju bubrega leukemijskim stanicama (3). Schwartz i Shamsuddin su u obdukcijским nalazima 47 bolesnika s KLL-om našli zahvaćenost bubrega u 90% bolesnika, ali je samo u 4 bolesnika nađen difuzni infiltrat (4). Phillips i sur. su opisali bolesnika s KLL-om u kojega je analizom biopsata bubrega leukemijski infiltrat bio izraženiji u srži nego u kori bubrega: od 33 glomerula u 29 je utvrđena ishemija glomerula s periglomerularnom fibrozom, a u ostalih 4 globalna skleroza. U arterijama je uočena umjerena fibroelastična proliferacija intime i umjerena hijalina skleroza. Nalaz je interpretiran kao teška ishemijska nefroskleroza s leukemijskom infiltracijom kore bubrega (5). Norris i Wiener nisu našli vezu između leukemijskog infiltrata bubrega i oštećenja bubrežne funkcije. Pregledom 700 bolesnika s limfomom i KLL-om u razdoblju od 10 godina dijagnosticirano je 83 bolesnika s akutnim oštećenjem bubrega: od toga 17 bolesnika s KLL-om, a oštećenje bubrežne funkcije povezano s leukemijskim infiltratom nađeno je u 3 bolesnika (6). S obzirom da je očekivano preživljenje bolesnika s KLL-om duže od 10 godina, bolesnici koji uz KLL boluju i od završne faze kronične bubrežne insuficijencije mogu biti kandidati za transplantaciju bubrega. Francuska skupina autora predvođena D'Ythurbideom prikazala je 4 bolesnika s KLL-om i završnom fazom bubrežne insuficijencije kojima su transplantirani bubrezi. Uzroci oštećenja bubrežne funkcije bili su dijabetička nefropatija, nefroangioskleroza, policistična bolest bubrega, fokalna i segmentna glomeruloskleroza. Nakon transplantacije bubrega bolesnici su bili praćeni 32-46 mjeseci. Dva su bolesnika umrla od septičnih komplikacija, jedan od progresije KLL-a, a jedan bolesnik je nakon 3 godine od transplantacije, stabilnih hematoloških parametara i sa zadovoljavajućom funkcijom bubrega. Autori su istaknuli važnost suradnje nefrologa i hematologa kod odabira imunosupresivne terapije, koja može pogoršati KLL. Prednost su dali mikofenolatu i m-TOR inhibitorima (Mammalian Target of Rapamycin = ciljna molekula rapamicina u sisavaca) u odnosu na kalcineurinske inhibitore. Ako ipak dođe do progresije KLL-a nakon transplantacije bubrega, mogući imunosupresivni lijekovi mogu biti rituksimab i fludarabin. Pokazano je kako je KLL rizičan čimbenik koji pogoršava mogućnost oporavka transplantiranog bubrega te

je u svakog bolesnika potrebno procijeniti prognostičke parametre za KLL (veličina tumorske mase na osnovi limfocitoze, palpabilne slezene i najvećeg palpabilnog limfnog čvora, raspodjela tumorske mase, brzina rasta tumora, mutacijski status, izražaj CD38 i ZAP-70) koji bi olakšali odluku oko terapijskog pristupa (7). Nema dovoljno provjerenih terapijskih protokola u bolesnika s KLL-om i oštećenom bubrežnom funkcijom. U liječenju su korišteni COP-R (ciklofosamid, vinkristin, prednizon, rituksimab), COP (ciklofosamid, vinkristin, prednizon), FCR (fludarabin, ciklofosamid, rituksimab) monoterapija prednizonom, kombinacija prednizona i klorambucila (6-9).

Kombinacija prednizolona i klorambucila korištena je kod našeg bolesnika uz odličan terapijski učinak i gotovo potpuni oporavak bubrežne funkcije.

L I T E R A T U R A

1. Ferreira AC, Brum S, Carvalho D, Pataca I, Carvalho F, Santos MC. Renal dysfunction due to leukemic infiltration of kidneys in a case of chronic lymphocytic leukemia. *Hemodial Int* 2010; 14: 87-90.
2. Comerma-Coma MI, Sans-Boix A, Tuset-Andujar E, Andreu-Navarro Javier, Perez-Ruiz A, Naval-Marcos I. Reversible renal failure due to specific infiltration of the kidney in chronic lymphocytic leukaemia. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1550-52.
3. Barcos M, Lane W, Gomez GA i sur. An autopsy study of 1206 acute and chronic leukemias (1958 to 1982). *Cancer* 1987; 60: 827-37.
4. Schwartz JB, Shamsuddin AM. The effects of leukemic infiltrates in various organs in chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol* 1981; 12: 432-40.
5. Phillips JK, Bass PS, Majumdar G, Davies DR, Jones NF, Pearson TC. Renal failure caused by leukemic infiltration in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol* 1993; 46: 1131-33.
6. Rifkin SI. Acute renal failure secondary to chronic lymphocytic leukemia: a case report. *Medscape J Med* 2008; 10: 67.
7. d'Ythurbidea G, Coppob P, Adema A i sur. Chronic lymphocytic leukemia: a hazardous condition before kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2471-75.

8. Mutluay R, Aki SZ, Erten Y i sur. Membranoproliferative glomerulonephritis and light-chain nephropathy in association with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Nephrol* 2008;70: 527-31.

9. Haraldsdóttir V, Haanen C, Jordans JG. Chronic lymphocytic leukaemia presenting as renal failure with lymphocytic infiltration of the kidneys. *Neth J Med* 1992; 41: 64-7.

S U M M A R Y

ACUTE RENAL FAILURE AS FIRST MANIFESTATION OF B-CLL

I. MANDAC ROGULJ¹, I. PRKAČIN^{2,5}, M. SABLJAR MATOVINOVIĆ²,
D. GALEŠIĆ LJUBANOVIĆ^{3,5} and D. ŠUŠTERČIĆ⁴

¹Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Division of Hematology, ²Division of Nephrology, ³University Hospital Dubrava, Department of Pathology, ⁴Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics and ⁵University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia

In December 2005, the 55-year-old patient was hospitalized because of acute kidney failure and suspected hemorrhagic fever. The physical examination showed splenomegaly (spleen ultrasound-18 cm in large diameter, and 11 cm by palpation) with thrombocytopenia and anemia. He underwent kidney biopsy which described infiltration of small B cell lymphocytes with positive lambda chains. His bone marrow showed infiltration of atypical lymphocytes, and flow cytometry was typical of B-cell CLL. Patient started therapy with corticosteroids (methylprednisolone 80 mg iv) and continued treatment with prednisone (Decortin 20 mg tablets) and chlorambucil (Leukeran 16 mg tablets) through three days. An addition to therapy lead to an increase in platelet count, creatinine level decline and recovery of renal function was observed. He was treated with 6 cycles of therapy with prednisone and chlorambucil and achieved a satisfactory therapeutic effect with adequate hematologic parameters and less severe splenomegaly. Maintenance therapy was continued with prednison at daily dose of 10 mg. Our patient is one of the amongst previously reported as an example of a rare complication of CLL with leukemic infiltrate causing acute renal insufficiency. Renal biopsy is necessary to confirm the diagnosis. This complication appears to respond well to a variety of treatments. Our patient achieved complete resolution of renal failure and partial hematological response with combination of chlorambucil and prednisone.

Key words: acute renal failure, B-cell chronic lymphocytic leukemia

ERITROBLASTI U PERIFERNOJ KRVI ODRASLOG BOLESNIKA KAO NEPOVOLJAN PROGNOŠTIČKI PREDZNAK - PRIKAZ BOLESNIKA

DOMAGOJ MOSLER¹, GORDANA CAVRIĆ², SLAVICA NAUMOVSKI-MIHALIĆ², IKA KARDUM-SKELIN^{3,6}, DUNJA ŠUŠTERČIĆ³, BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ³, INGRID PRKAČIN^{2,6}, IVICA PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ², TIHOMIR BRADIĆ², AIDA NAZOR⁴ i ELVIRA LAZIĆ MOSLER^{5,6}

¹Lječilište Topusko, Topusko, ²Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, ³Zavod za citologiju i citogenetiku, ⁴Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, ⁵Zavod za anatomiju i ⁶Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Eritroblasti se javljaju tijekom teških bolesti, a povezani su s nepovoljnom prognozom i većim mortalitetom. Prikazujemo bolesnika koji je primljen u bolnicu zbog srčanog popuštanja i dekompenzacije ciroze jetre. Radi se o bolesniku koji je od ranije bolovao od ciroze jetre etilične etiologije, srčanog popuštanja zbog hipertenzivne bolesti srca uz permanentnu fibrilaciju atrija, KOPB-a, šećerne bolesti tipa 2 i kolelitijaze. Tijekom boravka došlo je do razvoja akutnog pankreatitisa, a ubrzo potom i moždanog udara s lijevostranom hemiparezom uz kardiopulmonalni zastoje zbog čega je premješten u JLL. Uz pogoršanje općeg stanja i razvoj višestrukog organskog zatajenja unatoč adekvatnoj terapiji, zadnja tri dana prije smrti utvrđena je pojava i porast koncentracije eritroblasta u perifernoj krvi. Unatoč kardiorespiratornoj potpori i intenzivnom liječenju, bolesnik je preminuo. Patofiziologija pojave eritroblasta u perifernoj krvi još je nejasna. Prema većini teorija smatra se da je posljedica pojačane eritropoeze ili oštećenja mikro-arhitekture koštane srži, većinom izazvanih hipoksičnim ili upalnim oštećenjem. Određivanje broja i praćenje dinamike eritroblasta u perifernoj krvi potencijalni je rani i neovisni prognostički čimbenik i indikator povećanog mortaliteta s obzirom da se oni pojavljuju 1 do 3 tjedna prije smrti. Otkrivanje njihove pojave može doprinijeti procjeni rizika bolesnika i donošenju odluka o daljnjem pristupu i liječenju.

Ključne riječi: eritroblasti, mortalitet, prognoza, intenzivno liječenje

Adresa za dopisivanje: Domagoj Mosler, dr. med.
Trg bana Josipa Jelačića 16
44415 Topusko, Hrvatska
Tel: 00385 91 751 34 71
E-pošta: domagoj.mosler@gmail.com

UVOD

U normalnim uvjetima, osim novorođenačke dobi, u perifernoj krvi nema eritroblasta. Njihova je pojava patološka i vezana je uz teške bolesti (1-4) s nepovoljnijom prognozom (1,2,5,6), dok je patofiziologija pojave eritroblasta u perifernoj krvi još uvijek nejasna. Prema većini teorija smatra se da je posljedica pojačane eritropoeze ili oštećenja mi-

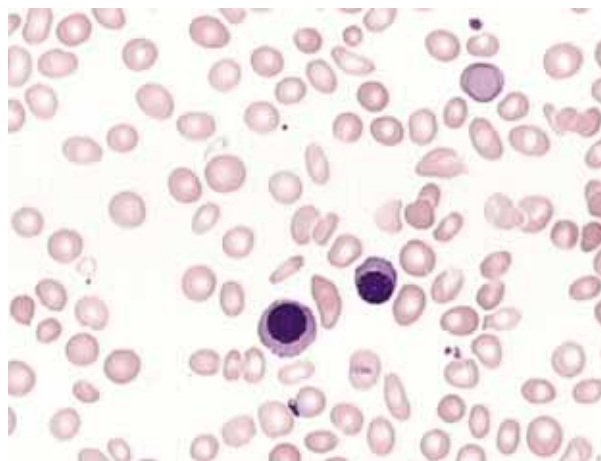
kro-arhitekture koštane srži (5-7), većinom izazvanih hipoksičnim ili upalnim oštećenjem. Otkrivanje pojave eritroblasta u perifernoj krvi i određivanje njihove koncentracije može služiti kao rani indikator povećanog mortaliteta (8) s obzirom da se pojavljuju 1 do 3 tjedna prije smrti (9,10), ali i pomoći u ocjeni rizika bolesnika i donošenja odluka o daljnjem pristupu liječenju (11,12).

PRIKAZ BOLESNIKA

Početak siječnja 2011. god. u Odjelu gastroenterologije hospitaliziran je 79-godišnji muškarac zbog dekompenzacije ciroze jetre i srčanog popuštanja. Riječ je o bolesniku koji se do tada neredovito liječio i kontrolirao zbog ciroze jetre etilične etiologije, srčanog popuštanja zbog hipertenzivne bolesti srca uz permanentnu fibrilaciju atrija, KOPB-a, šećerne bolesti tipa 2 i kolelitijaze. Kod prijma broj bodova prema II ocjenskoj skali APACHE (engl. *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*) iznosio je 15, broj bodova prema Glasgow ljestvici za komu (GSC, engl. *Glasgow Coma Scale*) 15, a status dekompenzirane ciroze jetre prema klasifikaciji Child-Pugh - A 6 bodova. Uz primijenjenu terapiju stanje bolesnika se nije popravilo, već je došlo do pojave infekcije urinarnog trakta i mukopurulentnog traheobronhitisa zbog čega je u terapiju uključen i ciprofloksacin.

Daljnji klinički tijek komplicirao se razvojem akutnog pankreatitisa te ubrzo potom i ishemijskog moždanog udara s lijevostranom hemiparezom praćenog kardiorespiratornim arestom pa je bolesnik premješten u jedinicu intenzivnog liječenja (JIL). Proveden je reanimacijski postupak uz endotrahealnu intubaciju i uspostavu mehaničke ventilacije, a u terapiju su zbog hipotenzije uvedeni i vazoaktivni lijekovi. Na dan prijma u JIL bio je po klasifikaciji Child-Pugh u B stadiju sa 7 bodova, po GSC imao je 6 bodova te po APACHE II 33 boda, dok je broj bodova Ranson bio 4 sa 15% predviđenog mortaliteta od akutnog pankreatitisa. Uz primijenjenu terapiju bolesnik je došao k svijesti uz izvršavanje jednostavnih naredbi, ali i dalje ovisan o mehaničkoj ventilaciji uz potrebu vazoaktivne potpore, iako se njezin stupanj uspio djelomično smanjiti. Uz znakove difuzne lezije jetre i kolelitijazu, ultrazvučnim je pregledom trbuha utvrđena uredno velika gušterača hiperehogene strukture s nehomogenim odjekom u području trupa, što je odgovaralo nalazu akutnog pankreatitisa. CT abdomena nije učinjen iz tehničkih razloga. Učinjeni tumorski biljezi (alfa-1-fetoprotein, karcinoembrionalni antigen, ugljikohidratni antigen CA 19-9, ukupni prostatični specifični antigen) bili su u granicama referentnih vrijednosti. Zbog izrazite leukocitoze ($26,52 \times 10^9/L$), drugog dana u JIL-u učinjena je ci-

tološka analiza razmaza periferne krvi u kojem je nađeno 1% mijelocita i metamijelocita, 5% nesegmentiranih i 83% segmentiranih leukocita koji su sadržavali grube granule i Döhleova tjelešca, 2% limfocita, 7% monocita, 1% plazma stanica, uz dosta trombocita i manje *rouleax* formacije eritrocita. U daljnjem tijeku bolesti praćen je porast upalnih parametara, a četvrtog dana boravka u JIL-u radiološki je utvrđena desnostrana bazalna pneumonija, zbog čega je korigirana antibiotska terapija. Osmog dana započeta je kontinuirana hemodijaliza jer je bolesnik postao oliguričan do anuričan uz porast parametara oštećenja bubrežne funkcije. Istog su dana u automatiziranoj analizi periferne krvi, uz $30,96 \times 10^9/L$ leukocita, po prvi puta otkriveni i eritroblasti ($0,72 \times 10^9/L$) (sl.1).



Sl. 1. Eritroblasti u perifernoj krvi, May-Grünwald Giemsa, $\times 1000$

Također, od toga je dana bolesnik postao komatozan uz učestale Jacksonove epileptičke motoričke parcijalne napadaje lica, lijeve ruke i noge zbog čega je uvedena antiepileptička terapija diazepamom i fenobarbitalom. Devetog dana boravka u JIL-u, uz leukocitozu od $35,5 \times 10^9/L$, ponovo su potvrđeni eritroblasti i to $4,01 \times 10^9/L$. Posljednjeg, desetog dana, unatoč svojoj primijenjenoj terapiji, kardiorespiratornoj i vazopresornoj potpori, bolesnik umire pod kliničkom slikom višeorganskog zatajenja. Na dan smrti, po klasifikaciji Child-Pugh, bio je u C stadiju sa 10 bodova uz GSC 3 i APACHE II 49, a broj eritroblasta u perifernoj krvi iznosio je $5,09 \times 10^9/L$.

RASPRAVA

Raniji nezreli oblici eritrocita normalno gube svoju jezgru prije no što se pojave u perifernoj krvi u zre- lom obliku. Nezreli oblici s jezgrom (NRBC, engl. *Nucleated Red Blood Cell*) ne mogu dovoljno promijeniti oblik te stoga niti proći barijeru koštane srži. Osim u novorođenačkoj dobi, prisutnost eritroblasta u perifernoj krvi patološki je nalaz vezan uz teške bolesti (1-4) s nepovoljnijom prognozom (1,2,5,6). Njihova je pojava vezana uz određena stanja kao što su teška akutna i kronična anemija (obično ne u aplastičnoj anemiji), srpasta anemija, osobito tijekom bolnih kriza, te u talasemiji. Druga stanja koja se vežu uz eritroblastozu su leukemija, mijeloproliferativni sindromi i karcinomatoza, i to ili zbog poremećaja arhitektonike koštane srži ili zbog ekstra-medularne hematopoeze, ili zbog oba razloga (5,7). Također, eritroblasti se javljaju kod srčanog popuštanja i opeklina (6,8).

U novijem prospektivnom kohortnom istraživanju Stachona i sur. u koja su bila uključena 383 bolesnika, po prvi se puta u bolesnika liječenih u JIL-u dnevno pratila pojava i koncentracija eritroblasta koja nije bila povezana ni s jednim osobitim uzrokom smrti. Međutim, bolesnici koji su umrli od infekcije ili sepse ipak su imali značajnije više koncentracije eritroblasta od onih koji su umrli od moždanih ili plućnih komplikacija (17,5% bolesnika bilo je pozitivno na eritroblaste, 7,8% ih je bilo pozitivno na dan prijema, dok su u prosjeku eritroblasti detektirani 3. dan boravka u JIL-u) (8).

Nepovezanost prisutnosti eritroblasta s nekim određenim uzrokom smrti pokazao je isti autor u istraživanju provedenom na 301 bolesniku te su isto tako izmjerene niže koncentracije eritroblasta u bolesnika koji su umrli od malignih tumora nego od srčanog ili višeorganskog zatajenja. U nedavno objavljenom istraživanju na 594 susljedna bolesnika liječena u JIL-u dnevnom je praćenjem prisutnost eritroblasta otkrivena u 10,4% ispitanika (12).

Kasnije je također pokazana značajna pozitivna povezanost koncentracije eritroblasta s koncentracijom eritropoetina i retikulocita (parametri hipoksije), te s koncentracijama interleukina (IL) 3 i IL-6 (parametri upale) i dobi bolesnika (13). U drugom je pak istraživanju nađena povezanost povećane

koncentracije eritroblasta s povećanom koncentracijom kreatinina i leukocita te manjom koncentracijom protrombina, dok nije nađena povezanost između koncentracije eritroblasta i retikulocita (8) osim što se eritroblasti češće detektiraju kod vrlo niskih i vrlo visokih koncentracija retikulocita (10). Mortalitet bolesnika s eritroblastima bio je 50,7%, a prediktivna vrijednost smrti je rasla s porastom njihove koncentracije. Tako je 80% bolesnika s koncentracijama eritroblasta $>200/\mu\text{L}$ umrlo, dok je mortalitet bolesnika bez eritroblasta bio 9,8% (8).

Patofiziologija pojave eritroblasta nije u potpunosti jasna. Prema većini teorija ona je posljedica stimulacije ili insuficijencije koštane srži ili oštećenja mikro-arhitekture koštane srži (5-7), većinom izazvanih hipoksičnim ili upalnim oštećenjem. Zajednička je karakteristika tih stanja da su teška i s većim rizikom mortaliteta i nepovoljnijom prognozom (1,2,5,6). Praćenje eritroblasta može pomoći u određivanju pristupa bolesniku te trenutku premjestaja iz JIL-a jer dosadašnji podaci ukazuju da takvi pacijenti zahtijevaju liječenje u JIL-u (8,12).

Koncentracija eritroblasta određuje se mikroskopski u obojenom razmazu periferne krvi ili primjenom poboljšanih automatiziranih analizatora krvi koji omogućuju njihovo otkrivanje tijekom rutinske obrade (14). Buduća, osobito prospektivna ispitivanja, trebala bi odrediti može li intenziviranje liječenja bolesnika s eritroblastima smanjiti njihov mortalitet. Postoje i preporuke za poboljšavanje ocjenske ljestvice težine bolesti intenzivnih bolesnika APACHE II uključivanjem i bodovanjem prisutnosti eritroblasta u perifernoj krvi (8,15,16).

ZAKLJUČAK

Pojava i detekcija eritroblasta u krvi bolesnika liječenih u intenzivnim jedinicama je česta pojava, a indikator je stimulacije ili insuficijencije koštane srži kao posljedica hipoksičnog i upalnog oštećenja. Njihova pojava i koncentracija su rani i neovisni pokazatelj mortaliteta te bi se njihovo redovito određivanje moglo koristiti za rano otkrivanje bolesnika s većim rizikom i mortalitetom.

L I T E R A T U R A

1. Schwartz SO, Stansbury F. Significance of nucleated red blood cells in peripheral blood; analysis of 1,496 cases. *JAMA* 1954; 154: 1339-40.
2. Mettier SR. Hematologic aspects of space consuming lesions of the bone marrow (myelophthisic anemia). *Ann Intern Med* 1940, 14: 436-48.
3. Delsol G, Guiu-Godfrin B, Guiu M, Pris J, Corberand J, Fabre J. Leukoerythroblastosis and cancer frequency, prognosis, and physiopathologic significance. *Cancer* 1979, 44: 1009-13.
4. Weick JK, Hagedorn AB, Linman JW. Leukoerythroblastosis. *Mayo Clin Proc* 1974, 49: 110-3.
5. Tavassoli M. Erythroblastemia. *West J Med* 1975, 122: 194-8.
6. Lehnhardt M, Katzy Y, Langer i sur. Prognostic significance of erythroblasts in burns. *Plast Reconstr Surg* 2005, 115: 120-7.
7. Schaefer M, Rowan R. The clinical relevance of nucleated red blood cell counts. *Sysmex J Int* 2000; 10: 59-63.
8. Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering SA, Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007; 11: R62.
9. Stachon A, Sondermann N, Imöhl M, Krieg M. Nucleated red blood cells indicate high risk for in-hospital mortality. *J Lab Clin Med* 2002, 140: 407-12.
10. Stachon A, Sondermann N, Krieg M. Incidence of nucleated red blood cells in the blood of hospitalised patients. *Infusion TherTransfus Med* 2001, 28: 263-6.
11. Stachon A, Kempf R, Holland-Letz T, Friese J, Becker A, Krieg M. Daily monitoring of nucleated red blood cells in the blood of surgical intensive care patients. *Clin Chim Acta* 2006; 366: 329-35.
12. Aung M. T, Al Nassir K, Ashraf M i sur. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: A retrospective study. Philadelphia, Pennsylvania, 139th Annual Meeting and Exposition, 2009.
13. Stachon A, Bolulu O, Holland-Letz T, Krieg M. Association between nucleated red blood cells in blood and the levels of erythropoietin, interleukin 3, interleukin 6, and interleukin 12p70. *Shock* 2005; 24: 34-9.
14. Briggs C, Harrison P, Grant D, Staves J, MacHin S. J. New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE 2100. *Clin Lab Haem* 2000; 22: 345-50.
15. Stachon A, Lehnhardt M, Katzy Y, Holland-Letz T, Steinau HU, Krieg M. Making the case for adapting the abbreviated burn severity index to include erythroblast count. *J Wound Care* 2005, 14: 97-100.
16. Stachon A, Becker A, Kempf R, Holland-Letz T, Friese J, Krieg M. Re-evaluation of established risk scores by measurement of nucleated red blood cells in blood of surgical intensive care patients. *J Trauma* 2008; 65: 666-73.

S U M M A R Y

ERYTHROBLASTS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF ADULT PATIENT AS AN ADVERSE PROGNOSTIC SIGN - A CASE REPORT

D. MOSLER¹, G. CAVRIĆ², S. NAUMOVSKI-MIHALIĆ², I. KARDUM-SKELIN^{3,6},
D. ŠUŠTERČIĆ³, B. JELIĆ-PUŠKARIĆ³, I. PRKAČIN², I. PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ², T. BRADIĆ²,
A. NAZOR⁴ and E. LAZIĆ MOSLER^{5,6}

¹*Topusko Spa Resort, Topusko*, ²*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine*,
³*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*, ⁴*Institute of Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine*, ⁵*Department of Anatomy and* ⁶*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Red blood cells (RBC) normally lose their nuclei before appearing in peripheral blood. After having undergone differentiation in bone marrow, blood cells must cross the blood-marrow barrier to enter the bloodstream. Erythroblasts, or nucleated red blood cells (NRBC), do not distort easily, so they cannot escape this barrier. Therefore, with the exception of the neonatal period, the presence of NRBCs in peripheral blood is always a pathologic finding. NRBCs may be found in the course of severe diseases and are associated with poor prognosis and higher mortality. The underlying pathophysiology of NRBCs in peripheral blood is

not fully understood. It is hypothesized that their appearance could be provoked by either increased erythropoiesis or bone marrow micro-architectural damage mostly caused by inflammation and/or decreased tissue oxygenation. In addition, it is known that the mortality is higher in NRBC-positive patients as compared with NRBC-negative patients. Hereby we present a patient admitted to the hospital with the symptoms of cardiac failure and decompensated liver cirrhosis. The patient was already known to have liver cirrhosis of ethylic etiology, cardiac decompensation caused by hypertensive heart disease with permanent atrial fibrillation, chronic obstructive pulmonary disease, diabetes mellitus type 2, and cholelithiasis. During hospital stay, the patient developed acute pancreatitis and, soon after that, a stroke with left hemiparesis followed by cardiopulmonary arrest. Then he was transferred to the intensive care unit. Despite appropriate therapy, intensive care treatment and cardiopulmonary support, the patient's general state worsened, he developed multiple organ failure and died on day 10 of intensive care unit stay. Three days earlier, NRBCs were detected in peripheral blood and their concentration increased during the next two days before death. NRBCs are known to appear 1-3 weeks before death, but their appearance does not seem to be related to one particular cause of death. Still, detection of NRBCs is an independent risk of poor outcome, where the mortality increases with the increasing NRBC concentration. Detection of NRBCs in blood is a relatively early phenomenon prior to death, so screening for NRBCs may aid in the early identification of patients at high risk, and in making duly decision for NRBC-positive patients to obtain ongoing intensive care treatment.

Key words: nucleated red blood cells, mortality, prognosis, intensive care

PRESADBA HEPATOCELULARNOG KARCINOMA UZDUŽ BIOPTIČKOG KANALA IGLE NAKON TRANSPLANTACIJE JETRE

ANNA MRZLJAK^{1,5}, IKA KARDUM-SKELIN^{2,5}, DARKO BLAŠKOVIĆ³,
DINKO ŠKEGRO¹, STIPIŠLAV JADRIJEVIĆ⁴ i VESNA ČOLIĆ-CVRLJE^{1,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, ²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku,

³Klinički zavod za dijagnostičku i intervencijsku radiologiju, ⁴Klinika za kirurgiju

i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Citološka punkcija i biopsija učinkovite su metode u dijagnostici fokalnih lezija jetre. Međutim, u slučaju neoplastičnih promjena ti zahvati mogu biti praćeni presadbom malignih stanica duž bioptičkog kanala igle. Prikazujemo slučaj potkožne presadbe hepatocelularnog karcinoma 25 mjeseci nakon transplantacije jetre u bolesnika kojemu je prije transplantacije učinjena citološka punkcija žarišne lezije u jetri. Pedesetgodišnjem bolesniku s kompenziranom cirozom jetre u podlozi kroničnog hepatitisa B dijagnosticiran je hepatocelularni karcinom širokoiglenom biopsijom, koji je kirurški odstranjen. Postoperativni tijek protekao je uredno. Deset mjeseci nakon resekcije, citološka punkcija žarišne lezije u jetri potvrdila je recidiv tumora. Bolesniku je uspješno učinjena transplantacija, te se 25 mjeseci nakon transplantacije na mjestu prethodne punkcije trbušne stijenke javlja potkožni tumor bez daljnjeg rasapa bolesti. Tumor je u potpunosti resekiran i potvrđen je hepatocelularni karcinom. U slučaju opisanog bolesnika u primarnoj je dijagnostici rađena širokoiglena biopsija, a u relapsu bolesti citološka punkcija, te ostaje otvoreno pitanje nakon čega je došlo do presadbe tumora. Tijekom 18 mjeseci praćenja nakon resekcije nije potvrđen recidiv tumora. Ciljevi ovog rada su prikazati klinički tijek i ishod presadbe hepatocelularnog karcinoma duž kanala igle nakon biopsije u transplantiranog bolesnika i raspraviti probleme i komplikacije dijagnostičke obrade i liječenja bolesnika s hepatocelularnim karcinomom.

Ključne riječi: presadba duž kanala igle, biopsija, citološka punkcija, hepatocelularni karcinom, transplantacija jetre

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Anna Mrzljak, dr. med.
Odjel gastroenterologije
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 10
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +3851 2431390
E-pošta: anna.mrzljak@gmail.com

UVOD

Transplantacija jetre (TJ) zbog hepatocelularnog karcinoma (HCC) je danas prognostički najbolji oblik liječenja, ako se radi o tumoru malih dimenzija. Rizik od recidiva tumora znatno je viši nakon kirurške resekcije, perkutanih intervencijskih tehnika te transarterijske kemoembolizacije u usporedbi s rizikom recidiva tumora nakon transplantacije jetre. Iako povišene vrijednosti alfa fetoproteina (AFP) kao i tipičan prikaz tumora slikovnim metodama [ultrazvukom (UZV), kompjuteriziranom

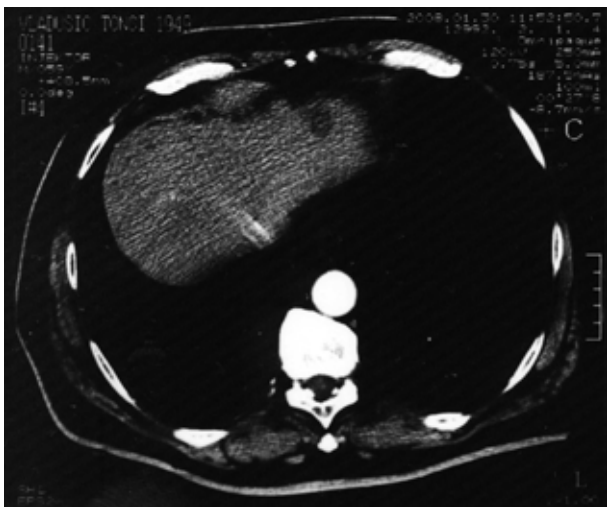
tomografijom (CT), magnetskom rezonancijom (MR)] ili angiografijom mogu biti dovoljni za postavljanje dijagnoze, u određenim slučajevima potrebna je histološka/citološka verifikacija.

Verifikacija hepatocelularnog karcinoma moguća je pomoću perkutane, transjugularne ili endoskopske citološke punkcije ili biopsije. Citološka punkcija ili širokoiglena biopsija pod kontrolom ultrazvuka smatraju se učinkovitim i relativno sigurnim metodama s učestalošću komplikacija koje se kreću od

0,05% do 0,18% (ovisno o primijenjenoj metodi), a čine ih razvitak hematoma, hemoperitoneuma, bilijarnog peritonitisa, pneumotoraksa, lokalne infekcije, anafilaktičkog šoka te smrtni ishod za koji se procjenjuje da iznosi 0,006-0,031% (1). Jedna od potencijalnih komplikacija zahvata o kojoj valja voditi računa prilikom invaznog zahvata je i presadba tumora duž kanala igle nakon biopsije/punkcije koja dovodi do razvoja neoplastičnog procesa izvan jetrene kapsule, najčešće u potkožnom tkivu, interkostalnim mišićima ili peritonejskoj šupljini (2-5).

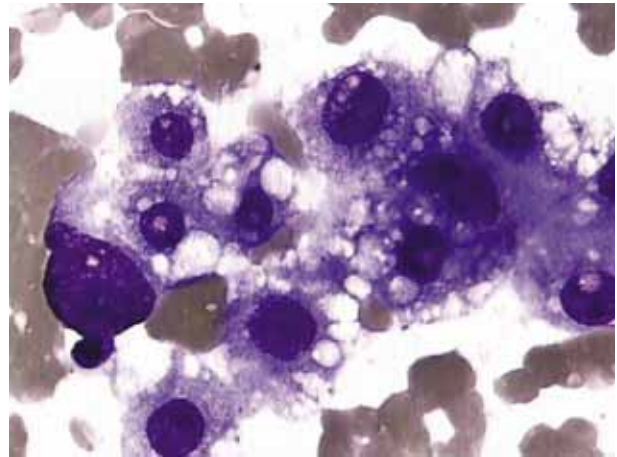
PRIKAZ BOLESNIKA

U listopadu 2007. godine 57-godišnji bolesnik upućen je na reevaluaciju zbog sumnje na recidiv hepatocelularnog karcinoma. Bolesniku je u prosincu 2006. godine histološki (nakon širokoiglene biopsije) verificiran hepatocelularni karcinom (veličine 5 cm s manjom satelitskom lezijom) na podlozi kompenzirane jetrene ciroze (Child A), te je učinjena resekcija V. i VI. jetrenog segmenta. Postoperacijski tijekom protekao je uredno. Reevaluacija CT-om abdomena s kontrastom, 10 mjeseci nakon resekcije, pokazala je u II. segmentu jetre, hipodenznu neoštro ograničenu žarišnu promjenu veličine 22 mm (sl. 1).



Sl.1. CT abdomena s kontrastom u portalno-venskoj fazi, prikazuje žarišnu promjenu u lijevom jetrenom režnju (strelica).

Pod kontrolom ultrazvuka učinjena je citološka punkcija lezije CHIBA iglom promjera 0,7 mm (22 gauge). Citološki razmazi bojani su standardnom metodom May-Grünwald-Giemsa (MGG) i imunocitokemijskim bojanjem LSAB metodom monoklonalnim antitijelima (DAKO) panelom za α -fetoprotein (+), BerEP4 (+), CD31 (-), CK8 (-), CK18 (+) i CK20 (-), potvrdili su recidiv hepatocelularnog karcinoma (sl. 2).



Sl. 2. Hepatocelularni karcinom: razmaz citološke punkcije žarišne lezije u jetri (metoda May-Grünwald Giemsa, x1000)

Serološkom i molekularnom obradom verificiran je visoko replikativan kronični hepatitis B (HBsAg, anti HBs, anti Hbc, anti HBe pozitivni; HBV DNA $3,1 \times 10^8$ IU/mL) i u terapiju je uključen lamivudin. Bolesnik je uvršten na listu za transplantaciju jetre, te je u veljači 2008. učinjena ortotopna transplantacija jetre s kadaveričnog donora. Započeta je standardna trojna imunosupresivna terapija kortikosteroidima (ukinuti 3 mjeseca nakon TJ), ciklosporinom i mikofenolat mofetilom, uz nastavak lamivudina i primjenu hepatitis B imunoglobulina (HBIG) u dozi titriranoj prema ciljnim vrijednostima titra anti-HBs (>100 IU/L). U ožujku 2010. godine, 25 mjeseci nakon TJ, bolesnik je primijetio čvorasto zadebljanje trbušne stijenke uz desni rebrani luk. Na CT-u abdomena (nativno te u arterijskoj i portalno-venskoj fazi) verificirana je desno lateralno u području trbušne stijenke između fascija abdominalnih mišića, uz VI. jetreni segment, tvorba veličine 27x16 mm koja se na postkontrastnim slojevima relativno homogeno imbibira kontrastnim sredstvom, bez znakova intraperitonealnog širenja (sl. 3).



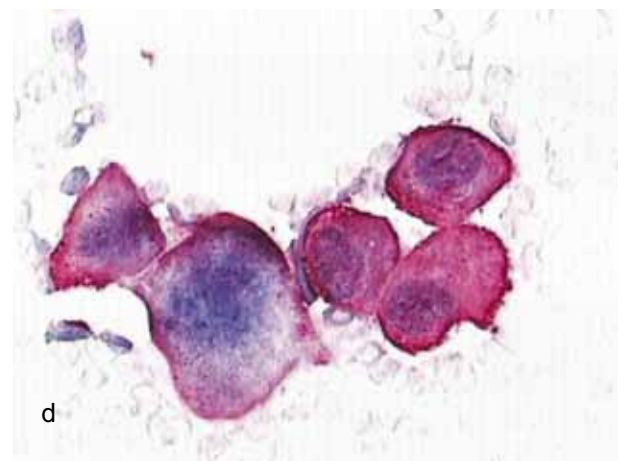
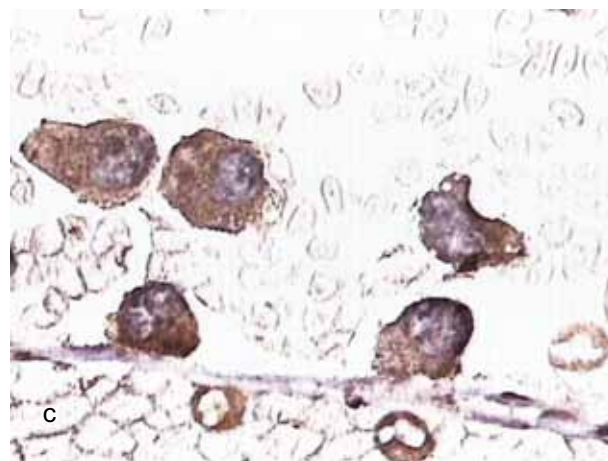
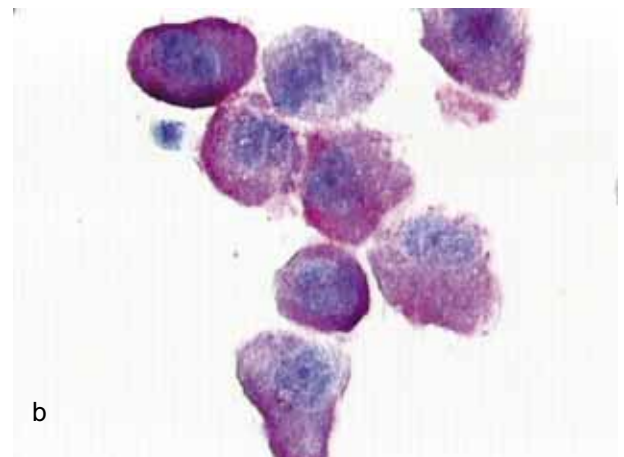
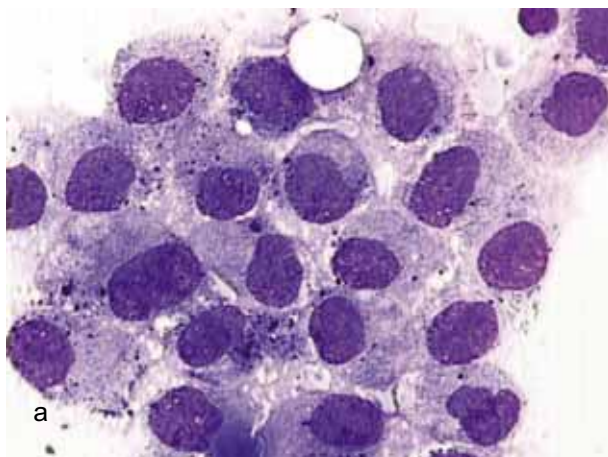
Sl. 3. Prikaz CT-om abdomena hepatocelularnog karcinoma trbušne stijenke smještenog između fascija mišića (strjelica).

Razmazi dobiveni citološkom punkcijom čvora pod kontrolom ultrazvuka, bojeni standardnim metodama te imunocitokemijski potvrdili su hepatocelularni karcinom (sl. 4).

Bolesnik je morfološki reevaluiran (UZV, PET-CT) čime nije dokazana diseminacija hepatocelularnog karcinoma, osim prisutnog čvora u trbušnoj stijenci. U ožujku 2010. godine učinjena je ekstirpacija potkožnog čvora, a 12 mjeseci kasnije bolesnik je stabilno bez znakova recidiva hepatocelularnog karcinoma uz urednu funkciju presatka.

RASPRAVA

Prema smjernicama *European Association for Study of the Liver* (EASL) (6), žarišna promjena jetre veli-



Sl. 4. Hepatocelularni karcinom trbušne stijenke prikazan a) May-Grünwald-Giemsa metodom, te imunocitokemijski antitijelima na b) alfa-fetoprotein, c) CK18 i d) CK20.

čine od 10 mm u bolesnika sa cirozom, zahtijeva redovito praćenje slikovnim metodama u kombinaciji s tumorskim biljegom, AFP. Kod promjena veličine od 10-20 mm preporuča se histološka verifikacija promjene, budući da slikovne metode nemaju dovoljnu osjetljivost u razlikovanju HCC od drugih benignih ili malignih promjena, kada su obično vrijednosti AFP normalne ili malo povišene. Za promjene veće od 20 mm dvije nezavisne slikovne tehnike (UZV, CT, MR ili angiografija) mogu s dovoljnom točnošću postaviti dijagnozu bez potrebe za daljnjom histološkom verifikacijom (7-11). Međutim, dijagnoza HCC temeljena samo na slikovnim metodama može dovesti i do lažno pozitivne dijagnoze, stoga je potrebno racionalno razmotriti dijagnostičku biopsiju imajući na umu odnos između potencijalnog rizika biopsije i rizika nepotrebne transplantacije.

Indikacije za transplantaciju jetre kod HCC-a vođene su strogim kriterijima temeljenima na veličini i broju nodula tumora (npr. Milanski kriteriji). Cilj takvih kriterija je smanjiti rizik od ranog recidiva tumora nakon transplantacije jetre. Do sada je nekoliko studija pokazalo da određeni bolesnici izvan Milanskih kriterija imaju odličan ishod nakon transplantacije. Prisutnost mikroskopske vaskularne invazije i stupanj diferenciranosti tumora značajno utječu na preživljenje bolesnika nakon resekcije ili transplantacije (12-14). Mikroskopska vaskularna invazija može se utvrditi jedino patohistološkom analizom eksplantirane jetre ili u slučaju resekcije tumora prije transplantacije, dok se stupanj diferenciranosti tumora može procijeniti biopsijom tumora prije transplantacije (15, 16). Zbog značajne povezanosti vaskularne invazije i stupnja diferenciranosti tumora, patohistološka analiza tumora u nativnoj jetri može pomoći u otkrivanju bolesnika s dobro diferenciranim tumorima, malim rizikom od vaskularne invazije i dobrom prognozom nakon transplantacije. Stoga biopsija može biti korisna za identifikaciju podobnih kandidata za transplantaciju, iako odstupaju od današnjih uobičajenih kriterija selekcije (17).

Procjenjuje se da citološka punkcija/biopsija tumora u jetri može dovesti do implantacije od 1000 do

10000 stanica duž iglenog puta (18). S obzirom na navedeno, presadba tumora duž kanala igle nakon biopsije opravdano je potencijalni rizik. Predloženo je nekoliko mehanizama koji mogu doprinijeti presadbi tumora duž kanala igle, a to su: tumorske stanice zaostale na vrhu igle prilikom izvačenja iz kanala, stanice unesene postproceduralnim krvarenjem u kanal i potisak stanica u kanal nastao iznenadnim porastom intratumorskog tlaka prilikom uboda (19).

U literaturi, incidencija rasapa nakon biopsije varira od 0,003% do 12,5%. Martinez Ramos i sur. smatraju da su komplikacije citološke punkcije jetre rijetke i sporadične u usporedbi s velikim brojem punkcija učinjenih u cijelom svijetu, te zaključuju da je rizik od presadbe izrazito nizak (20). S time se slažu i Rowe i sur. koji navode da je citološka punkcija metoda izbora u evaluaciji fokalnih lezija jetre zbog učinkovitosti, visoke sigurnosti i niskog udjela komplikacija. U nedavnoj meta analizi, Silva i sur. su pokazali na 1340 bolesnika da ukupna incidencija presadbe HCC-a duž kanala igle nakon biopsije iznosi 2,7% odnosno 0,9% godišnje (21).

Presadba tumora duž kanala igle nakon biopsije uglavnom dovodi do implantacije i rasta malignih stanica u potkožnom tkivu, interkostalnim mišićima ili peritonejskoj šupljini (2-5). Kliničari češće daju prednost citološkoj punkciji nego širokoiglenoj biopsiji, jer su igle duže, zahvat se lakše izvodi pod kontrolom slikovnih metoda i jednostavnija je za ponavljanje, vrlo često se dobiju izrazito celularni uzorci ili „mikrobiopsije“ te kombinacija citoloških razmaza i staničnih blokova rezultira visokom senzitivnošću (75-90%) i specifičnošću (100%). Oni koji zagovaraju širokoigleni biopsiju smatraju da je povećan rizik komplikacija tom metodom samo posljedica slabijeg iskustva kliničara koji izvodi biopsiju te ako se uzima više od 3 cilindra. Općenito je prihvaćeno mišljenje da je citološka dijagnoza upotunjena radiološkom slikom sigurna i vjerodostojna za potvrdu tkivne dijagnoze fokalnih lezija u jetri. Velike serije u kojima je korištena citološka punkcija, gdje je širina igle 1 mm ili manja opisuju presadbu duž punkcijskog kanala i u slučaju tumora pankreasa i bubrega. Klasična ši-

rokoiglena biopsija pretpostavlja povećani rizik od presadbe i opisan je kod tumora prostate, pluća i štitnjače. Faktori rizika za pojavu presadbe tumora nakon biopsije nisu konzistentni. Nema direktnog dokaza da širokoiglena biopsija povećava rizik od presadbe tumora, naročito na animalnim modelima, gdje je dokazano da se i citološkom punkcijom može implantirati 10^3 - 10^5 tumorskih stanica duž punkcijskog kanala. I drugi autori upozoravaju da nema direktnog dokaza povećanog rizika između presadbe tumora i širokoiglene biopsije (22).

Maturen preporuča koaksialnu širokoigleni biopsiju, budući da nije opažena presadba nakon njene upotrebe (23). Smatra se da bi jedino dobro osmišljeno, prospektivno, randomizirano i kontrolirano praćenje moglo doprinijeti boljem razumijevanju navedene problematike (21).

Zanimljiv je rad Louha i sur. koji su pokazali su da prilikom biopsije ili resekcije jetre dolazi do pojave jetrenih stanica u krvotoku bolesnika. Taj su fenomen potvrdili dokazom prolazne pojave mRNA AFP u serumu (24). Nije, međutim, jasno odgovaraju li te jetrene stanice normalnim hepatocitima ili tumorskim stanicama. Do sada nije poznato pridonosi li taj fenomen pojavi presadbe tumora nakon biopsije. U literaturi nema dokaza da su širina igle, višestruki ubodi prilikom zahvata, lokalizacija tumora u blizini jetrene kapsule, slabija diferencijacija tumora ili slabiji imunološki status bolesnika značajni faktori rizika za presadbu tumora (25).

Razdoblje između invazivnog zahvata (citološke punkcije/biopsije) i pojave tumora nastalog presadbom izrazito varira i kreće se od 3 mjeseca do 4 godine (2). Prognostički gledano, bolesnici s malim i dobro diferenciranim HCC imaju duži životni vijek, a time i veću mogućnost za otkrivanje tumora nastalog presadbom nakon biopsije u odnosu na bolesnike s većim i slabo diferenciranim HCC čiji životni vijek je kraći (4,26). U našem je slučaju u primarnoj dijagnostici rađena širokoiglena biopsija, a u relapsu bolesti citološka punkcija, te ostaje otvoreno pitanje nakon čega je došlo do presadbe tumora.

Objavljeni podaci ukazuju da lokalna presadba tumora nakon biopsije, ako je liječena resekcijom

ili lokalnom ablacijom, ne utječe na preživljenje bolesnika (2-5,18). Za sada u literaturi nema podataka o bolesnicima liječenima na taj način kojima je kasnije učinjena transplantacija jetre. Iako vrlo sporadično, opisani su slučajevi rasapa tumora u kanalu igle nakon biopsije bolesnika kojima je učinjena transplantacija (27), nedostatni su podaci o incidenciji, kliničkom tijeku, liječenju i utjecaju na preživljenje u populaciji s transplantatom.

Možemo zaključiti da je presadba tumora nakon citološke punkcije/biopsije realna opcija, ali izrazito rijetka. Profilaktička metoda kao što je ablacija punkcijskog kanala može pomoći, a ako je presadba prisutna, ekscizija je općenito dovoljna (23). Prikazani slučaj ukazuje na potencijalno povoljan prognostički ishod, ali svakako su potrebne studije s adekvatnim brojem bolesnika i dužinom praćenja kako bi se moglo procijeniti rizik u populaciji s transplantatom.

L I T E R A T U R A

1. Smith E. Complications of percutaneous abdominal fine-needle biopsy. Review. *Radiology* 1991; 178: 253-8.
2. Chang S, Kim S, Lim H, Lee W, Choi D, Lim J. Needle tract implantation after sonographically guided percutaneous biopsy of hepatocellular carcinoma: evaluation of doubling time, frequency, and features on CT. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185: 400-5.
3. Durand F, Regimbeau J, Belghiti J i sur. Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2001; 35: 254-8.
4. Kim S, Lim H, Lee W, Cho J, Jang H. Needle-tract implantation in hepatocellular carcinoma: frequency and CT findings after biopsy with a 19.5-gauge automated biopsy gun. *Abdom Imaging* 2000; 25: 246-50.
5. Kosugi C, Furuse J, Ishii H i sur. Needle tract implantation of hepatocellular carcinoma and pancreatic carcinoma after ultrasound-guided percutaneous puncture: clinical and pathologic characteristics and the treatment of needle tract implantation. *World J Surg* 2004; 28: 29-32.

6. Bruix J, Sherman M, Llovet J i sur. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-30.
7. Torzilli G, Minagawa M, Takayama T i sur. Accurate preoperative evaluation of liver mass lesions without fine-needle biopsy. *Hepatology* 1999; 30: 889-93.
8. Yu J, Kim K, Kim E, Lee J, Yoo H. Contrast enhancement of small hepatocellular carcinoma: usefulness of three successive early image acquisitions during multiphase dynamic MR imaging. *Am J Roentgenol* 1999; 173: 597-604.
9. Kim T, Murakami T, Takahashi S i sur. Optimal phases of dynamic CT for detecting hepatocellular carcinoma: evaluation of unenhanced and triple-phase images. *Abdom Imaging* 1999; 24: 473-80.
10. Lim J, Kim C, Lee W i sur. Detection of hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules in cirrhotic livers: accuracy of helical CT in transplant patients. *Am J Roentgenol* 2000; 175: 693-8.
11. Nino-Murcia M, Olcott E, Jeffrey R, Lamm R, Beaulieu C, Jain K. Focal liver lesions: pattern-based classification scheme for enhancement at arterial phase CT. *Radiology* 2000; 215: 746-51.
12. Llovet J, Brú C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-38.
13. Tsai T, Chau G, Lui W i sur. Clinical significance of microscopic tumor venous invasion in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2000; 127: 603-8.
14. Iwatsuki S, Dvorchik I, Marsh J i sur. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a proposal of a prognostic scoring system. *J Am Coll Surg* 2000; 191: 389-94.
15. Esnaola N, Lauwers G, Mirza N i sur. Predictors of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma who are candidates for orthotopic liver transplantation. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 224-32.
16. Pawlik T, Delman K, Vauthey J i sur. Tumor size predicts vascular invasion and histologic grade: Implications for selection of surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2005; 11: 1086-92.
17. Durand F, Belghiti J, Paradis V. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: role of biopsy. *Liver Transpl* 2007; 13: 17-23.
18. Ryd W, Hagmar B, Eriksson O. Local tumour cell seeding by fine-needle aspiration biopsy. A semiquantitative study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 1983; 91: 17-21.
19. Mulier S, Ni Y, Jamart J, Ruers T, Marchal G, Michel L. Local recurrence after hepatic radiofrequency coagulation: multivariate meta-analysis and review of contributing factors. *Ann Surg* 2005; 242: 158-71.
20. Martinez Ramos D VC, Rodriguez Pereira C, Escrig Sos J, Angel Yepes V, Salvador-Sanchis J. Subcutaneous seeding of hepatocellular carcinoma after fine-needle percutaneous biopsy. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 354-7.
21. Silva M, Hegab B, Hyde C, Guo B, Buckels J, Mirza D. Needle track seeding following biopsy of liver lesions in the diagnosis of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2008; 57: 1592-6.
22. John T, Garden O. Needle track seeding of primary and secondary liver carcinoma after percutaneous liver biopsy. *HPB Surgery* 1993; 6: 199-204.
23. Maturen K, Nghiem H, Marrero J i sur. Lack of tumor seeding of hepatocellular carcinoma after percutaneous biopsy using coaxial cutting needle technique. *AJR* 2006; 1184-7.
24. Louha M, Nicolet J, Zylberberg H i sur. Liver resection and needle liver biopsy cause hematogenous dissemination of liver cells. *Hepatology* 1999; 29: 879-82.
25. Rowe L, Mulvihill S, Emerson L, Gopez E. Subcutaneous tumor seeding following needle core biopsy of hepatocellular carcinoma. *Diagn Cytopathol* 2007; 35: 717-21.
26. Huang G, Sheu J, Yang P, Lee H, Wang T, Chen D. Ultrasound-guided cutting biopsy for the diagnosis of hepatocellular carcinoma - a study based on 420 patients. *J Hepatol* 1996; 25: 334-8.
27. Dumortier J, Lombard-Bohas C, Valette P i sur. Needle tract recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Gut* 2000; 47: 301.

S U M M A R Y

NEEDLE TRACT SEEDING OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA AFTER LIVER TRANSPLANTATION

A. MRZLJAK^{1,5}, I. KARDUM-SKELIN^{2,5}, D. BLAŠKOVIĆ³, D. ŠKEGRO¹,
S. JADRIJEVIĆ⁴ and V. ČOLIĆ-CVRLJE^{1,5}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine*, ²*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*, ³*Institute of Diagnostic and Interventional Radiology*, ⁴*Department of Surgery* and ⁵*University of Zagreb, Medical School, Zagreb, Croatia*

Ultrasound guided fine needle aspiration cytology (FNAC) and core needle biopsy (CNB) are effective methods for the diagnosis of focal hepatic lesions. In case of neoplastic lesions, however, this may be followed by the seeding of malignant cells along the needle tract. We report a case of subcutaneous needle tract seeding of hepatocellular carcinoma (HCC) 25 months after liver transplantation. A 57-year-old man with compensated hepatitis-B-related liver cirrhosis was diagnosed with HCC by CNB, and the lesion was resected. Ten months after the procedure, FNAC of a small hepatic lesion confirmed tumor recurrence. The patient was successfully transplanted and 25 months later, a subcutaneous tumor appeared on the abdominal wall over the previous site of puncture without further dissemination of the disease. Total resection of the lesion confirmed HCC. It remains undetermined whether the seeding appeared after FNAC or CNB. After 18-month follow-up the patient was uneventful. The objectives of this report are to present clinical aspects and outcome of HCC needle tract seeding in a transplanted patient, discussing the problems and pitfalls of diagnostic workup and management of HCC.

Key words: needle tract seeding, core biopsy, fine needle aspiration cytology, hepatocellular carcinoma, liver transplantation

DUGOGODIŠNJI INDOLENTNI TIJEK PLEOMORFNOG LIMFOMA PLAŠTENE ZONE S MULTIPLIM KROMOSOMSKIM ABNORMALNOSTIMA

MARINA PAŽUR¹, ALEN OSTOJIĆ², BILJANA JELIĆ-PUŠKARIĆ¹, IKA KARDUM-SKELIN^{1,5},
RADOVAN VRHOVAC^{2,5}, SLAVKO GAŠPAROV^{3,5}, RUŽICA LASAN TRČIĆ⁴ i BRANIMIR JAKŠIĆ^{2,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku ²Zavod za hematologiju
Klinike za unutarnje bolesti, ³Klinički zavod za patologiju i citologiju ⁴Klinički bolnički centar Zagreb
i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Limfom plaštene zone (engl. *Mantle Cell Lymphoma* - MCL) je B-stanična neoplazma agresivnog kliničkog tijeka, uz prosječno preživljenje bolesnika 3-5 godina. Prikazujemo bolesnika čija je bolest nakon početne klasične morfološke slike u svega nekoliko mjeseci prešla u agresivniju pleomorfnu formu MCL-a, ali s dugogodišnjim nepromijenjenim indolentnim kliničkim tijekom. U trenutku kada je dokazan pleomorfizam limfomskih stanica, bolest se prezentirala rekurentnom perifernom limfadenopatijom bez ektranodalne diseminacije i općih simptoma. Uz tipičnu citogenetsku translokaciju t(11;14) nađene su i brojne druge abnormalnosti. Patohistologija je potvrdila dijagnozu MCL-a, pleomorfni tip. Nakon transplantacije autolognih matičnih stanica, bolest je ostala morfološki nepromijenjena, ali je bolesnik dugo bio u dobrom općem stanju. Više od dvije godine od dijagnoze pleomorfnog MCL-a i godinu dana nakon transplantacije dolazi do znatnijeg povećanja limfnih čvorova. Naš slučaj ukazuje na izrazitu morfološku i citogenetsku varijabilnost MCL-a koja često ne korelira s kliničkim tijekom bolesti.

Ključne riječi: limfom plaštene zone, citogenetske abnormalnosti, ciklin D1, imunofenotip MCL-a

Adresa za dopisivanje: Marina Pažur, dr. med.
Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 23 08 461; faks: +385 1 24 31 393
E-pošta: marina.pazur@gmail.com

UVOD

Non-Hodgkin limfomi (engl. *non-Hodgkin lymphoma* - NHL) su heterogena skupina limfoma s različitim etiologijom, patogenezom, kliničkom, te morfološkom slikom. Dije se na B, T i NK stanične neoplazme (1). Limfom plaštene zone (engl. *Mantle Cell Lymphoma* - MCL) je B-stanična neoplazma koja čini 3-10% svih NHL-a (2-4). Javlja se u srednjoj ili starijoj životnoj dobi s neznatnom predominacijom u muškaraca. Najčešće su zahvaćeni limfni čvorovi, a ektranodalna mjesta uključuju slezenu,

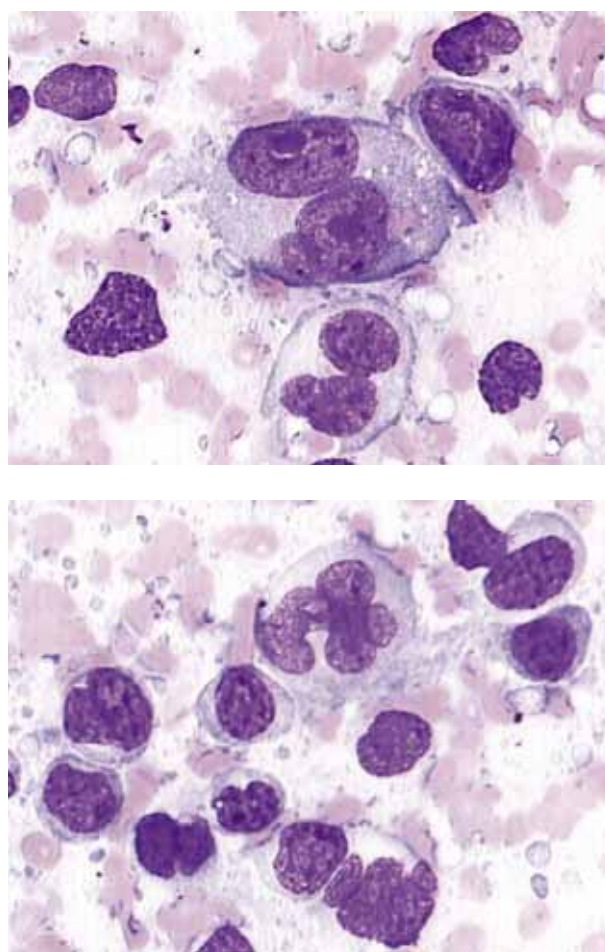
koštanu srž, perifernu krv, gastrointestinalni trakt i Waldeyerov prsten (3). Od dijagnostičke je važnosti translokacija t(11,14) koja rezultira pojačanom ekspresijom proteina ciklina D1 i poremećajem staničnog ciklusa (5-7). MCL ima agresivan klinički tijek, prosječno preživljenje bolesnika je 3-5 godina, a velik broj slučajeva nije izlječiv. Većini se pacijenata bolest dijagnosticira u trećem ili četvrtom stadiju sa zahvaćenim limfnim čvorovima i koštanom srži, te hepatosplenomegalijom. Morfološka podjela MCL-a uključuje klasični, blastoidni i pleomorfni tip, od kojih potonja dva imaju znatno lošiji ishod (2,4).

PRIKAZ BOLESNIKA

Prikazujemo slučaj 50-godišnjeg muškarca čija je bolest počela početkom 2009. godine otokom limfnog čvora u desnoj preponi bez općih simptoma, nakon čega je bezuspješno liječen antibiotskom terapijom. Citološkom punkcijom limfnog čvora u vanjskoj ustanovi postavljena je dijagnoza limfoidne neoplazme, a patohistološki nalaz je diferencijalno dijagnostički razmatrao difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL) i MCL zbog dokazanog nuklearnog pozitiviteta na ciklin D1. Zbog daljnje hematološke obrade bolesnik je upućen na našu kliniku. U međuvremenu je primijetio otok limfnih čvorova u lijevoj aksili. Njihovom punkcijom dobiven je monomorfni prikaz malih do srednje velikih limfatičnih stanica dijelom zarezanih jezgara koje su pozitivne na CD20 i BCL1, s mišljenjem da nalaz odgovara klasičnom subtipu MCL-a. Nakon 3 ciklusa imunokemoterapije CHOP-R (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon, rituksimab) postignuta je parcijalna remisija bolesti, nakon čega je bolesnik primio još 2 ciklusa terapije hyper-CVAD-R (ciklofosamid, vinkristin, doksorubicin, deksametazon, rituksimab). Nakon nekoliko mjeseci učinjen je PET-CT koji nije pokazao znakove aktivne bolesti.

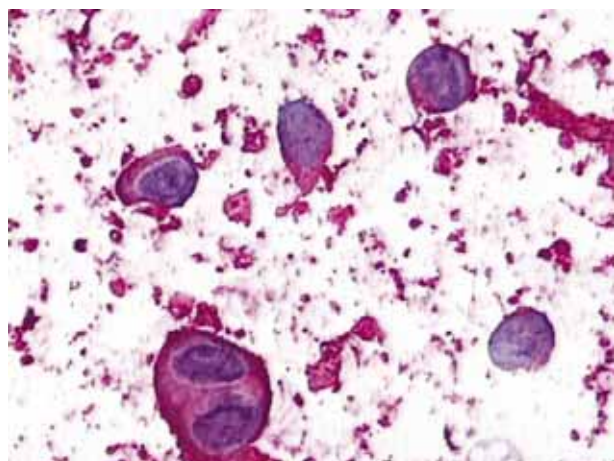
Nedugo zatim, u sklopu reevaluacije bolesti, učinjena je i punkcija koštane srži koja je pokazala normocelularan punktats s prisutnim rijetkim pojedinačnim atipičnim limfatičnim stanicama, što je ukazivalo u prilog blage infiltracije. Ultrazvučnim pregledom nađena je limfadenopatija lijevo aksilarno i desno ingvinalno. Nalaz citološke punkcije navedenih čvorova ukazao je na prisutnost krupnih atipičnih limfatičnih stanica imunocitokemijski pozitivnih na CD20, uz proliferacijski indeks Ki67 pozitivan u 47% navedenih stanica. Imunofenotipizacijom stanica iz istih čvorova nađena je dominacija B- limfocita fenotipa zrelih stanica koje su pozitivne na CD45, CD19, CD20, CD5 s klonalnim izražajem lakih lanaca kappa srednjeg do snažnog intenziteta, a negativne na CD23, te je nalaz ukazivao na MCL. Na temelju tih nalaza utvrđena je prisutnost aktivne bolesti, te je indicirana transplantacija autolognim perifernim matičnim stanicama kojoj je pacijent podvrgnut 2 mjeseca kasnije. Kontrolnim pregledom nekoliko mjeseci nakon transplantacije u pacijenta je ponovno nađe-

na limfadenopatija lijevo aksilarno. Punkcijom dobiven citološki nalaz prikazao je izuzetno krupne atipične anaplastične limfatične stanice, nepravilnih jezgara, srednje obilne bazofilne citoplazme od kojih su neke multinuklearne (sl. 1). Stanice su bile pozitivne na CD20 (sl. 2), a negativne na CD138. Predložena je radioterapija zahvaćenog čvora koju pacijent nije uspio realizirati, a učinjenom HLA tipizacijom nije nađen srodni davatelj za alogenu transplantaciju koštane srži. Prilikom ponovne hospitalizacije na našoj klinici radi odluke o nastavku liječenja, obostrano ingvinalno utvrđen je relaps bolesti, a citološka slika punktiranih čvorova opet je prikazala krupne, atipične, pleomorfne stanice, neke zarezanih ili reznjastih jezgara. Stanice su bile pozitivne na CD20, Bcl2, a manji broj (27%) je pokazao pozitivnost na CD68. Indeks Ki67 je bio nešto niži (11%).

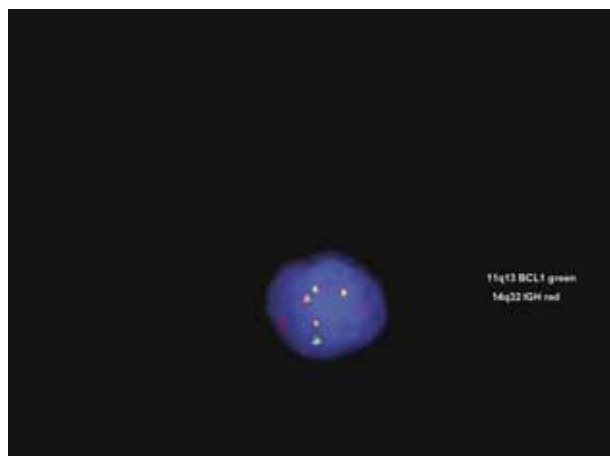


Sl. 1. Citomorfološki prikaz atipičnih limfatičnih stanica pleomorfnog limfoma plaštene zone (MGG, x1000)

Tijekom istog boravka ekstirpiran je čvor u desnoj preponi, te se u patohistološkom nalazu također opisuju velike pleomorfne stanice izraženih nukleola s brojnim mitozama. Imunohistokemijski stanice su pozitivne na CD20, CD5, Bcl1 i SOX11, a Ki67 indeks je pozitivan u 60% stanica. Metodom FISH (fluorescentna hibridizacija *in situ*) utvrđena je translokacija IGH/Bcl1 (sl. 3), a konvencionalnom citogenetskom analizom multiple kromosomske abnormalnosti 83,XXX,Y, -2, -3, add(4q), -6, -7, der(8q24)x3, t(9;16)(q13;p13)x3, t(11;14)(q13;q32)x2, -11x2, +der(14), t(11;14), add(15)(q26), -16, -17, add(19p)x2 [cp15] / 46,XY[1] (sl. 4).



Sl. 2. Imunocitokemijski prikaz pozitivnosti biljega CD20 u atipičnim limfatičnim stanicama pleomornog limfoma plaštene zone (LSAB, x1000)

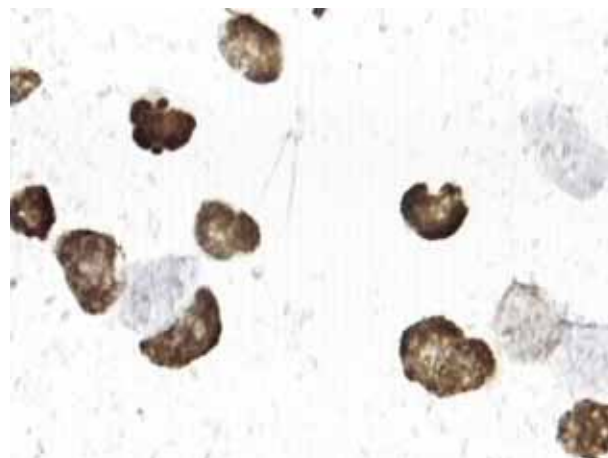


Sl. 3. FISH metodom dokazana IGH (crveno)/Bcl1 (zeleno) translokacija



Sl. 4. Multiple kromosomske abnormalnosti dokazane konvencionalnom citogenetskom metodom

U kontrolnim punkcijama uz istu morfološku sliku postotak Ki67 pozitivnih stanica rastao je do 67% (sl. 5). Uz navedenu morfološku sliku mogao se očekivati agresivan klinički tijek, no pacijent je bio u vrlo dobrom općem stanju, bez općih simptoma ili drugih kliničkih ili laboratorijskih nalaza koji bi ukazivali na agresivnu bolest. Otpušten je kući uz preporuku da u trojtednim razmacima prima klorambucil i prednizon. Primjenom ove oralne kemoterapije vrlo dobre tolerancije postigla se zadovoljavajuća kontrola bolesti, ali nakon 7 ciklusa došlo je do progresije veličine limfnih čvorova i do potrebe za primjenom intenzivnije intravenske kemoterapije ICE (ifosfamid, karboplatina, etopozid).



Sl. 5. Nuklearna pozitivnost mitotskog indeksa Ki67 u atipičnim limfatičnim stanicama pleomornog limfoma plaštene zone (APAP, x1000)

RASPRAVA

MCL spada u skupinu NHL-a B-staničnog podrijetla agresivnog kliničkog tijeka i izrazito nepovoljne prognoze. Većini pacijenata bolest se dijagnosticira u uznapređovalom kliničkom stadiju s prisutnom ekstrapodalnom diseminacijom (8). Uz iznimku transplantacije autolognih matičnih stanica, dosadašnji terapijski pristupi nisu se pokazali uspješnim u izlječenju bolesti. Ipak, oko 15% bolesnika prezentira se indolentnim kliničkim tijekom i dužim preživljenjem (7). Morfološki, MCL u većini slučajeva karakterizira monomorfna slika malih do srednje velikih limfocita oskudne citoplazme s nepravilnom nuklearnom granicom i diskretnim nukleolima koji sličje centroцитima. Osim ovog, klasičnog oblika bolesti, razlikujemo i blastoidnu varijantu gdje stanice posjeduju jezgre raspršenog kromatina (sličje blastima) s prisustvom većeg broja mitoz. Treći tip je pleomorfni, s velikim raznolikim stanicama svijetle citoplazme čije jezgre imaju nepravilne konture i izražene nukleole (2). Od prognostičke je važnosti broj mitoz i proliferacijski indeks Ki67 čija pozitivnost u većem broju stanica ukazuje na lošiji ishod (2,4). Pacijent kojeg prikazujemo zanimljiv je, jer se u njega bolest citološki prvo prezentirala klasičnom slikom MCL-a u zahvaćenim čvorovima bez diseminacije u trenutku dijagnoze. Stanice su bile pozitivne na CD20, što je potvrdilo B-stanično podrijetlo. Međutim, prilikom svakog sljedećeg relapsa bolesti punkcija je pokazala agresivniju morfološku varijantu bolesti, s krupnim atipičnim stanicama istaknutih nukleola i pozitivnošću Ki67 indeksa u 47% stanica. Patološki nalaz ukazao je da se radi o pleomorfnoj varijanti limfoma. Unatoč tome, pacijent je bio dobrog općeg stanja, indolentnog tijeka bolesti s relapsima samo u ingvinalnim i aksilarnim limfnim čvorovima bez ekstrapodalne diseminacije.

Zbog različitosti morfologije MCL-a, nužno je odrediti imunofenotip i citogenetiku stanica. One su tipično pozitivne na CD5, CD19, CD20 i CD22, a negativne na CD10 i CD23 (2,8,9). Diferencijalno dijagnostički morfološki u obzir dolaze SLL (engl. *Small Lymphocytic Lymphoma*) i FL (engl. *Follicular Lymphoma*) koji su znatno povoljnije prognoze, zbog čega je značenje imunofenotipizacije još i veće (10,11). Citogenetski je za dijagnozu najvažnija translokacija t(11,14) koja rezultira pojačanom

ekspresijom ciklina D1, ali je dokazano da uz nju mogu postojati multiple kromosomske abnormalnosti koje uključuju lokus 8q24, translokacije t(8,14), (2,8) i brojne druge (2,12). One su češće u agresivnijim varijantama bolesti. Međutim, opisani su i slučajevi negativni na ciklin D1, s ekspresijom ciklina D2 i D3 koji su obično povezani s translokacijom t(2,12) (2). U ovog je pacijenta potvrđena translokacija t(11,14), te pojačana ekspresija ciklina D1 kao i abnormalnosti lokusa 8q24 i 14q32 u rearanžmanu s nepoznatim partnerom.

ZAKLJUČAK

Naš slučaj naglašava morfološku i citogenetsku heterogenost MCL-a koja zahtijeva široku dijagnostičku obradu i ističe sve veću važnost molekularne dijagnostike u citologiji. Također ukazuje na to da citološka dijagnoza ne mora uvijek korelirati s kliničkim tijekom bolesti, koji u ovom slučaju nije bio sasvim tipičan za MCL.

LITERATURA

1. Nagel-Esposito AD, Kawasaki B, Jew R, Fujimoto L. Mantle cell lymphoma of the maxillary sinus invading the orbit. *Optometry* 2011; 82: 22-31.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL i sur. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
3. Yoo SB, Kim YA, Jeon YK, Kim CW. CD5-undetected by immunohistochemistry, t(11;14)(q13;q32)-positive conjunctival mantle cell lymphoma. *Pathol Res Pract* 2008; 204: 779-83.
4. Gao J, Peterson LA, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2009;132: 699-706.
5. Zapata M, Budnick SD, Bordoni R, Li S. An uncommon case of de novo CD10+ CD5- mantle cell lymphoma mimics follicle center B cell lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3: 430-6.
6. Metcalf RA, Zhao S, Anderson MW i sur. Characterization of D-cyclin proteins in hematolymphoid neoplasms: lack of specificity of cyclins D2 and D3 expression in lymphoma subtypes. *Mod Pathol* 2010; 23: 420-33.

7. Dreyling M, Hiddemann W; European MCL Network. Current treatment standards and emerging strategies in mantle cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 542-51.
8. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K i sur. Significance of cyclin D1 over expression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* 2000; 95: 2253-61.
9. Morice WG, Hodnefield JM, Kurtin PJ, Hanson CA. An unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with blastoid component showing loss of CD5 and aberrant expression of CD10. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 122-7.
10. Sriganeshan V, Blom TR, Weissmann DJ. A unique case of mantle cell lymphoma with an aberrant CD5-/CD10+ immunophenotype and typical morphology. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 1346-9.
11. Ives Aguilera NS, Bijwaard KE, Duncan B i sur. Differential expression of cyclin D1 in mantle cell lymphoma and other non-hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* 1998; 153: 1969-76.
12. Hao S, Sanger W, Onciu M, Lai R, Schlette EJ, Medeiros LJ. Mantle cell lymphoma with 8q24 chromosomal abnormalities: a report of 5 cases with blastoid features. *Mod Pathol* 2002; 15: 1266-72.

S U M M A R Y

LONGTERM INDOLENT COURSE OF PLEOMORPHIC MANTLE CELL LYMPHOMA WITH MULTIPLE CHROMOSOMAL ABNORMALITIES

M. PAŽUR¹, A. OSTOJIĆ², B. JELIĆ-PUŠKARIĆ¹, I. KARDUM-SKELIN^{1,5}, R. VRHOVAC^{2,5}, S. GAŠPAROV^{3,5}, R. LASAN TRČIĆ⁴ and B. JAKŠIĆ^{2,5}

¹*Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*, ²*Department of Internal Medicine, Division of Hematology*, ³*Department of Pathology and Cytology*, ⁴*Zagreb University Hospital Center*, ⁵*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Mantle cell lymphoma (MCL) is a B-cell neoplasm characterized by aggressive clinical course with an average 3- to 5-year patient survival. We present a patient whose illness turned from initial classical morphological variant to a more aggressive pleomorphic form of MCL in only a few months, but with unchanged long-term indolent clinical course. At the time when lymphoid cell pleomorphism was proven, the disease presented itself through recurrent peripheral lymphadenopathy without extranodal involvement or general symptoms. Other numerous abnormalities were found next to typical cytogenetic translocation t(11,14). Histopathology confirmed the diagnosis of MCL, pleomorphic type. After autologous stem cell transplantation, the disease remained morphologically the same, but the patient was in a good general condition for a long period of time. More than two years after the pleomorphic MCL had been diagnosed and one year after the transplantation, major lymphadenopathy occurred. Our case report points to a large spectrum of morphological and cytogenetic variability of MCL, which often does not correlate with the clinical course of the disease.

Key words: mantle cell lymphoma, cytogenetic abnormalities, cyclin D1, mantle cell lymphoma immunophenotype

DISEMINIRANA ASPERGILOZA U BOLESNICE S TRANSPLANTIRANIM BUBREGOM I GUŠTERAČOM

ANTE PILJAC¹, DUNJA FIALA², INGRID PRKAČIN^{1,4}, DINKO ŠKEGRO¹,
IVANA KOVAČEVIĆ VOJTUŠEK¹, SONJA GRACIN¹, IKA KARDUM-SKELIN^{3,4},
DUNJA ŠUŠTERČIĆ³, MIRJANA SABLJAR-MATOVINOVIĆ^{1,4} i MLADEN KNOTEK^{1,4}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zagreb, ²Opća bolnica Zadar,
Odjel za transfuzijsku medicinu, Zadar, ³Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku
i ⁴Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Žena u dobi od 31 godine, oboljela od šećerne bolesti tip 1 i terminalne bubrežne bolesti, kojoj su simultano transplantirani bubreg i gušterača, razvila je epizodu akutnog odbacivanja posredovanog protutijelima. Liječenje odbacivanja kompliciralo se citomegaloviremijom s posljedičnom leukopenijom i neutropenijom. Bolesnica je potom razvila invazivnu aspergilozu pluća, koja progredira, a kasnije i hematogeno diseminira u štitnjaču i kožu. Zbog rezistencije na klasične antimikotike liječena je kombinacijom kaspofungina i vorikonazola. Učinak kombinirane terapije u početku liječenja izostaje zbog snažne imunosupresije posredovane antitimocitnim imunoglobulinom koji je bolesnica primala u prethodnom boravku zbog akutnog odbacivanja bubrežnog presatka posredovanog protutijelima, te redovite imunosupresije takrolimusom, mikofenolat mofetilom i prednizonom. Kombiniranim djelovanjem antimikotskih lijekova uz suportivnu terapiju bolesnica je uspješno izliječena.

Ključne riječi: simultana transplantacija bubrega i gušterače, aspergiloza, imunosupresija

Adresa za dopisivanje: Piljac Ante, dr. med.
Klinička bolnica Merkur,
Klinika za unutarnje bolesti
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Telefon: 01 2431 390
E-pošta: apiljac@gmail.com

UVOD

Razvojem transplantacijske medicine u Hrvatskoj povećava se broj bolesnika s transplantatima. Usavršavanje kirurških tehnika kao i razvoj imunosupresije tijekom posljednjih desetljeća omogućili su duže preživljenje bolesnika i presatka te doveli do porasta broja kroničnih komplikacija nakon transplantacije. Oportunističke infekcije su veliki izazov u liječenju bolesnika s transplantatom, dok samog bolesnika životno ugrožavaju. Rod *Aspergillus* se ne ubraja u primarno patogene gljive za čovjeka, već u oportunističke mikoze koje uzrokuju infek-

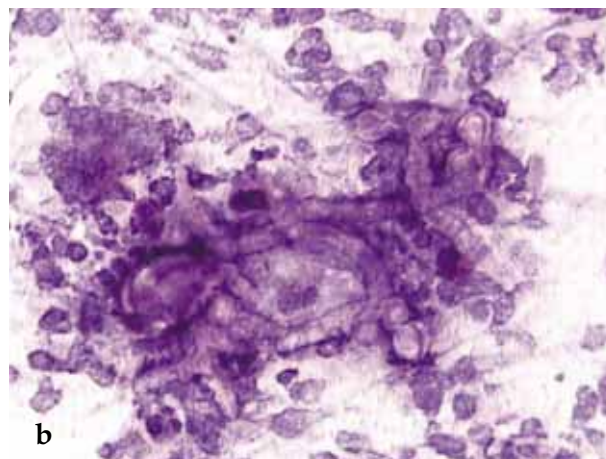
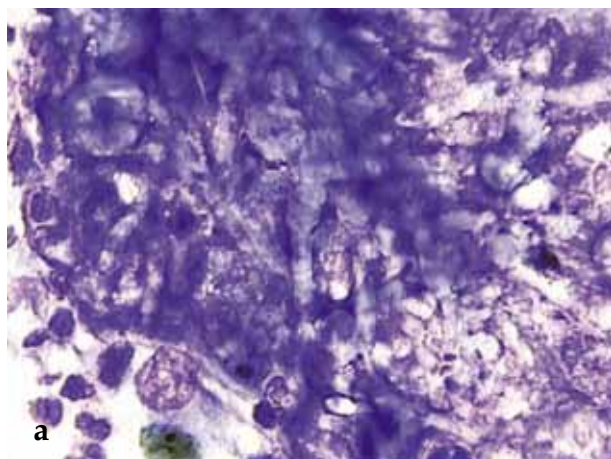
cije u imunokompromitiranih bolesnika. Ubraja se u saprofite, živi u okolini na raspadnutoj tvari. Gotovo sve medicinski značajne gljive razmnožavaju se nesporno stvarajući konidije, odnosno u slučaju aspergilusa fjalokonidije. Nastankom konidija *Aspergillus* započinje i svoj infektivni ciklus laganim aerosolnim sporama koje su u velikom broju rasprostranjene u prašini, a inhalacijom se depoziraju u bronhiole i alveolarne prostore. Najčešće sijelo aspergiloze stoga su paranazalni sinusi i pluća. Aspergiloza može biti invazivna, kronična, saprofitna ili alergijska, dok invazivna može hematogeno diseminirati u ostale organe i tkiva.

PRIKAZ BOLESNICE

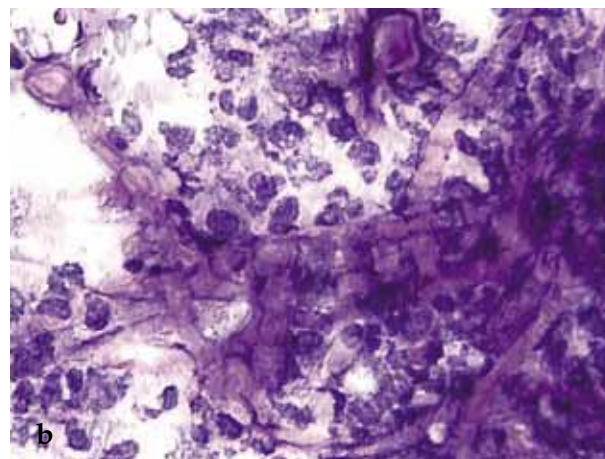
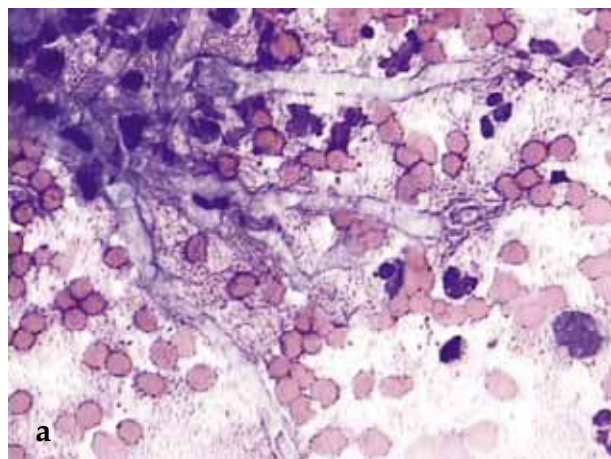
Bolesnici u dobi od 31 godine simultano su presađeni bubreg i gušterača zbog terminalne bolesti bubrega i šećerne bolesti tip 1. Prema ranije poznatoj medicinskoj dokumentaciji bolesnica je sa 21 godinom života razvila sekundarnu amenoreju, dok joj je 8 godina kasnije dijagnosticirana hipotireoza, a iste godine zbog traume desnog oka učinjena enukleacija. Postoperativno je započeta imunosupresija takrolimusom, mikofenolat mofetilom i prednisonom. Zbog usporene funkcije bubrežnog presatka pristupilo se biopsiji bubrega kojom se dokazalo akutno odbacivanje posredovano protutijelima, te je bolesnica liječena antitimocitnim imunoglobulinom i plazmaferezom. Od tada je na intermitentnoj hemodijalizi zbog odgođene funkcije transplantiranog bubrega. Mjesec dana nakon transplantacije bolesnica je kratko hospitalizirana zbog hemoragijskog cistitisa. Četrnaest dana nakon otpusta bolesnica je ponovno hospitalizirana zbog gastrointestinalnih smetnji. Pri prijmu $L\ 5,20 \times 10^9/L$, neutrofilni granulociti $4,30 \times 10^9/L$, hemoglobin $76\ g/L$, trombociti $122 \times 10^9/L$.

Sustavnom obradom kod bolesnice se dokazuje citomegaloviremija i *Enterobacter spp* izoliran u urinu, dok se u laboratorijskim pretragama tijekom 5 dana prati postepeni pad vrijednosti leukocita i neutrofilnih granulocita. Bolesnica je liječena ganciklovirovom i ciprofloksacinom. Petoga dana postaje

febrilna pri vrijednostima ($L\ 0,92 \times 10^9/L$). U terapiju se uvodi filgrastim, izostavlja se ciprofloksacin i uvodi ceftriakson, na što bolesnica postaje afebrilna. Na rentgenogramu srca i pluća opaža se smanjena transparentnost plućnog parenhima koja odgovara infiltrativnim promjenama, dok je kontrolni rentgenogram za 5 dana bez promjene. Dvanaestog dana terapije ceftriaksonom bolesnica postaje subfebrilna te se učini CT toraksa na kojem se u anteriornom segmentu gornjeg plućnog režnja prikaže infiltrat, a u srednjem medijastinumu ispred bifurkacije traheje uvećani limfni čvorovi. Učini se bronhoskopija te se iz bronhoalveolarnog lavata mikrobiološki i citološki izolira *Aspergillus spp*. Testom osjetljivosti u bolesnice se prikazuje rezistencija na amfotericin, itrakonazol, flukonazol, ketokonazol i flucitozin, te je se liječi kombiniranom antimikotskom terapijom kaspofunginom i vorikonazolom, dok se imunosupresivna terapija značajno reducira (izostanak mofilmikofenolata, redukcija doze prednisona i takrolimusa). Nakon 20 dana terapije kontrolnim CT-om se prikaže progresija plućnog infiltrata, a bolesnica razvija kliničke manifestacije tireoiditisa uz pojavu supkutanog infiltrata na medijalnoj strani lijevog koljena i desne klavikularne regije. Citološkom i mikrobiološkom obradom punktata štitnjače i kožne lezije s unutarne strane lijevog koljena izolira se *Aspergillus species*. (sl. 1 i 2). Antimikotskim liječenjem kaspofunginom tijekom 27 dana i vorikonazolom tijekom 21 dana bilježi se regresija plućnog infiltrata, te se bolesnica nakon 57 dana hospitalizacije otpušta kući.



Sl. 1. Degenerativno promijenjene hife *Aspergillus spp.* u nekrotičnom uzorku punktata kožne promjene s unutarne strane lijevog koljena: a) May-Grünwald Giemsa $\times 1000$, b) PAS, $\times 1000$.



Sl. 2. Degenerativno promijenjene hife *Aspergillus* spp. u nekrotičnom uzorku punktata štitnjače : a) May-Grünwald Giemsa, x1000, b) PAS, x1000.

RASPRAVA

Liječenje diseminirane aspergiloze u imunokompromitiranih bolesnika značajan je problem u transplantacijskoj medicini. Raspon incidencije aspergiloze u bolesnika s transplantiranim solidnim organom iznosi 1-8% za jetru, 3-14% za pluća, 15% za srce, 0-4% za bubreg, 1,1-2,9% za gušteraču i 0-10% za tanko crijevo (1). Najčešći lokaliteti zahvaćeni aspergilusom su pluća, sinusi i mozak (2). Bolesnica je razvila aspergilozu pluća, koja je u početku progredirala, da bi potom diseminirala u štitnjaču i kožu, što prema prije navedenom nije klasično sijelo bolesti. Unatoč mogućnosti ranog dijagnosticiranja, mortalitet kod diseminirane aspergiloze je i dalje vrlo visok, te u bolesnika s transplantiranom koštanoj srži iznosi 86,7% (3), dok se u bolesnika s transplantiranim bubregom kreće u rasponu od 75% do 80% (4). Imunosupresija, visoke doze kortikosteroida i gubitak funkcije bubrežnog presatka predstavljaju povećani rizik za invazivnu aspergilozu (5). Pojava mikoza rezistentnih na klasične antimikotike dodatno otežava liječenje. U ovom slučaju bolesnica je liječena kaspofunginom i vorikonazolom, kombinacijom lijekova koja se pokazala uspješnom u studijama *in vitro* sinergističkim djelovanjem na stanični zid i staničnu membranu aspergilusa (6). Objavljenim prikazima slučajeva kombinirana terapija kaspofunginom i vorikonazolom prikazala se uspješnom i u drugim kliničkim slučajevima diseminirane aspergiloze (7), dok su se u ostalim studijama kaspofungin i vorikonazol pokazali učinkovitijima od ostalih anti-

mikotskih lijekova (8,9). Za uspješan ishod liječenja bolesnice neophodan je bio oporavak imunološkog sustava, koji je u bolesnice bio kompromitiran zbog ranijeg potentnog liječenja odbacivanja bubrežnog presatka antitimocitnim imunoglobulinom. Time se objašnjava progresija aspergiloze i diseminacija na početku kombinirane antimikotske terapije.

LITERATURA

1. Singh N, Paterson DL. *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 2005;18: 44-69.
2. Dennir DW, Marinus A, Cohen J i sur. An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. *J Infect* 1998; 37: 173-80.
3. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. *Aspergillus* case fatality rate: systematic review of literature. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 358-66.
4. Paterson DL, Singh N. Invasive aspergillosis in transplant recipients. *Medicine* 1999; 78: 123-38.
5. Panackal AA, Dahlman A, Keil KT i sur. Outbreak of invasive aspergillosis among renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 15: 1050-3.
6. Perea S, Gonzalez G, Fothergill AW i sur. *In vitro* interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3039-41.
7. Damaj G, Ivanov V, Le Brigand D i sur. Rapid improvement of disseminated aspergillosis with caspofungin/voriconazole combination in adult leukemic patient. *Ann Hematol* 2003; 83: 390-3.

8. Herbrecht R, Denning DN, Patterson TF i sur. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Eng J Med* 2004; 347: 408-15.

9. Martens J, Egerer G, Shin W i sur. Caspofungin use in daily clinical practice for treatment of invasive aspergillosis: results of a prospective observational study. *BMC Infectious Diseases* 2010; 10: 18.

S U M M A R Y

DISSEMINATED ASPERGILLOSIS IN A PATIENT WITH SIMULTANEOUS PANCREAS AND KIDNEY TRANSPLANT

A. PILJAC¹, D. FIALA², I. PRKACIN^{1,4}, D. SKEGRO¹, I. KOVACEVIC VOJTUSEK¹, S. GRACIN¹, I. KARDUM-SKELIN^{3,4}, D. SUSTERCIC³, M. SABLJAR-MATOVINOVIC^{1,4} and M. KNOTEK^{1,4}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Zagreb*, ²*General Hospital Zadar, Division of Transfusion Medicine, Zadar*, ³*University Hospital Merkur, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics* and ⁴*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

A 31-year-old woman suffering from diabetes type 1 and terminal kidney disease, with simultaneously transplanted kidney and pancreas, developed an episode of acute organ rejection caused by antibodies. The management of organ rejection was complicated by cytomegalovirus viremia, with accompanying leukopenia and neutropenia. The patient also developed invasive aspergillosis of the lungs, which progressed and disseminated hematogenously to the thyroid gland and the skin. Due to resistance to classical antimycotic therapy, the patient was treated with a combination of caspofungin and voriconazole. In the beginning of treatment, the effects of this combined therapy were not evident due to strong immunosuppression caused by antimycotic immunoglobulin, which the patient had been administered on her previous hospital stay to treat acute kidney transplant rejection caused by antibodies, as well as due to immunosuppression caused by tacrolimus, mycophenolate mofetil and prednisone. On combined therapy with antimycotic drugs and supportive therapy, the patient was completely cured.

Key words: simultaneous kidney and pancreas transplantation, aspergillosis, immunosuppression

BILATERALNI PLEURALNI IZLJEV KAO PRVA MANIFESTACIJA MULTIPLOG MIJELOMA

DELFA RADIĆ-KRIŠTO¹, SLOBODANKA OSTOJIĆ KOLONIĆ^{1,3}, IKA KARDUM-SKELIN^{2,3},
INGA MANDAC ROGULJ¹, RADOVAN VRHOVAC^{1,3} i ANA PLANINC-PERAICA^{1,3}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za hematologiju,

²Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku i ³Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Multipli mijelom je klonalna novotvorina plazma stanica lokalizirana u koštanoj srži. Plazma stanice multiplog mijeloma karakteriziraju dva obilježja: prekomjerna produkcija monoklonalnih protutijela i razaranje koštanog sustava. Vrlo se često u bolesnika javljaju hiperkalcemija, anemija te kronično oštećenje bubrega. Multipli mijelom s obostranim pleuralnim izljevom rijetka je prezentacija bolesti i udružena je s lošom prognozom. Javlja se u manje od 1% bolesnika s multiplim mijelomom. Prepoznavanje plazma stanica u pleuralnom izljevu izuzetno je važno zbog daljnjeg dijagnostičkog postupka i terapijskog pristupa. U našoj je Klinici hospitalizirana 59-godišnja bolesnica zbog dugotrajnog kašlja, otežanog disanja te bolovima u lijevoj strani prsišta. Fizičkim pregledom i rentgenskom slikom pluća utvrdi se obostrani pleuralni izljev. Citološkom punkcijom izljeva opisuju se pokoja plazma stanica. Citološkom punkcijom koštane srži uz biopsiju kosti te rtg pretragama skeleta potvrdi se dijagnoza multiplog mijeloma. Imunoelektroforezom seruma i urina dokaže se Bence-Jonesova proteinurija tipa lakog lanca lambda. Elektroforeza bjelančevina izljeva zbog neadekvatnosti materijala nije rađena. Obostrani mijelomski pleuralni izljev kao prezentacija multiplog mijeloma vrlo je rijedak, stoga u bolesnika s pleuralnim izljevom treba razmišljati i o ovakvim neuobičajenim manifestacijama bolesti.

Ključne riječi: pleuralni izljev, multipli mijelom, citologija, plazma stanice

Adresa za dopisivanje: Mr. sc. Delfa Radic-Krišto, dr. med.
Zavod za hematologiju
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: delfa.radic.kristo@zg.t-com.hr

UVOD

Multipli mijelom (MM) je neoplastična bolest nastala klonalnom proliferacijom plazma stanica u koštanoj srži. Plazma stanice MM-a karakteriziraju prekomjerna produkcija monoklonalnih protutijela odnosno lakih lanaca u serumu i/ili urinu, razaranje koštanog sustava, često oštećenje funkcije, a u nekim slučajevima i zatajenje bubrega (1,2). Obolijevaju osobe starije životne dobi, podjednako oba spola (2). U približno u 6% bolesnika s MM tijekom liječenja pojavi se i pleuralni izljev. Obično

je benignog tijeka, najčešće je povezan s kroničnim popuštanjem srca, kroničnom bolešću bubrega, hipoalbuminemijom, plućnim infekcijama ili plućnom embolijom (3-7). Maligni pleuralni izljev u bolesnika s MM je vrlo rijetka prezentacija bolesti. Vidi se u oko 1% bolesnika i ukazuje na izuzetno lošu prognozu (8,9). Češće se javlja s IgA izotipom MM-a i delecijom kromosoma 13. Preživljenje je bolesnika kratko i iznosi oko 4 mjeseca (10). Do sada je objavljeno samo nekoliko radova (5-10), koji opisuju bilateralni pleuralni izljev kao prvu manifestaciju bolesti.

Prikazujemo dijagnostički postupak, liječenje i klinički tijek u bolesnice srednje životne dobi s bilateralnim pleuralnim izljevom kao prvom manifestacijom multiplog mijeloma.

PRIKAZ BOLESNICE

U prosincu 2008. godine na Odjel hematologije zaprimljena je preko hitne službe 59-godišnja bolesnica zbog dugotrajnog kašlja, otežanog disanja i ubrzanog rada srca. Fizikalnim pregledom te rentgenogramom srca i pluća potvrdilo se obostrani pleuralni izljev. U hematološkim nalazima uočavamo normocitnu anemiju teškog stupnja (Hb 62 g/L), u biokemijskim nalazima povećanu koncentraciju CRP-a (10 mg/L) beta-2-mikroglobulina (3,2 mg/L), te hipoproteinemiju (ukupne bjelančevine 52 g/L). U elektroforezi serumskih bjelančevina nađena je hipoalbuminemija (34,8 g/L). Ostali biokemijski nalazi bili su u granicama referentnih vrijednosti. Učinjena je citološka punkcija pleuralnog izljeva nakon čega je izljev obrađivan biokemijski, (LDH, GUK), bez značajnih referentnih odstupanja. Elektroforeza bjelančevina izljeva nije učinjena zbog nedovoljno materijala. Citološkom analizom sedimenta pleuralnog izljeva nađen je mali broj plazma stanica (6%), a imunocitokemijski su bili pozitivni na CD138. U citološkom razmazu stanica koštane srži nađena je normocelularna koštana srž s potisnutom eritropoezom, granulopoezom i trombopoezom, s umnoženim plazma stanicama i proplazmacitima (68%), a u partiklima i znatno više (98%). U bioptatu koštane srži populaciju stanica čine uglavnom plazma stanice prvog i drugog stupnja diferencijacije (gradus I i II). Metodom fluorescentne hibridizacije *in situ* (FISH) nisu nađene translokacije gena teškog lanca imunoglobulina IGH/BCL1, IGH/MAF, IGH/FGFR3 i IGH/C-MYC, ali je otkrivena delecija kromosoma 13. Učinjenom rentgenskom pretragom nađene su brojne osteolitičke promjene skeleta. Imunoelektroforezom seruma i urina dokazana je prisutnost lambda lakih lanaca.

Učinjenom obradom dijagnosticiran je MM, kliničkog stadija bolesti IIIA prema klasifikaciji Duriea i Salmona (11), a stadij bolesti II prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti (ISS) (12). Bolest se oči-

tovala agresivnom kliničkom slikom zbog čega je odmah započeto liječenje kortikosteroidima. Nakon kliničkog poboljšanja nastavljeno je liječenje polikemoterapijom po shemi VMCP (vinkristin, melfalan, ciklofosamid i prednison) tijekom pet dana. Nakon tri ciklusa terapije došlo je do resorpcije pleuralnog izljeva uz i dalje gotovo potpuno infiltriranu koštanu srž. Stoga je uvedena nova antimijelomska terapija inhibitorima proteosomalnih enzima, bortezomib. No, unatoč tome, nakon jednog ciklusa terapije bortezomibom bolest je progredirala. Deset mjeseci od početka liječenja bolesnica je umrla.

RASPRAVA

Rijetko se dijagnosticira mijelomski pleuralni izljev u bolesnika s multiplim mijelomom. Radi ciljanog liječenja važno je dijagnosticirati uzrok pleuralnog izljeva. U naše bolesnice rezultati kliničke obrade pokazali su da se radi o multiplom mijelomu s obostranim mijelomskim pleuralnim izljevom. Multipli mijelom je klonalna proliferacija plazma stanica koja čini 10% svih hematoloških neoplastičkih bolesti. Najčešće manifestacije bolesti su slabost, bolovi u kostima i patološke frakture (1). Bolest vrlo rijetko zahvaća urogenitalni, gastrointestinalni, kardiorespiratorni i neurološki sustav (2). Tijekom bolesti pleuralni izljev se javlja u oko 6% bolesnika s multiplim mijelomom. Multipli mijelom s pleuralnim izljevom kao prvom manifestacijom bolesti javlja se vrlo rijetko. U literaturi se navodi u oko 0,8% do 1% bolesnika (1-8).

Uzroci pojave pleuralnog izljeva u bolesnika s MM su multifaktorski. Najčešći uzroci su virusne i bakterijske infekcije pluća, hipoalbuminemija, zatajenje srca kao posljedica sekundarne amiloidoze, kroničnog zatajenja bubrega, plućne embolije, bolesti vezivnog tkiva ili neke druge maligne bolesti (3-8).

Jedan od prvih radova koji opisuje pleuralni izljev kao prvu manifestaciju multiplog mijeloma objavio je Shoenfeld sa suradnicima 1978. godine (9). U dostupnoj literaturi nađeno je samo nekoliko pojedinačnih prikaza slučajeva bolesnika s pleuralnim izljevom kao prvom manifestacijom bolesti. Bolesnici su imali loše prognostičke pokazatelje (veće

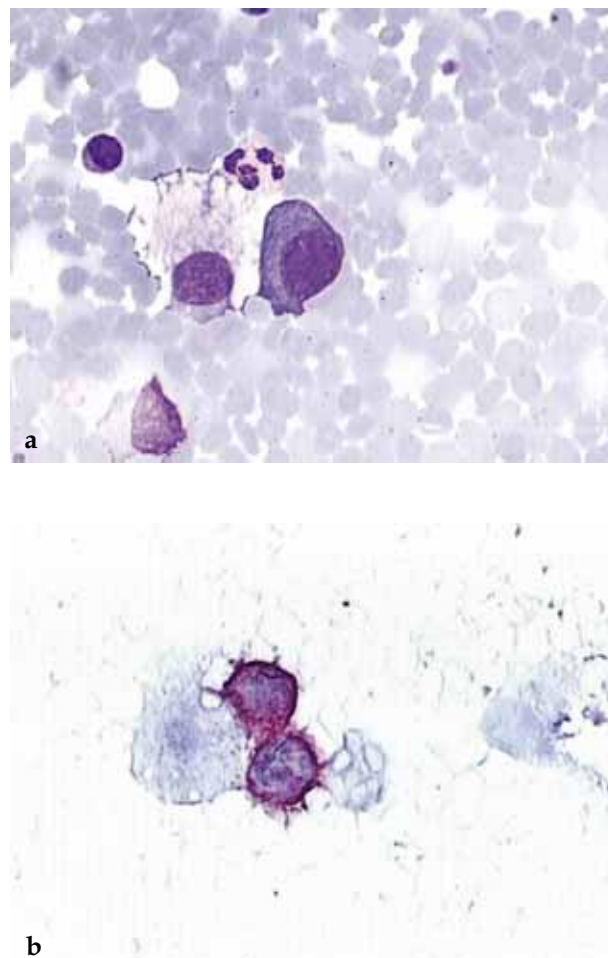
koncentracije beta-2-mikroglobulina, CRP-a i povišenu aktivnost LDH), a u kariotipu deleciju kromosoma 13, te IgA isotip MM-a. Taj tip MM ima veću sklonost širenju ekstraosealnim strukturama što je također loš prognostički čimbenik (10).

Kambele i sur. analizirali su prognostičke čimbenike, tijek bolesti, liječenje i ishod 11 bolesnika s multiplim mijelomom i malignim pleuralnim izljevom. Medijan nastanka pleuralnog izljeva iznosio je 12 mjeseci od trenutka kada je dijagnosticiran multipli mijelom. Svi bolesnici su imali multipli mijelom s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima (povišena koncentracija beta-2-mikroglobulina, CRP-a, povišena aktivnost LDH i kariotip sa delecijom kromosoma 13). Mijelomski pleuralni izljev dijagnosticiran je citomorfološkom i citogenetskom analizom stanica u pleuralnom izljevu. Sedam bolesnika liječeno je polikemoterapijom primijenjenom sistemski (deksametazon, ciklofosfamid, etopozid i cisplatina), a u nekih bolesnika učinjena je i pleurodeza. Primijenjena je terapija bila učinkovita, izljev se resorbirao, iako je preživljenje bolesnika bilo kratko. Liječenje mijelomablativnom terapijom s transplantacijom autoloških perifernih matičnih stanica provedeno je u 6 bolesnika. Niti ovaj pristup liječenju nije pokazao prednost pred drugim oblicima liječenja. Naime, unatoč transplantaciji perifernih matičnih stanica i u tih je bolesnika preživljenje bilo kratko i iznosilo je samo četiri mjeseca. Preživljenje bolesnika s poremećajima u kariogramu bilo je lošije nego u onih bolesnika koji su imali uredan nalaz kariograma. (10).

U literaturnim podacima 80% bolesnika s mijelomatoznim pleuralnim izljevom javlja se u bolesnika s IgA tipom MM-a. Taj tip MM ima veću sklonost širenju ekstraosealnim strukturama i veću incidenciju delecije kromosoma 13, što je ujedno i lošiji prognostički pokazatelj (10).

Dijagnostički kriteriji za potvrdu mijelomskog pleuralnog izljeva su dokaz monoklonskog proteina u pleuralnom izljevu, elektroforeza proteina iz izljeva (kojim se dokazuje identičan tip proteina kao i u serumu), citomorfološki i imunocitokemijski dokaz tipičnih malignih plazma stanica, protočna citometrija stanica pleuralnog izljeva te, ako je to moguće učiniti, biopsiju pleure. U našem je slučaju

dijagnoza mijelomskog izljeva dokazana citološkim nalazom plazma stanica u izljevu (sl. 1a) te imunocitokemijskom analizom (CD138 pozitivne plazma stanice) (sl. 1b). Za protočnu citometriju nije se dobilo dovoljno materijala, a iz tehničkih razloga pleuralna punkcija se nije mogla ponoviti.



Sl. 1. Hemoragični pleuralni izljev s pojedinačnim plazma stanicama: a) May-Grünwald Giemsa, x1000; b) imunocitokemijski CD138 pozitivne plazma stanice (LSAB, x1000)

Bolesnika s mijelomskim pleuralnim izljevom valja liječiti sistemskom terapijom. Ponekad je u slučajevima opsežnog i/ili bilateralnog izljeva, zbog ugroženosti bolesnika, potrebna drenaža izljeva. Nažalost, bolest ima progredijentan tijek tako da je preživljenje kratko unatoč vrsti primijenjene standardne terapije. Takvi bolesnici su kandidati za nove lijekove (10). U naše je bolesnice na terapiju

kortikosteroidima došlo do kliničkog poboljšanja, pleuralni izljev se resorbirao, ali i uz dalje aktivnu bolest s umnoženim plazma stanicama u koštanoj srži. Liječenje inhibitorima proteosomalnih enzima nije dovelo do poboljšanja.

ZAKLJUČAK

Iako je u bolesnika s multiplim mijelomom velika vjerojatnost da je pleuralni izljev uzrokovan infektivnim uzročnikom ili da je nastao zbog zatajenja drugih organskih sustava (bubrezi, srce) valja misliti i na ovaj rijedak uzrok njegovog nastanka, mijelomomski izljev. Citološka analiza stanica pleuralnog izljeva od presudne je važnosti za postavljanje dijagnoze mijelomskog izljeva. Mijelomski pleuralni izljev je loš prognostički čimbenik bez obzira je li prisutan kod dijagnoze ili je nastao kasnije. Stoga su ti bolesnici kandidati za uključivanje u kliničke studije lijekova nove generacije.

LITERATURA

1. Grogan TM, Camp BV, Kyle RA, Muller-Hermelink HK, Harris NL. Plasma cell neoplasms. U: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, ur. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and genetic of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
2. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 1997; 336: 1657-64.
3. Kim Y.J, Kim S.J, Kim H.Y, Lee Y.K, Zang D.Y. Multiple myeloma with myelomatous pleural effusion: A case report and review of the literature. *Acta Haematol* 2008; 120: 108-11.
4. Andre M, Ponsonaille J, Komony JL, Filaire M, Travado P, Aumaitro O. Pleural and pericardial effusion as a first sign of multiple myeloma. *Ann Med Interne (Paris)* 1999; 150: 443-5.
5. Deshpande A, Munshi MM. Pleural effusion as an initial manifestation of multiple myeloma. *Acta Cytol* 2000; 44: 103-4.
6. Andre M, Ponsonaille J, Komony JL, Filaire M, Travado P, Aumaitro O. Pleural and pericardial effusion as a first sign of multiple myeloma. *Ann Med Interne (Paris)* 1999; 150: 443-5.
7. Elloumi M, Frikha M, Masmoudi H i sur. Plasma-cytic pleural effusion disclosing multiple myeloma. *Rev Mal Respir* 2000; 17: 495-7.
8. Palmer HE, Wilson CS, Bardales RH. Cytology and flow cytometry of malignant effusions of multiple myeloma. *Diagn Cytopathol* 2001; 22: 147-51.
9. Shoenfeld Y, Pick AI, Weinberger A, Ben-Bassat M, Pinkhas J. Pleural effusion-presenting sign in multiple myeloma. *Respiration* 1978; 36: 160-4.
10. Kambele R, Wilson CS, Fassas A i sur. Malignant pleural effusion of multiple myeloma. Prognostic factors and outcome. *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 1137-42.
11. Durie BGM, Salomon SE. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer* 1975; 36: 842-54.
12. Greipp PR, SanMiguel J, Durie BG i sur. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 20: 412-20.

S U M M A R Y

BILLATERAL PLEURAL EFFUSION AS FIRST MANIFESTATION OF MULTIPLE MYELOMA

D. RADIĆ-KRIŠTO¹, S. OSTOJIC KOLONIĆ^{1,3}, I. KARDUM-SKELIN^{2,3}, I. MANDAC ROGULJ¹, R. VRHOVAC^{1,3} and A. PLANINC-PERAICA^{1,3}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine, Division of Hematology,*

²*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics and* ³*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Multiple myeloma is clonal malignancy of plasma cells with overproduction of monoclonal antibodies and destruction of bones. Hypercalcemia, anemia and renal disfunction are common manifestations of the disease. Billateral pleural effusion is rare multiple myeloma presentation with unfavorable prognosis so it is important to recognize it for better diagnostic and therapy approach. 59-year old woman was admitted to Hematology Department with history of severe cough, dyspnea and left chest pain. Physical examination and chest X-ray showed billateral pleural effusion while cytologic examination of pleural aspirate found plasma cells. Bone marrow examination and skeleton X-ray confirmed diagnosis of multiple myeloma. Serum and urine immunoelectrophoresis detected lambda Bence Jones protein. This case is rare manifestation of multiple myeloma.

Key words: multiple myeloma, pleural effusion, cytology, plasma cell

MEZOTELIOM PLEURE - PRIKAZ BOLESNIKA

IVICA PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ¹, MARO DRAGIČEVIĆ¹, DOMAGOJ MOSLER²,
TOMISLAV MEŠTROVIĆ³, ELVIRA LAZIĆ MOSLER^{4,5}, DAMIR KOZMAR¹, STJEPAN KRANJČEVIĆ¹,
DARKO POČANIĆ¹, GORDANA CAVRIĆ¹, KRISTINA NARANČIĆ SKORIĆ¹, TOMISLAV LETILOVIĆ^{1,5},
HELENA JERKIĆ¹, HRVOJKA ZELJKO¹ i IKA KARDUM-SKELIN^{1,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Zagreb, ²Lječilište Topusko, Topusko, ³Klinički bolnički centar Zagreb,

⁴Zavod za anatomiju i ⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Mezoteliom pleure je rijetka neoplazma s incidencijom obolijevanja 1-2 slučaja na milijun ljudi. Bolest se javlja češće u muškaraca (10-30 na milijun) nego u žena (2 na milijun), s predominacijom obolijevanja u starijoj životnoj dobi (65 godina i više). Najčešće se klinički manifestira pleuralnim izljevom i dispnejom što predstavlja značajan diferencijalno dijagnostički problem u odnosu na bolesti srca. Prikazan je slučaj bolesnice u osmom desetljeću života s dispnejom i desnostranim pleuralnim izljevom koji su prije svega, uz postojeći kardiološki komorbiditet, shvaćeni kao dio slike lijevostranog srčanog popuštanja. Međutim, s obzirom na pridružene metaboličke poremećaje i duboku vensku trombozu, karakteristične za mezoteliom, unatoč negativnoj epidemiološkoj anamnezi, dijagnostički postupci su zbog pobuđene sumnje na tumorsku bolest bili usmjereni utvrđivanju etiologije pleuralnog izljeva. Citološki i potom patohistološki utvrđen je mezoteliom pleure. Pleuralni izljevi koji perzistiraju te čiji stupanj ne odgovara statusu srca, a posebice ako su popraćeni metaboličkim poremećajima ili paraneoplastičnim sindromom, zahtijevaju dodatnu dijagnostiku u cilju otkrivanja etiologije izljeva.

Ključne riječi: mezoteliom pleure, citološka analiza, paraneoplastični sindrom

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Ivica Premužić Meštrović, dr. med.
Klinika za unutarnje bolesti
Klinička bolnica Merkur
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 22 53 205
E-mail: premuzici@yahoo.com

UVOD

Mezoteliom pleure je rijetka neoplazma s incidencijom 1-2 slučaja na milijun ljudi. Bolest se javlja češće u muškaraca (10-30 na milijun) nego u žena (2 na milijun), s predominacijom obolijevanja u starijoj životnoj dobi (65 godina i više) (1-3). U 95% oboljelih dovodi do nastajanja pleuralnog izljeva i dispneje, ali može dovesti i do razvoja čitavog niza metaboličkih poremećaja i paraneoplastičnih sindroma (4-6).

Prikazujemo slučaj bolesnice s rentgenološki potvrđenim desnostranim pleuralnim izljevom izazvanim mezoteliomom pleure koji je diferencijalno-dijagnostički prvobitno razmatran u sklopu srčanog popuštanja.

PRIKAZ BOLESNIKA

85-godišnja žena javila se u hitnu službu Klinike za interne bolesti u studenome 2008. g. zbog progresivne dispneje i edema nogu. Bolesnica nije imala osobitosti u epidemiološkoj anamnezi, a 35 godina je liječena zbog povišenog krvnog tlaka, bez drugih kroničnih bolesti.

Obradom bolesnice u hitnoj službi utvrđeni su znaci globalnog srčanog popuštanja, uz oslabljen šum disanja nad desnim plućnim krilom te asimetrični edemi nogu uz prisutnu tahiaritmiju te tahidispneju. Elektrokardiografski je potvrđena fibrilacija atrijska s tahiaritmijom ventrikla, a radiološki nehomogeno zasjenjenje desnog donjeg i dijela srednjeg plućnog polja alveolarnog uzorka uz naznačenu

reakciju pleure te početni intersticijski zastoje. U laboratorijskim nalazima nađeni su povišeni upalni parametri i D-dimeri, blaga hipokalcemija i blaga hipoglikemija, u sedimentu urina leukociturija, eritrociturija i dosta bakterija, a u acidobaznom statusu parcijalna dekompenzirana respiratorna insuficijencija.

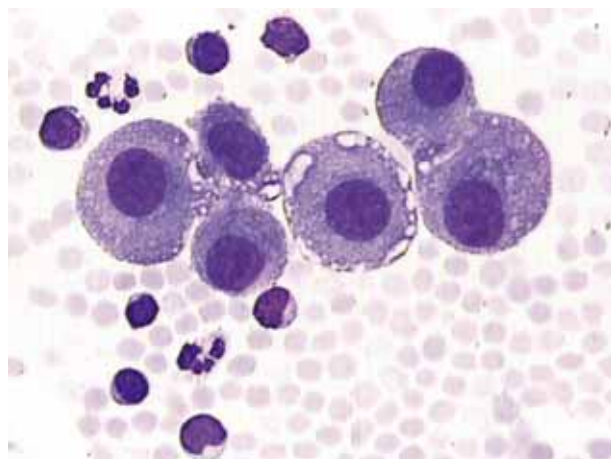
Bolesnica je hospitalizirana u Jedinici intenzivne skrbi pod radnom dijagnozom fibrilacije atrija s tahiaritmijom ventrikla i srčanim popuštanjem, desnostranom bronhopneumonijom i uroinfekcijom te sumnjom na duboku vensku trombozu lijeve noge. Neposredno nakon prijma započeta je terapija niskomolekularnim heparinom, antibioticima i antiaritmicima, uz intenzivnu primjenu diuretika. Na primijenjenu terapiju došlo je do konverzije u sinusni ritam uz uspostavu zadovoljavajuće diureze, a u laboratorijskom nalazima praćen je postupni pad upalnih parametara. Drugi dan poslije prijma učinjena je pretraga vena nogu obojenim doplerom kojom su otkrivene trombotske mase u dubokim venama lijeve noge sve do prijelaza u lijevu ilijakalnu venu. Ultrazvuk abdomena pokazao je zastojne promjene jetre, bez druge patologije abdominalnih organa te obostrani pleuralni izljev.

Tjedan dana nakon prijma, na kontrolnom rentgenogramu srca i pluća, utvrđena je potpuna regresija zastojnih promjena, uz perzistiranje nehomogenog zasjenjenja desno bazalno te razvoj desnostranog pleuralnog izljeva. U laboratorijskim nalazima i dalje se pratilo blagu hipokalcemiju uz pogoršanje acidobaznog statusa. Kako je bolesnica i dalje bila dispnoična, učinjena je punkcija desnostranog pleuralnog izljeva u dva navrata u razmaku od pet dana, s evakuacijom po svega 40 mL žućkaste tekućine. Biokemijskom analizom utvrđen je pleuralni izljev s karakteristikama eksudata (prvi punkt: hemoragičan izgled, ukupni proteini 23,8 g/L, LDH 594 U/L, glukoza 5,8 mmol/L), a citološkom analizom u sedimentu nađene su mezotelne stanice s izraženim polimorfizmom (sl. 1), mnogo eritrocita i limfocita, osrednje granulocita. Imunocitokemijskom obradom utvrđene su atipične mezotelne stanice negativne na epitelni biljeg (BerEP4) (sl. 2), a pozitivne na kalretinin (sl. 3) i trombomodulin (sl. 4) što je uz morfološki izgled stanica odgovaralo mezoteliomu. Dodatno je učinjen CT prsnoga koša kojim je utvrđen opsežan izljev desno od baze do

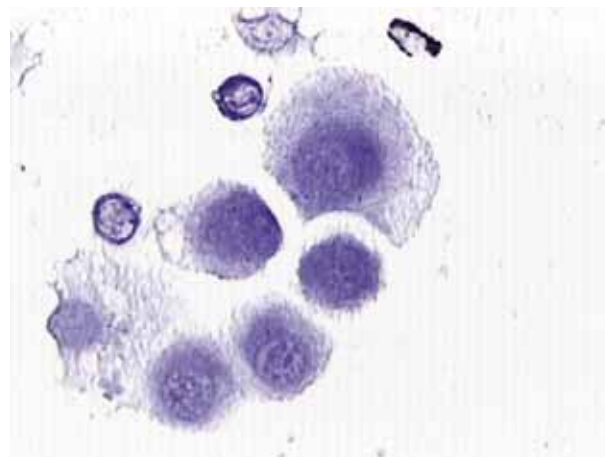
plućnog vrška s vidljivom mjestimičnom kondenzacijom i distelektazom parenhima. S obzirom na takav nalaz postavljen je terapijski pleuralni dren uz postizanje regresije pleuralnog izljeva te je bolesnica premještena u specijalnu bolnicu za plućne bolesti gdje je biopsijom pleure potvrđena dijagnoza mezotelioma pleure. U drugom dijelu boravka na Klinici u bolesnice dolazi do značajnog pogoršanja hipoglikemije (GUK 1,4 mmol/L) zbog čega je bila potrebna kontinuirana parenteralna primjena otopine glukoze. Osim toga, došlo je i do progresije duboke venske tromboze.

RASPRAVA

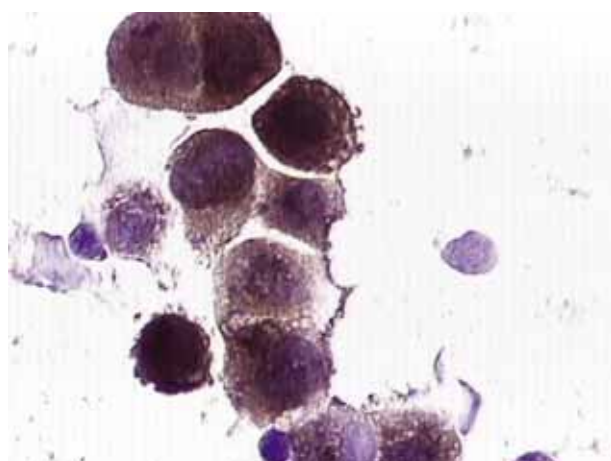
Mezoteliom je rijedak tumor koji nastaje iz mezotelnih stanica seroznih membrana te se u gotovo 80% slučajeva javlja u pleuri (1). Dugi niz godina je smatrano da je izloženost azbestu, s latencijom od 20 do 50 godina, jedini rizični čimbenik za razvoj mezotelioma (1). Međutim, danas literaturni podaci upućuju na porast oboljelih unutar skupine bolesnika s limfomom medijastinuma liječenih radioterapijom (8). Kao mogući rizični čimbenik u etiološki nerazriješenim slučajevima spominju se i virusi (9,10). Mezoteliom pleure u pravilu se javlja 5-15 puta češće u muškaraca nego u žena, što se povezuje s njihovom profesionalnom izloženosti azbestu (1-3). Medijan obolijevanja oba spola je u šestom desetljeću. Najčešći simptom bolesti je dispneja, a najčešći klinički znak pleuralni izljev što predstavlja diferencijalno dijagnostički problem osobito u odnosu na bolesti srca, jer se obje bolesti javljaju najučestalije u starijoj životnoj dobi. Međutim, druge, iako znatno rjeđe kliničke manifestacije mezotelioma, mogu pomoći u usmjeravanju dijagnostičkih postupaka. Od šezdesetih godina prošlog stoljeća mezoteliom pleure povezuje se s čitavim nizom metaboličkih i paraneoplastičnih sindroma. Najdulje se spominju epizode hipoglikemije izazvane tumorskim stvaranjem čimbenika rasta sličnog inzulinu-II (IGF-II, prema engl. *Insulin-Like Growth Factor-II*) te trombocitoza s povećanom sklonosti zgrušavanju, dok su nedavna istraživanja utvrdila sekreciju peptida sličnih paratireoidnom hormonu s do sada opisanom samo hiperkalcemijom ali ne i hipokalcemijom (4-6).



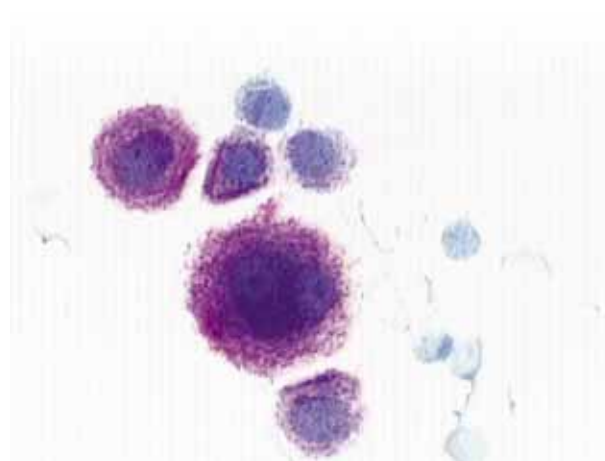
Sl. 1. Stanice mezotelioma u pleuralnom izljevu, May-Grünwald Giemsa, x1000.



Sl. 2. Stanice mezotelioma u pleuralnom izljevu, negativna reakcija na epitelni biljeg (BerEP4), LSAB, x1000



Sl. 3. Stanice mezotelioma u pleuralnom izljevu, kalretinin pozitivne stanice, APAP, x1000



Sl. 4. Stanice mezotelioma u pleuralnom izljevu, trombomodulin pozitivne stanice, LSAB, x1000

Na mezoteliom pleure može pobuditi sumnju čitav niz dijagnostičkih pretraga, međutim, definitivna se dijagnoza postavlja histološkom analizom uzetog uzorka tkiva. Citološkom analizom uzorka pleure uspijeva se postaviti dijagnoza u svega oko 23% oboljelih (7).

Prikazan je slučaj bolesnice u osmom desetljeću života s dispnejom i desnostranim pleuralnim izljevom koji su prije svega, uz postojeće kardiološke komorbiditete, shvaćeni kao dio slike lijevostranog srčanog popuštanja. Međutim, s obzirom na pridružene metaboličke poremećaje i duboku vensku trombozu, unatoč negativnoj epidemiološkoj anamnezi, dijagnostički postupci bili su usmjereni utvrđivanju etiologije pleuralnog izljeva. Citološki i potom patohistološki utvrđen je mezoteliom pleure.

LITERATURA

1. Decković-Vukres V, Corić T, Tomić B, Incidence and prevalence of asbestos-related diseases in Croatia. Arh Hig Rada Toksikol 2009; 60 Suppl: 23-30.
2. Price B, Ware A. Time trend of mesothelioma incidence in the United States and projection of future cases: an update based on SEER data for 1973 through 2005. Crit Rev Toxicol 2009; 39: 576-88.
3. Pannelli F, Montanaro F, Pascucci C, Mirabelli D, Gennaro V. Mesothelioma incidence and time trend in the worlds. Med Lav 2006; 97: 682-93.
4. Lee JM, Pou K. Vitamin D-mediated hypercalcemia and Cushing syndrome as manifestations of malignant pleural mesothelioma. Sadow PM Endocr Pract 2008; 14: 1011-6.

5. Venzano C, Di Marco E, Garbero M, Forno P, Marchese A, Borghesi R. Nephrotic syndrome associated with pleural mesothelioma. An unusual paraneoplastic event. *Recenti Prog Med* 1990; 81: 325-6.

6. Losada López I, Nicolau Ramis JA, Gómez Gómez LA, Rodríguez Rodríguez I, Masmiquel Comas L. Glucagon perfusion in paraneoplastic hypoglycemia. *Endocrinol Nutr* 2009; 56: 143-6. Epub 2009 May 18.

7. Falletti J, Giordano M, Cozzolino I, Vetrani A, De Renzo A, Zeppa P. Cutaneous needle track seeding of

mesothelioma diagnosed by fine needle aspiration cytology: a case report. *Acta Cytol* 2010; 54(5 Suppl): 811-4.

8. Attanoos RL, Gibbs AR. Pathology of malignant mesothelioma. *Histopathology* 1997; 30: 493-418.

9. Baranova n, Carbone M. Simian virus 40 and mesothelioma. U: Khalili K. *Viral Oncology: Basic Science and Clinical Applications*. New York: John Wiley and Sons.Inc,2010, 191-211.

10. Carbon M, Bedrossian CWM. The pathogenesis of mesothelioma. *Sem Diagnost Pathol* 2006; 23: 56-60.

S U M M A R Y

PLEURAL MESOTHELIOMA - CASE REPORT

I. PREMUŽIĆ MEŠTROVIĆ¹, M. DRAGIČEVIĆ¹, D. MOSLER², T. MEŠTROVIĆ³,
E. LAZIĆ MOSLER^{4,5}, D. KOZMAR¹, S. KRANJČEVIĆ¹, D. POČANIĆ¹, G. CAVRIĆ¹,
K. NARANČIĆ SKORIĆ¹, T. LETILOVIĆ^{1,5}, H. JERKIĆ¹, H. ZELJKO¹ and I. KARDUM-SKELIN^{1,5}.

¹*Merkur University Hospital, Zagreb*, ²*Topusko Spa Resort, Topusko*, ³*Zagreb University Hospital Center*, ⁴*Department of Anatomy and* ⁵*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Pleural mesothelioma is a rare neoplasm with the incidence of 1-2 *per* million people. The incidence is higher in male population (10-30/million), whereas the incidence in female population is 2 *per* million. It occurs predominantly at older age (65+ years). The most common clinical manifestation of pleural mesothelioma is pleural effusion with dyspnea, which makes it a diagnostic problem since many cardiac diseases can have the same presentation. We report a case of pleural mesothelioma in an 80-year-old woman that presented with dyspnea and pleural effusion, which was at first considered as a sign of heart failure. Clinical presentation also included metabolic disorders and deep vein thrombosis, and the patient's epidemiologic history was negative, so diagnostic procedures including pleurocentesis were directed towards detection of the possible malignant disease. Cytologic analysis followed by biopsy pointed to the diagnosis of pleural mesothelioma. Persistent pleural effusions that do not coincide with cardiac disease, especially if accompanied by metabolic disorders and paraneoplastic syndromes, require additional diagnostic workup to identify the etiology of pleural effusion.

Key words: pleural, mesothelioma, effusion, cytology, paraneoplastic syndrome

SEKUNDARNA AMILOIDOZA (AA) BUBREGA I KOŠTANE SRŽI U BOLESNICE S REUMATOIDNIM ARTRITISOM

INGRID PRKAČIN^{1,4}, BRUNO ŠKURLA¹, DARKO POČANIĆ¹, TOMISLAV BULUM¹,
STELA BULIMBAŠIĆ^{2,4} i IKA KARDUM-SKELIN^{3,4}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, ²Klinička bolnica Dubrava, Zavod za patologiju,

³Klinička bolnica Merkur, Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku i ⁴Sveučilište u Zagrebu,
Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Amiloidoza označava skupinu bolesti, nasljednih ili stečenih, kojima je zajedničko obilježje izvanstanično nakupljanje amiloida u brojnim tkivima i organima. Sekundarna (AA) amiloidoza je rijetka, ali ozbiljna komplikacija koja nastaje u bolesnika s kroničnim upalnim procesom, malignomima i kroničnim upalnim bolestima. Pedesetivogodišnja bolesnica, kojoj je prije 25 godina postavljena dijagnoza reumatoidnog artritisa, hospitalizirana je 2004. god. zbog pogoršanja kliničkog stanja s izrazitom anemijom. U kliničkom statusu uočavali su se tjestasti edemi potkoljenica. U laboratorijskim nalazima bilježio se porast upalnih reaktanata, normocitna anemija, elektrolitski disbalans, hipoalbuminemija te hipoproteinemija. Bubrežna funkcija procijenjena klirensom kreatinina iznosila je 78 mL/min, a proteinurija 15,4 g/24h. Učinjena je biopsija bubrega i citološka punkcija koštane srži te je verificirana sekundarna amiloidoza. Prognoza bolesnika sa sekundarnom amiloidozom u korelaciji je prije svega sa stupnjem zahvaćenosti bubrega a, ako se ne liječi, 50% bolesnika umire unutar 5 godina od postavljanja dijagnoze. Do sada ne postoji uspješno specifično liječenje sekundarne amiloidoze, već je terapijski pristup usmjeren prije svega na liječenje primarne bolesti.

Ključne riječi: amiloidoza bubrega i koštane srži, reumatoidni artritis

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Ingrid Prkačin, prim. dr. med.
Klinička bolnica Merkur
Klinika za unutarnje bolesti
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: ingrid.prkacin@gmail.com

UVOD

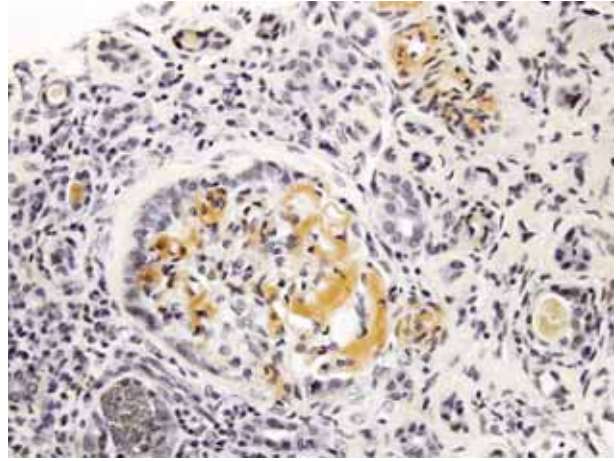
Amiloidoza označava skupinu bolesti, kojima je zajedničko obilježje izvanstanično nakupljanje amiloida u brojnim tkivima i organima. Odlaganje amorfnog vlaknastog proteina amiloida uzrokuje narušavanje normalne građe i funkcije organa i tkiva (1). Te se bolesti dijele u nasljedne ili stečene. Temeljem biokemijske prirode proteina koji čine strukturu vlakana amiloida razlikujemo primarnu (AL) i sekundarnu (AA) amiloidozu. Sekundarna (AA) amiloidoza je rijetka, ali ozbiljna komplikacija koja nastaje u bolesnika s kroničnim upalnim procesom, malignomima i kroničnim upalnim bolestima, kao što je reumatoidni artritis (2,3). Prevalencija sekundarne amiloidoze u bolesnika s reumatoidnim artritisom iznosi 20-30% (4,5). Sekundarna amilo-

idoza najčešće se klinički prezentira oštećenjem bubrežne funkcije koje se očituje poremećajima od nefrotskog sindroma i smanjenja bubrežne funkcije do zatajenja bubrežne funkcije s visokom smrtnošću, rjeđe zahvaćanjem koštane srži (6). Prisustvo amiloida u tkivima utvrđuje se Kongo bojanjem te naknadno imunohistokemijskim metodama kojima se identificiraju glavne proteinske komponente vlakana amiloida, što olakšava dijagnozu bolesti koja je uzrokovala amiloidozu (7). Prognoza bolesnika sa sekundarnom amiloidozom u korelaciji je prije svega sa stupnjem zahvaćenosti bubrega a, ako se ne liječi, 50% bolesnika umire unutar 5 godina od postavljanja dijagnoze (1). Do sada ne postoji uspješno specifično liječenje sekundarne amiloidoze, već je terapijski pristup usmjeren prije svega na liječenje primarne bolesti (8,9).

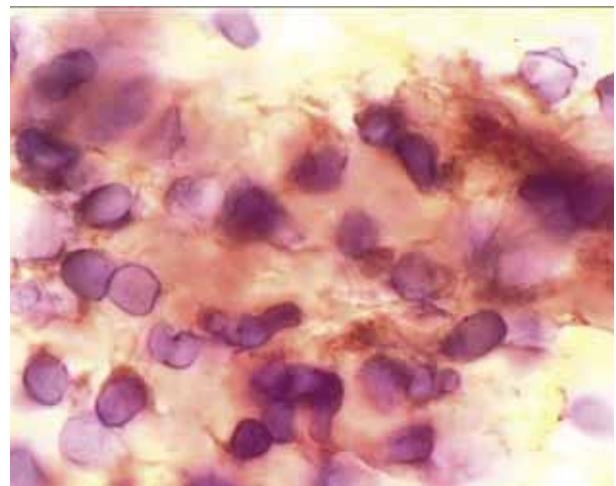
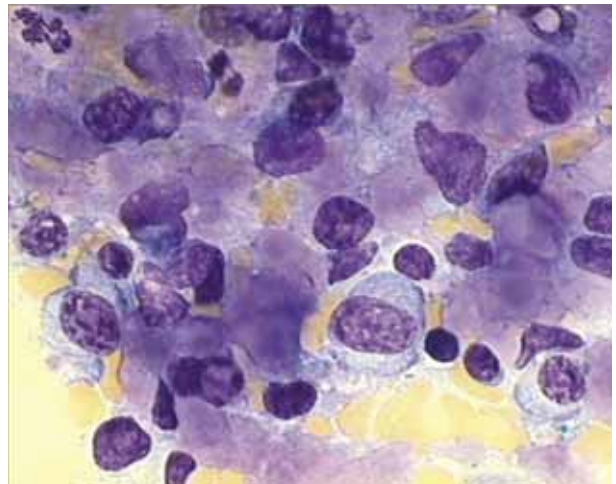
PRIKAZ BOLESNICE

Bolesnica u dobi od 52 godine, kojoj je prije 25 godina postavljena dijagnoza reumatoidnog artritisa, hospitalizirana je zbog anasarke s mikrocitnom anemijom. U kliničkom statusu uočavali su se tještasti edemi, uz krvni tlak 110/70 mm Hg, puls 90/min. U obiteljskoj anamnezi nije bilo težih bolesti. Bolesnica je u dosadašnjem tijeku liječenja reumatoidnog artritisa tijekom 25 godina liječena nesteroidnim antireumaticima (20 god.), kortikosteroidima i metotreksatom (nekoliko mjeseci), ali nije postignuta stabilna remisija, te je samoinicijativno prestala s uzimanjem lijekova zadnjih 5 godina. Zbog mikrocitne anemije primljena je na Odjel gastroenterologije te je učinjena obrada gastrointestinalnog trakta (gastroskopijska, kolonoskopijska, UZV abdomena i bubrega) koja je bila unutar granica normale.

U laboratorijskim nalazima bile su prisutne povišene vrijednosti upalnih parametara (SE 100 mm/3,6ks, CRP 6.8 mg/L). Reumatoidni faktor (lateks) je iznosio 300 IU/mL. Mikrocitna anemija (E $3,31 \times 10^{12}/L$, Hb 87 g/L, Hct 0,312 L/L, MCV 76,0 fL, željezo 5 $\mu\text{mol}/L$, saturacija transferina 0,16), hiperlipoproteinemija, elektrolitski disbalans u smislu hipokalcemije (Ca 1,88 mmol/L, Cl 110 mmol/L, K 4,6 mmol/L, Na 142 mmol/L, fosfati 1,08 mmol/L), hipoalbuminemija i hipoproteinemija (albumini 23,1 g/L, ukupni proteini 54,6 g/L) dominirali su u nalazima. Vrijednosti leukocita, trombocita, koagulacijskih i jetrenih testova bili su unutar referentnih vrijednosti. Biljezi hepatitisa bili su negativni. Proteinurija je pri primitku na Odjel bila 15,4 g/24h, u kontrolnim nalazima nije se spuštala ispod 10 g/24h. Bubrežna funkcija procijenjena klirensom kreatinina iznosila je 78 mL/min, odnosno nalazila se unutar 2. stupnja kronične bubrežne bolesti (kreatinin u serumu 88 $\mu\text{mol}/L$) uz mikrohematuriju (u sedimentu urina bilo je 20-30 eritrocita). Učinjena je biopsija bubrega, a patohistološkom obradom verificirana je sekundarna amiloidoza. Biopsijom bubrega utvrđeno je da su glomeruli bili lagano povećani, proširenih mezangijskih područja, bez hipercelulariteta, ispunjenih PAS blijedim amorfnim materijalom. Bojanjem kongo crvenilom u uzorku bez pretretmana kalijevim permanganatom dobila se pozitivna reakcija uz zeleni dvolom na polarizacijskom mikroskopu (sl. 1), a nakon pretretmana kalijevim permanganatom opisana reakcija se gubila što je ukazalo da



Sl. 1. Bioptat bubrega. Citokemijski pozitivna reakcija na amiloid (kongo crvenilo, x400).



Sl. 2. Punktat koštane srži. a) depoziti amiloida uz plazma stanice (bojenje po May-Grünwald Giemsi, x1000), b) citokemijski pozitivna reakcija na amiloid (kongo crvenilo, x1000)

se radi o AA vrsti amiloida (sl. 1). Imunohistokemijski i elektronskom mikroskopijom potvrđena je AA amiloidoza. Zbog izražene anemije učinjena je i citološka punkcija koštane srži koja je potvrdila da se radi o amiloidozi (sl. 2). Tijekom boravka bolesnica je liječena infuzijama kristaloidnih otopina, albuminima, antihipertenzivima (lizinopril 10 mg uz valsartan 80 mg), diureticima (furosemid 40 mg uz spironolactone 50 mg), melfalanom i prednisonom. Zbog nepodnošljivosti melfalana uveden je ciklosporin u dozi 2x50 mg, uz koji dolazi do smanjenja proteinurije na 5 g/24h. Bolesnica je praćena 23 mjeseca, nakon čega dolazi do progresije bubrežne bolesti do završnog stupnja. Bolesnica umire od posljedica infarkta srca u kardiogenom šoku.

RASPRAVA

Bubrežne promjene u reumatoidnom artritisu (RA) su česte (5). Klinički se bolest očituje proteinurijom i mikrohematurijom uz razvoj bubrežne insuficijencije, kao što je bio slučaj u prikazane bolesnice. Patohistološki u tkivu bubrega bolesnika s RA najčešće nalazimo amiloidozu, glomerulonefritis i intersticijski nefritis (5). Danas je poznato više tipova vlakana amiloida, a zajedničko obilježje svih oblika amiloida je P komponenta, glikoprotein koji čini 10-15% amiloida, daje stabilnost amiloidu i čini ga otpornim na tkivnu razgradnju (10,11). Primarna (AL) amiloidoza posljedica je odlaganja monoklonalnih λ i κ lakih lanaca imunoglobulina u sklopu hematoloških bolesti (10). Sekundarna (AA) amiloidoza je uzrokovana odlaganjem ekstracelularnog AA fragmenta SAA proteina plazme. Nastaje kao posljedica upale uz regulaciju TNF- α i mnoštva interleukina, kao što su IL-1 i IL-6 (1,10). Može nastati u bilo kojem upalnom stanju u kojem su trajno aktivirani proteini akutne faze: poput bolesnika s malignomima, kroničnim upalnim procesom/bolestima, kao što su reumatoidni artritis, ankirozantni spondilitis, tuberkuloza, bronhiektazije, obiteljska mediteranska vrućica te upalna bolest crijeva (2,3,12). U razvijenim zemljama primarna amiloidoza najčešći je oblik sistemske amiloidoze, u zemljama u razvoju češća je sekundarna amiloidoza (12,13). Aktivnost osnovne bolesti važan je čimbenik nastanka i progresije sekundarne amiloidoze, što vrijedi i za bolesnike s reumatoidnim

artritisom. U prikazane bolesnice aktivnost bolesti nije se uspješno kontrolirala medikamentnom terapijom uz relapse i dokazanu aktivnost bolesti te pozitivne parametre upale. U životinjskim modelima depoziti amiloida nađeni su od 18 sati do nekoliko tjedana nakon stimulacije upalnim procesima, a na nastanak i progresiju amiloidoze utjecali su različiti faktori (14,15). Vrijeme između dijagnoze reumatoidnog artritisa i pojave sekundarne amiloidoze je vrlo različito (5). Kod prikazane bolesnice dijagnoza amiloidoze je utvrđena nakon 25 godina trajanja RA. Dijagnoza bolesti se postavlja temeljem kliničke sumnje i patohistološke potvrde. Biopsija bubrega omogućava visoki stupanj potvrde dijagnoze, dok biopsija ostalih manje invazivnih i rizičnih mjesta kao što je abdominalno salo i rektum imaju manju dijagnostičku osjetljivost. Zbog toga se danas pri sumnji na amiloidozu sve češće koristi biopsija bubrega (16,17). Potvrđni test amiloidoze je bojanje kongo crvenilom, u uzorku bez pretretmana kalijevim permanganatom, s pozitivnom reakcijom uz zeleni dvolom na polarizacijskom mikroskopu, što je najvažnija potvrda, a imunohistokemijskim metodama se potvrdi da se radi o sekundarnoj amiloidozi, kao što je bio slučaj i u ove bolesnice. Imunohistokemijske metode imaju veliku specifičnost u potvrđivanju AA amiloidoze, dok su manje specifične pri dijagnozi AL amiloidoze (18). Bubrezi su zahvaćeni u oko 90% oboljelih od primarne i sekundarne amiloidoze. Zahvaćenost bubrega prezentira se nefrotskim sindromom, uglavnom težeg stupnja, s postupnom progresijom koja dovodi do zatajenja bubrežne funkcije i dijalize (10,12,16). Za razliku od drugih uzroka bubrežnog zatajenja, bubrezi su u oboljelih od amiloidoze na ultrazvuku normalne veličine i morfologije (10). Prognoza bolesnika sa sekundarnom amiloidozom u korelaciji je prije svega sa stupnjem zahvaćenosti bubrega a, ako se ne liječi, 50% bolesnika umire unutar 5 godina od postavljanja dijagnoze (10). Do sada ne postoji uspješno specifično liječenje sekundarne amiloidoze, već je terapijski pristup usmjeren prije svega na liječenje primarne bolesti (8,9).

Odlaganje amiloida, uz bubreg, najčešće je u jetri gdje vlakna amiloida uzrokuju narušavanje normalne građe i funkcije organa (1). Zahvaćenost srca rijetka je u AA amiloidozi, a češća u AL amiloidozi (12,18). Amiloidoza respiratornog trakta najčešće se očituje odlaganjem amiloida u submukozi traheobronhalnog stabla (19).

Postoji nekoliko različitih terapijskih pristupa u liječenju sekundarne amiloidoze u bolesnika s RA, kao što je liječenje ciklofosamidom, klorambucilom, ciklosporinom, inhibitorima TNF- α , ali i dalje ne postoji specifično liječenje. Liječenje bolesnika sa sekundarnom amiloidozom ima dvojaki pristup. Potrebno je smanjiti aktivnost primarne bolesti da se smanji stvaranje SAA proteina akutnog upalnog odgovora, prekursora amiloida. S druge strane, potrebno je liječenje i same amiloidoze od trenutka njezine dijagnoze. U sve široj su upotrebi inhibitori TNF- α , i to uglavnom infliksimab i etanercept (20,21). Djelovanje tih lijekova temelji se na učinku TNF- α na hepatocite tijekom akutne faze upalnog odgovora koji stimulira izlučivanje SAA proteina, prekursora amiloida. Studije s inhibitorima TNF- α dokazale su smanjenje cirkulirajućih razina SAA proteina i proteinurije kao i stabiliziranje bubrežne funkcije (20,21). Iako terapija infliksimabom smanjuje sintezu i odlaganje novog amiloida u tkivima (22,23), trenutno ne postoje lijekovi koji mogu odstraniti već nataložena vlakna amiloida (6). Zaključno treba istaći da u svih bolesnika s RA treba pratiti bubrežnu funkciju s određivanjem klirensa kreatinina, pregledom sedimenta urina i 24-satne proteinurije.

L I T E R A T U R A

1. Lovat LB, Madhoo S, Pepys MB, Hawkins PN. Long-term survival in systemic amyloid A amyloidosis complicating Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 112: 1362-5.
2. Obana M. Clinical studies on amyloidosis complicated with rheumatoid arthritis, with particular reference to nephropathy. *Jpn J Med* 1990; 29: 274-82.
3. Brownstein MH, Helwig EB. Secondary systemic amyloidosis: analysis of underlying disorders. *South Med J* 1971; 64: 491-6.
4. Makino H. Renal involvement in rheumatoid arthritis: analysis of renal biopsy specimens from 100 patients. *Mod Rheumatol* 2002; 12: 148-54.
5. Galešić K, Prkačin I, Tišljar M, Morović-Vergles J. Bubrežne promjene u bolesnika s reumatoidnim artritisom. *Reumatizam* 2009; 56: 30-5.
6. Nakamura T. Clinical strategies for amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2008; 18: 109-18.
7. Ensari C, Ensari A, Tümer N, Ertug E. Clinico-pathological and epidemiological analysis of amyloidosis in Turkish patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1721-5.
8. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003; 349: 583-96.
9. Rysava R, Merta M, Spicka M i sur. Current therapeutic possibilities in primary and secondary amyloidosis and our experience with 31 patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 38-40.
10. Khan MF, Falk RH. Amyloidosis. *Postgrad Med J* 2001; 77: 686-93.
11. Pepys MB, Herbert J, Hutchinson WL i sur. Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature* 2002; 417: 254-9.
12. Falk RH, Comenzo RL, Skinner M. The systemic amyloidoses. *N Engl J Med* 1997; 337: 898-909.
13. Simms RW, Prout MN, Cohen AS. The epidemiology of AL and AA amyloidosis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994; 8: 627-34.
14. Graether SP, Young ID, Kisilevsky R. Early detection of inflammation-associated amyloid in murine spleen using thioflavin T fluorescence of tissue homogenates: implications for amyloidogenesis. *Amyloid* 1996; 3: 20-7.
15. Kindy MS, Rader DJ. Reduction in amyloid A amyloid formation in apolipoprotein-E deficient mice. *Am J Pathol* 1998; 152: 1387-95.
16. Palma CL, Grünholz D, Osorio G. Clinical features of patients with the pathological diagnosis of amyloidosis. *Rev Med Chil* 2005; 133: 655-61.
17. Röcken C, Sletten K. Amyloid in surgical pathology. *Virchows Arch* 2003; 443: 3-16.
18. Lachmann HS, Booth DR, Booth SE i sur. Misdiagnosis of hereditary amyloidosis as AL (primary) amyloidosis. *N Engl J Med* 2002; 346: 1786-91.
19. Rubinow A, Celli BR, Cohen AS, Rigden BG, Brody JS. Localized amyloidosis of the lower respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118: 603-11.
20. Fernandez-Nebro A, Tomero E, Ortiz-Santamaria V i sur. Treatment of rheumatic inflammatory disease in 25 patients with secondary amyloidosis using tumor necrosis factor alpha antagonists. *Am J Med* 2005; 118: 552-6.
21. Nakamura T, Higashi S, Tomoda K, Tsukano M, Baba S. Efficacy of etanercept in patients with AA amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 518-22.
22. Ori Elkayam, Hawkins PN, Lachmann H i sur. Rapid and complete resolution of proteinuria due to renal amyloidosis in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2571-3.
23. Gottenberg JE, Merle-Vicent F, Bentaberry F i sur. Anti-tumor necrosis factor α therapy in fifteen patients with AA amyloidosis secondary to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2019-24.

S U M M A R Y

SECONDARY (AA) RENAL/BONE AMYLOIDOSIS COMPLICATING RHEUMATOID ARTHRITIS

I. PRKAČIN^{1,4}, B. ŠKURLA¹, D. POČANIĆ¹, T. BULUM¹, S. BULIMBAŠIĆ^{2,4} and I. KARDUM-SKELIN^{3,4}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine*, ²*University Hospital Dubrava*,
³*University Hospital Merkur, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics*
and ⁴*University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Amyloidosis is a clinical entity that results from deposition of an extracellular protein material that causes disruption in normal architecture and impairs function of multiple organs and tissues. Secondary amyloidosis (AA) is a rare but serious complication that appears in the context of cancer, chronic inflammation, and chronic infectious disease, including rheumatoid arthritis. Renal failure is the most common clinical presentation of AA, ranging from nephrotic syndrome and impaired renal function to renal failure, with a potential for high morbidity. We present a case of a 52-year-old female patient diagnosed with rheumatoid arthritis at age 27. She was hospitalized due to worsening clinical condition. Physical examination revealed marked peripheral edema in both lower extremities. Laboratory tests showed an increase of inflammatory reactants, anemia, electrolyte disbalance, and severe hypoalbuminemia and hypoproteinemia. She had proteinuria 15.4 g/24 h and renal function estimated by creatinine clearance was 78 mL/min, within the second degree of chronic kidney disease. Renal biopsy was performed for evaluation of renal insufficiency with nephrotic range proteinuria. Congo red staining showed the presence of characteristic amyloid deposits that immunoreacted with the antibody against amyloid A protein, thus confirming the diagnosis of secondary amyloidosis.

Key words: renal/bone amyloidosis, rheumatoid arthritis

SINDROM HIPERHEMOLIZE U BOLESNICE BEZ HEMOGLOBINOPATIJE

INGRID PRKAČIN^{1,5}, JASNA MESARIĆ^{2,5}, GORDANA CAVRIĆ¹, SILVANA JURENEC³,
ŽELJKA HUNDRIĆ-HAŠPL² i IKA KARDUM-SKELIN^{4,5}

¹Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti ²Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu,

³Klinička bolnica Merkur, Transfuzijska jedinica, ⁴Zavod za kliničku citologiju i citogenetiku i

⁵Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Sindrom hiperhemolize najčešće se javlja u bolesnika s talasemijom koji primaju višestruke transfuzije. Postoji svega nekoliko kliničkih izvješća s opisom sindroma hiperhemolize u bolesnika bez hemoglobinopatija. U ovom je radu prikazan slučaj bolesnice s kroničnom bubrežnom bolesti, refraktornom anemijom kronične bolesti, koja ranije nije primala transfuzije krvi. Zbog anemije bolesnica je primila filtrirane i oprane eritrocite uz i dalje rezistentnu anemiju. Učinjena je kompletna obrada, kojom je postavljena dijagnoza sindroma hiperhemolize. S obzirom na progresiju bubrežnog oštećenja započeta je nadomjestna bubrežna terapija (bez primjene heparina) uz daljnje pogoršanje hemolize. Započeto je liječenje kortikosteroidima (1 mg/kg) i intravenskim imunoglobulinima, ali simptomi hiperhemolize uz trombocitopeniju progrediraju. Unatoč poduzetim mjerama bolesnica umire pod slikom cerebrovaskularnog infarkta i sepse. Obdukcijom nije nađeno elemenata za hemolitičko-uremijski sindrom niti za trombotičku trombocitopeničnu purpuru.

Ključne riječi: sindrom hiperhemolize

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Ingrid Prkačin, prim., dr. med.
Klinička bolnica Merkur
Klinika za unutarnje bolesti
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: ingrid.prkacin@gmail.com

UVOD

Sindrom hiperhemolize je vrlo rijetki entitet koji podrazumijeva prisutnost laboratorijskih i kliničkih znakova razgradnje eritrocita bez dokazanog prisustva klinički značajnih antieritrocitnih aloprotutijela *in vitro*. Obično se javlja u bolesnika s anemijom srpastih stanica i talasemijom. Postoji svega nekoliko izvješća o sindromu hiperhemolize u bolesnika bez hemoglobinopatije (1,2). Razlikuju se dva osnovna oblika hiperhemolitičke posttransfuzijske reakcije: akutni i odgođeni (3,4). Akutni se javlja unutar 7 dana, a odgođeni nakon sedam dana od primjene transfuzije eritrocitnih pripravaka. Patogeneza hiperhemolize je kompleksna i još uvijek nedovoljno razjašnjena.

Neke od teorija hiperhemolizu objašnjavaju hiperaktivnošću makrofaga, druge spominju neispravnu regulaciju komplementa, treće antieritrocitna antitijela ispod granica detekcije imunohematoloških metoda, a spominju se i anti HLA protutijela prve klase (5).

Sindrom hiperhemolize je ozbiljna i za život opasna komplikacija koja se može javiti nakon transfuzije eritrocitnih pripravaka. Diferencijalno-dijagnostički potrebno je razmišljati o trombotičkoj trombocitopeničnoj purpuri (TTP) koja je rijedak poremećaj koagulacijskog sustava karakteriziran spontanom stvaranjem mikrotromba u malim krvnim žilama, mikroangiopatskom hemolitičkom anemijom i posljedičnom ishemijom organa (6). Kako za sada

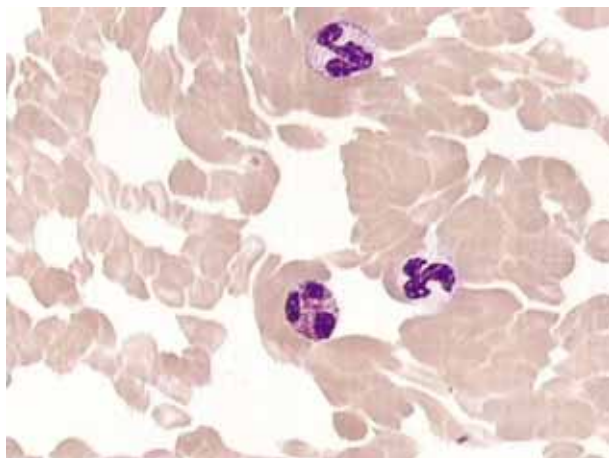
nema specifičnog testa za potvrdu TTP, bolest se dijagnosticira temeljem simptoma, laboratorijskih nalaza trombocitopenije bez koagulopatije, sniženog hemoglobina, povišene vrijednosti laktat dehidrogenaze (LDH), patoloških pokazatelja bubrežne funkcije, citološke analize razmaza periferne krvi, neuroloških poremećaja uz isključenje ostalih mogućih uzroka trombocitopenije poput hemolitičko-uremičkog sindroma (7,8). U ovom radu prikazujemo bolesnicu sa sindromom hiperhemolize, koja nije bolovala od hemoglobinopatije. Pregledom literature postoji svega nekoliko izvješća u kojima se opisuje ovaj rijedak entitet.

PRIKAZ BOLESNICE

78-godišnja bolesnica hospitalizirana je zbog slabosti s refrakternom anemijom kronične bolesti. U obiteljskoj anamnezi nije bilo težih bolesti. Radi se o bolesnici kojoj je već 1997. god. utvrđena dijagnoza kronične bubrežne bolesti. Bolesnica je do sada liječena 1991. zbog tuberkuloze pluća. Zadnja kontrola nefrologa u drugoj ustanovi bila je 2004. god. kada je kreatinin iznosio 250 $\mu\text{mol/L}$. Bolesnica nije uzimala lijekove niti je ikada primala transfuziju eritrocita. Dva tjedna prije prijma na Kliniku bolesnica je uočila otok desne potkoljenice uz pritisak u prsnom košu zbog čega se javila u Hitnu službu. U kliničkom statusu pri prijmu utvrđen je povišen krvni tlak (160/90 mm Hg) blijedilo kože i voluminoznija desna potkoljenica (bez kliničkih znakova duboke venske tromboze) s inflamiranim arealom na prednjoj strani veličine 5x2cm. Bolesnica je negirala ubod insekta ili traumu toga područja. U laboratorijskim nalazima pri dolasku bile su prisutne povišene vrijednosti upalnih parametara (SE 105 mm/3,6 ks, CRP 22,9 mg/L), uredna vrijednost leukocita i trombocita, normocitna anemija (E $1,92 \times 10^{12}/\text{L}$, Hb 65 g/L, Hct 0,212 L/L, MCV 87,3 fL, željezo 10 $\mu\text{mol/L}$, TIBC 18 $\mu\text{mol/L}$, UIBC 8 $\mu\text{mol/L}$, saturacija transferina 0,56), hiperlipoproteinemija (trigliceridi 2,95 mmol/L, ukupni kolesterol 5,7 mmol/L, LDL-kolesterol 3,5 mmol/L, HDL-kolesterol 0,9 mmol/L). Vrijednosti elektrolita, proteina seruma, bilirubina, troponina, faktora koagulacije bile su uredne. Bubrežna funkcija procijenjena klirensom kreatinina iznosila je 16 mL/min odnosno nalazila se unutar 4/5. stupnja kronične

bubrežne bolesti (kreatinin u serumu 594 $\mu\text{mol/L}$, proteini u urinu 0,78 g/dU, volumen 24-satnog urina 2900 mL). U urinu je utvrđena proteinurija (1 g/L) i eritrociturija. Radioimunodifuzijom su utvrđene uredne vrijednosti imunoglobulina IgG i IgM, uz nešto niži IgA. U hormonskom statusu štitne žlijezde bile su uredne vrijednosti TSH i slobodnih hormona. Pri dolasku bolesnica je zbog anemije primila 2 doze koncentriranih eritrocita. Kontrolni nalaz hemoglobina iznosio je 65 g/L te je ponovno naručena krv. Bolesnica je od dolaska do 13. dana hospitalizacije primila 8 doza koncentrata eritrocita sa smanjenim brojem leukocita. Tada je u nalazima uočen povišen udio retikulocita (15%) uz porast laktat dehidrogenaze i blagi porast bilirubina koji se od tada stalno prati. Četvrti dan nakon prijma uočen je i niži broj trombocita koji su iznosili ($126 \times 10^9/\text{L}$) i od tada se prati stalno snižavanje broja trombocita. Antitrombocitna antitijela nisu dokazana. U nalazu citološkog leukograma utvrđeni su shizociti (27 na 10 000 E), anizocitoza, poikilocitoza, polikromazija. Hemosiderin u urinu bio je negativan. Punktat koštane srži pokazao je normocelularnu koštanu srž s prisutnim svim razvojnim oblicima, uz prilično megakariocita. Citološka analiza razmaza periferne krvi utvrdila je eritrocite s aglutininima (sl. 1), temeljem čega je proširena imunoematološka obrada koja je pokazala sljedeće: mikroaglutinacijski indirektni antiglobulinski Coombsov test (IAT) i mikroaglutinacijski direktni antiglobulinski test (DAT - koji dokazuje prisustvo IgG, IgA i IgM protutijela na eritrocitima) bili su negativni. Na eritrocitima i u serumu bolesnice dokazana je aktivnost sustava komplementa (DAT pozitivan, anti C3d 1:1/zbroj bodova 10) i prisustvo hladnih protutijela s temperaturnim optimumom do 20° C koja klinički nisu značajna. Rezultati ispitivanja nisu potvrdili prisustvo klinički značajnih antieritrocitnih protutijela pa je isključena odgovorna poslijetransfuzijska reakcija. Opetovanim testiranjem DAT i IAT su bili negativni. Nakon 4 doze transfundiranih eritrocita i 14. dan od primitka prve transfuzije utvrđen je pozitivan DAT s aktiviranim komponentama komplementa (anti C3d). Sve IAT i križne probe rađene mikroaglutinacijskom metodom s plazmom bile su negativne. U istom razdoblju DAT je metodom u epruveti bio negativan, dok je mikroaglutinacijskom metodom bio pozitivan. Učinjen je i panel reaktivnih antitijela u serumu. Testovi su izvedeni metodom citotoksičnosti ovisnoj o komplementu (CDC) i Luminex i bili su negativni.

Na eritrocitima su dokazane komponentne komplekta (C3d-inaktivna komponenta) uz negativnu aktivnu komponentu (C3c), te je postavljena sumnja na sindrom hiperhemolize. Od tada je bolesnica dobivala filtrirane i oprane koncentrate eritrocita (ne starije od 5 dana) uz oprane koncentrate trombocita. Smrznuta plazma bila je kontraindicirana zbog aktivacije komplekta. Nakon postavljanja dijagnoze sindroma hiperhemolize u terapiju su uvedeni kortikosteroidna terapija (1mg/kg iv.) i imunoglobulini.



Sl. 1. Aglutinirani eritrociti u razmazu periferne krvi bolesnika s hladnim antieritrocitnim protutijelima, MGG, x1000

Kompletna mikrobiološka obrada uzoraka krvi, urina i desne potkoljenice bila je sterilna. Vrijednosti imunološke obrade bile su uredne (antinuklearni faktor, komplement, krioglobulini). Nalazi biljege hepatitisa A, B i C kao i serologija na lišmeniozu (*Borelia burgdorferi*) bili su negativni. Rtg srca i pluća verificirao je post. specifične promjene apikoposteriorno uz negativan kožni test (PPD), doplerski pregled vena nogu isključio je duboku vensku trombozu. Na UZV srca utvrđena je uredna sistolička funkcija uz reduciranu dijastoličku (2/IV), sklerotične dijelom kalcificirajuće promjene struktura zalistaka lijevog srca, uz hiperkinetsku cirkulaciju. Obradom gastrotrakta utvrđeni su divertikuli sigme sa sitnim tubularnim polipom displazije epitela „low grade“. Na ultrazvučnom pregledu abdomena osim terminalno promijenjenih bubrega i hiperehogenije jetre nalaz je bio uredan. Zbog progresije kronične bubrežne bolesti započeta je nadomjestna bubrežna terapija hemodijalizom putem centralnog venskog katetera. Prilikom po-

stavljanja i tijekom dijaliza (ukupno 12) nije primala heparin (kako se ne bi povezivalo s heparin induciranom trombocitopenijom odnosno HIT-om) nego DuraLock-C (Catheter Lock Solution: trisodium citrate 300 mg/mL). Klinička slika se komplicira dijarejama uz izolat *Clostridium difficile*, zbog čega je u terapiju uveden Medazol 3x500 mg te Vankomicin 4x125 mg *per os*. Dolazi do razvoja refrakterne acidoze i pogoršanja kliničkog stanja bolesnice. Umire pod slikom refraktornog šoka i sepse sa sumnjom na neurološko zbivanje. Obdukcijom se ne potvrdi akutno neurološko ili kardijalno zbivanje.

RASPRAVA

Sindrom hiperhemolize opisuje se pretežito u bolesnika s anemijom srpastih stanica i talasemijom, ali vrlo rijetko u bolesnika bez hemoglobinopatija (3,4). Pojam hiperhemolize primjenjuje se u slučaju kada je poslijetransfuzijska vrijednost hemoglobina znatno niža od prijetransfuzijske, što upućuje na razgradnju bolesnikovih i transfundiranih eritrocita. Patogeneza hiperhemolize je složena i još uvijek nedovoljno razjašnjena. Transfuzije eritrocitnih pripravaka s negativnom križnom probom ne sprječavaju razgradnju eritrocita. Prijetransfuzijska i poslijetransfuzijska ispitivanja mogu imati negativan ili pozitivan (samo komplement) direktni antiglobulinski test (DAT) bez dokazanog prisustva antieritrocitnih protutijela (5). Neke od teorija hiperhemolizu objašnjavaju hiperaktivnošću makrofaga koji mogu uzrokovati tzv. „bystander“ hemolizu eritrocita. Isti oblik hemolize bez djelovanja antieritrocitnih protutijela mogu uzrokovati imuni kompleksi (sposobnost aktivacije komplekta), neispravna regulacija komplekta, antieritrocitna antitijela ispod granica detekcije imunohematoških metoda, a spominju se i anti HLA protutijela prve klase (5,9).

Prikazan je slučaj bolesnice sa sindromom hiperhemolize u završnom stupnju kronične bubrežne bolesti kod koje nije verificirana niti jedna od hemoglobinopatija. Citološka analiza razmaza periferne krvi pokazala je eritrocite s aglutininima, što se može objasniti djelovanjem hladnih antieritrocitnih protutijela. Zbog anamnestičkih podataka o trudnoćama, transfuziji koncentrata eritrocita i kliničkim znakovima razgradnje eritrocita nakon

transfuzijske terapije, postavljena je sumnja na odgođenu poslijetransfuzijsku reakciju. Odgođena poslijetransfuzijska reakcija nije potvrđena. U serumu i plazmi nisu dokazana značajna antieritrocitna protutijela. Pozitivni rezultati IAT-a *in vitro* mogu se objasniti djelovanjem klinički neznčajnih hladnih antieritrocitnih protutijela i aktiviranih komponenta komplementa. Aktivacija komplementa *in vivo* uz prisutnost laboratorijskih i kliničkih znakova razgradnje eritrocita upućuje na sindrom hiperhemolize tijekom kojega dolazi do razgradnje transfundiranih eritrocita bez dokazanog prisustva klinički značajnih antieritrocitnih protutijela *in vitro*. Od tada je bolesnica dobivala filtrirane i oprane koncentrate eritrocita uz oprane koncentrate trombocita. Svježe smrznuta plazma je zbog aktivacije komplementa bila kontraindicirana.

U Americi su između 2005. do 2008. godine prijavljena 34 izvješća o fatalnoj odgođenoj posttransfuzijskoj reakciji (5). Diferencijalno-dijagnostički u ove smo naše bolesnice razmatrali odgođenu posttransfuzijsku reakciju, trombotičku trombocitopeničnu purpuru (TTP), hemolitičko-uremijski sindrom (HUS-infekcija, ubod pauka-hemoliza, septikemija), paroksizmalnu noćnu hemoglobinuriju (PNH). Ništa od navedenog nije potvrđeno. Na razmišljanje o TTP potaknule su nas povišene vrijednosti laktat dehidrogenaze (LDH), indirektnog bilirubina, prisutnost fragmentiranih eritrocita (shizocita), normalni koagulacijski parametri, na Coombsov test negativna hemolitička anemija, progresija bubrežnog oštećenja, i na kraju neurološka slika pod kojom bolesnica umire. TTP može biti prirođena i stečena. Prirođena je uzrokovana mutacijom gena koji kodira stvaranje metaloproteaze ADAMTS13, a stečena (idiopatska) prisutnošću antitijela koja koče aktivnost ADAMTS13. Metaloproteaza ADAMTS13 cijepa velike multimerne von Willebrandovog faktora (ULVWF) koji se sintetizira u endotelnim stanicama. Kod smanjene aktivnosti ADAMTS13 veliki multimeri VWF se vežu na trombocite, adheriraju na endotel i dovode do stvaranja mikroskopskih tromboza u malim krvnim žilama (6). Stečena TTP može nastati kao posljedica korištenja lijekova poput antiagregacijskih (klopidogrel, tiklopidin), imunosupresivnih (ciklosporin, mitomicin, takrolimus, interferon-alfa), kinina. Može se javiti u trudnoći, posebice u 3. trimestru, povezuje se s infekcijom virusa HIV-a, a opisani su slučajevi i nakon transplantacije krvo-

tvornih matičnih stanica (7,8). Prikazana bolesnica nije uzimala niti jedan od navedenih lijekova, niti je imala infekciju virusom HIV-a. Razmatran je i hemolitičko-uremični sindrom (HUS), iako se zna da je HUS češći u djece i u 90% slučajeva uzrokovano toksinom koji producira *E. coli*. I HUS i TTP su karakterizirani hemolitičkom anemijom i trombocitopenijom, ali kod HUS-a je dominantna akutna bubrežna bolest (prikazana je bolesnica imala kroničnu bubrežnu bolest u završnom stupnju), dok je kod TTP izraženija neurološka simptomatologija. Terapijski pristupi se također razlikuju kod sindroma hiperhemolize i TTP. Terapija sa steroidima i intravenskim imunoglobulinima indicirana je kod teške anemije u sindromu hiperhemolize, što je i primijenjeno kod bolesnice (5). Terapija izbora kod TTP i HUS-a je plazmafereza. Započinjanjem nadomjestnog bubrežnog liječenja u bolesnice dolazi do daljnjeg pogoršanja, a ne poboljšanja hemolize.

Može li se povezati sindrom hiperhemolize s hemodijalizom? U novijoj literaturi postoje podaci o intravaskularnoj hemolizi uzrokovanj hemodijalizom putem dušičnog oksida, čime se otvara i mogućnost terapijske primjene nitrata u sprječavanju hemolize, ali daljnja će istraživanja potvrditi navedene pojmove (9,10).

U ovome radu naglašena je važnost timskog i multidisciplinarnog pristupa, posebno kada određeni laboratorijski nalazi (u ovom slučaju pozitivan komplement) ograničavaju neke terapijske mogućnosti.

LITERATURA

1. Darabi K, Dzik S. Hyperhemolysis syndrome in anemia of chronic disease. *Transfusion* 2005; 45: 1930-3.
2. Mota MA, Sakashita AM, Hamerschlak N. Posttransfusion hyperhemolysis after hemolytic transfusion reaction in a patient with severe anemia: Case report. *Vox Sang* 2006; 91(Suppl3): 233.
3. El-Husseini A, Sabry A. Fatal hyperhemolytic delayed transfusion reaction in sickle cell disease: a case report and literature review. *Am J Emerg Med* 2010; 28: 1062-8.
4. Win N, New H, Lee E. Hyperhemolysis syndrome in sickle cell disease: Case report (recurrent episode) and literature review. *Transfusion* 2008; 48: 1231-8.

5. Win N, Sinha S, Lee E, Mills W. Treatment with intravenous immunoglobulin and steroids may correct severe anemia in hyperhemolytic transfusion reactions: Case report and literature review. *Transf Med Rev* 2010; 24: 64-7.
6. Furlan M, Robles R, Galbusera M. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339: 1578-84.
7. Lammler B, George JN. Thrombotic thrombocytopenic purpura: advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Semin Hematol* 2004; 41: 1-3.
8. Zheng XL, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 249-77.
9. Donadee CL, Gladwin MT. Hemodialysis hyperhemolysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 460-2.
10. Meyer C, Heiss C, Drexhage C. Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 454-9.

S U M M A R Y

HYPERHAEMOLYTIC SYNDROME IN PATIENT WITHOUT HAEMOGLOBINOPATHIES

I. PRKAČIN^{1,5}, J. MESARIĆ^{2,5}, G. CAVRIĆ¹, S. JURENEC³,
Ž. HUNDRIĆ-HAŠPL² and I. KARDUM-SKELIN^{4,5}

¹*Merkur University Hospital, Department of Internal Medicine*, ²*Croatian Institute of Transfusion Medicine*, ³*Merkur University Hospital, Unit of Transfusion Medicine*, ⁴*Department of Clinical Cytology and Cytogenetics* and ⁵*University of Zagreb, School of medicine, Zagreb, Croatia*

Hyperhemolysis syndrome usually occurs in patients with sickle cell disease and possibly thalassemia who receive multiple transfusions. There are only few clinical reports on patients without hemoglobinopathies as in this report. Our patient was diagnosed with hyperhemolytic reaction and was infused with IVIG and methylprednisolone for several days. Signs of tissue hypoxia developed along with increased cardiac enzymes, hepatocellular and cerebrovascular injury, and finally death. On autopsy, there was no evidence for hemolytic uremic syndrome or thrombotic thrombocytopenic purpura.

Key words: hyperhemolytic syndrome

MALIGNI MIJEŠANI MEZODERMALNI TUMOR JAJNIKA (MMMT) - DRUGI PRIMARNI TUMOR U BOLESNICE S INVAZIVNIM KARCINOMOM DOJKE

KARMELA ŠENTIJA¹, INES KRIVAK BOLANČA¹,
SUZANA KATALENIĆ SIMON¹, VLASTIMIR KUKURA^{2,4}, ANITA ŠKRTIĆ^{3,4} i SLAVKO GAŠPAROV^{3,4}

¹Klinička bolnica Merkur, Zavod za citologiju i citogenetiku, Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku,

²Klinika za ženske bolesti i porode, ³Klinički zavod za patologiju i citologiju, ⁴Sveučilište u Zagrebu,
Medicinski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Maligni miješani mezodermalni tumor (MMMT) jajnika izrazito se rijetko javlja, a najčešće nastaje u spolnom sustavu žena u vrijeme postmenopauze. Nepoznate je etiologije, a novija istraživanja njegov nastanak povezuju s postoperativnom radioterapijom i terapijom Tamoxifenom u bolesnica s primarnim invazivnim karcinomom dojke i prisutnom genskom mutacijom Brca1 i Brca2. Čini manje od 2% sveukupnih malignih tumora u jajniku. Izrazito je agresivnog tijeka, brzo raste i brzo se širi. Kod pojave prvih simptoma i postavljanja dijagnoze većinom se radi o uznapredovaloj fazi bolesti. a vrijeme preživljenja je od tri mjeseca do dvije godine od postavljanja dijagnoze. Histološki tumor je građen od dvije komponente: maligne epitelne i maligne stromalne komponente. Prema udjelu stromalne komponente dijeli se u dva tipa: homologni i heterologni, i prema novijim istraživanjima heterologni tip ne pokazuje agresivniji tijek i ne utječe znatno na preživljenje u odnosu na homologni tip. U ovom radu prikazujemo diferencijalno dijagnostičke poteškoće u citološkoj i patohistološkoj dijagnozi MMMT-a jajnika u postmenopauzalne bolesnice koja nakon primarnog karcinoma dojke, postoperativne radioterapije i terapije Tamoxifenom nakon tri godine razvija drugi primarni tumor, MMMT jajnika. Tijek bolesti je izuzetno agresivan s letalnim završetkom šest mjeseci nakon pojave simptoma i dijagnoze MMMT-a.

Ključne riječi: maligni miješani mezodermalni tumor (MMMT), jajnik, drugi primarni tumor, karcinom dojke, Tamoxifen

Adresa za dopisivanje: Karmela Šentija
Klinička bolnica „Merkur“
Zavod za citologiju i citogenetiku
Jedinica za ginekološku citologiju i citogenetiku
Zajčeva 19
10000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 91 48 91 613
E-pošta: ksentija@yahoo.com

UVOD

Maligni miješani mezodermalni tumor (MMMT) je maligni tumor koji može nastati u bilo kojem organu, ali najčešće nastaje u spolnom sustavu žena u vrijeme postmenopauze (1). Incidencija MMMT-a je izuzetno niska, u jajniku manje od 2% svih malignih tumora (2). Histološki, MMMT se sastoji od dvije maligne komponente, epitelne i stromalne, a prema tipu stromalne komponente klasificira se kao heterologni ili homologni tip tumora (1-3). Izvanredno je agresivnog tijeka i ima lošu prognozu. Tumor

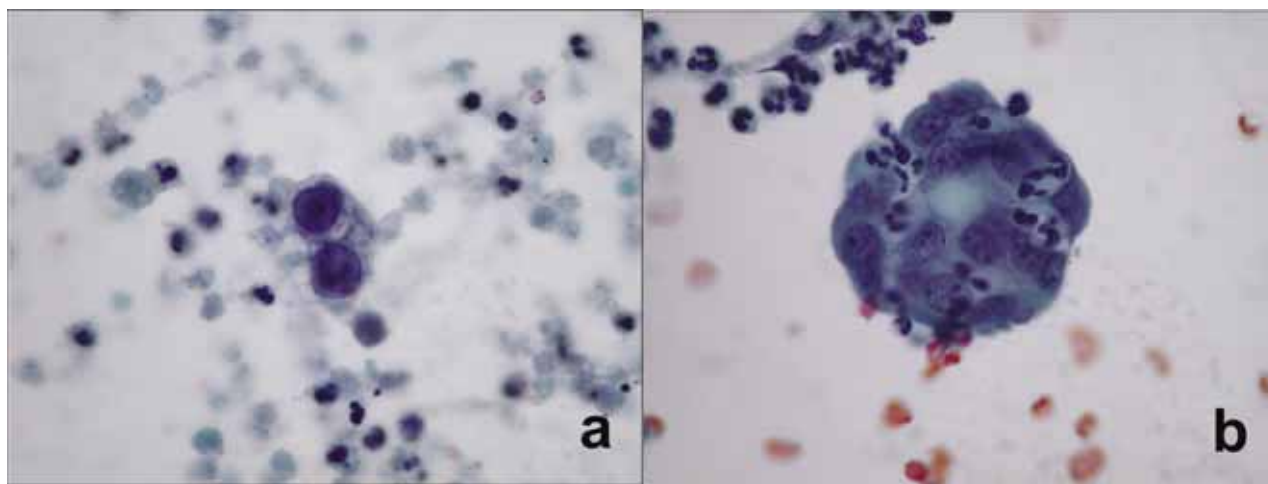
brzo progredira i diseminira, te se kod prve pojave simptoma i postavljanja dijagnoze većinom radi o tumoru uznapredovalog stadija bolesti. Prema nekim autorima heterologni MMMT ima lošiju prognozu, ali nedavne studije ukazuju da histološki podtip tumora ne utječe znatno na tijek bolesti (4,5). O histopatogenezi MMMT-a mišljenja su dvojaka. Većina autora zastupa monoklonalnu teoriju po kojoj se obje maligne komponente razvijaju iz zajedničke epitelijalne matične stanice (6), dok drugi zastupaju biklonalnu teoriju po kojoj se tumor razvija iz dvije maligne populacije stanica

različitog podrijetla (7). Usprkos relativno dobrom odgovoru na kemoterapiju u bolesnica vrlo brzo dolazi do recidiva bolesti i smrtnog ishoda. Prema nekim autorima prosječno preživljenje bolesnica kreće se od tri mjeseca do dvije godine nakon pojave prvih simptoma bolesti (2-4).

PRIKAZ BOLESNICE

Pedesetdvoгодиšnja bolesnica hospitalizirana je u Klinici za ženske bolesti i porode zbog pojave tumorske mase u abdomenu. Bolesnica je tri godine prije operirala invazivni karcinom dojke te je liječena radioterapijom i terapijom Tamoxifenom. Prve simptome bolesnica je primijetila mjesec dana ranije, navodi i rast trbuha, tvrdog na opip, bez bolova. Ultrazvučno se dijagnosticira tumorska tvorba u abdomenu ograničena debelom stijenkom, heterohogenih odjeka, septirana, pretežno solidna, a manjim dijelom pseudocistična s tekućim sadržajem. Tumor je ispunjavao cijelu malu zdjelicu pa mu je bilo teško ustanoviti podrijetlo. Uterus je bio malen te se nalazio u ascitesu. Pri dolasku serumska vrijednost tumorskog biljega CA-125 bila je 107 IU/mL (referentna vrijednost < 35 IU/mL).

ascitesa te intraoperativna citološka i patohistološka analiza uzoraka. Intraoperativno, nakon centrifugiranja učinjeni su citološki razmazi tekućeg sadržaja tumora jajnika i ascitesa, te obojani metodom May-Giemsa-Greenwald (MGG). Postoperativno su učinjeni trajni citološki razmazi sadržaja tumora jajnika i ascitesa te obojani standardnim bojanjem po Papanicolaou, citokemijskom PAS metodom te imunocitokemijsko bojanje protutijelima na Epitelni Antigen (EA), Vimentin i Citokeratin (CK)7 (DakoCytomation Denmark - Dako). Materijal intraoperativnog citološkog razmaza sedimenta sadržaja tumora jajnika bio je izrazito degenerativno promijenjen. U nekrotičnoj podlozi nalazila se po koja pojedinačna degenerativno promijenjena stanica obilnije svijetle citoplazme ovalne jezgre mjestimično naglašenih nukleola, uz obilje granulocita, histiocita, nešto pigmentofaga, te se postavi dijagnoza endometrijske ciste. U razmazu sedimenta ascitesa, uz obilje granulocita, raspalih eritrocita i histiocitnih stanica nalazile su se stanice mezotela, dijelom degenerirane i dijelom u histiocitarnoj transformaciji te po koja manja nakupina stanica papilarnog izgleda. Zbog izrazite upalne infiltracije i reaktivnih promjena stanica nije se moglo sa sigurnošću odrediti priroda procesa.



Sl. 1. Citološka slika sadržaja: a) tumora jajnika, MGG, x1000; b) ascitesa, Papanicolaou, x1000.

Nakon preoperativne obrade bolesnici je učinjena laparotomija s obostranom adnektomijom, histerektomijom i omentektomijom. Intraoperativno je učinjena aspiracija sadržaja tumora jajnika i

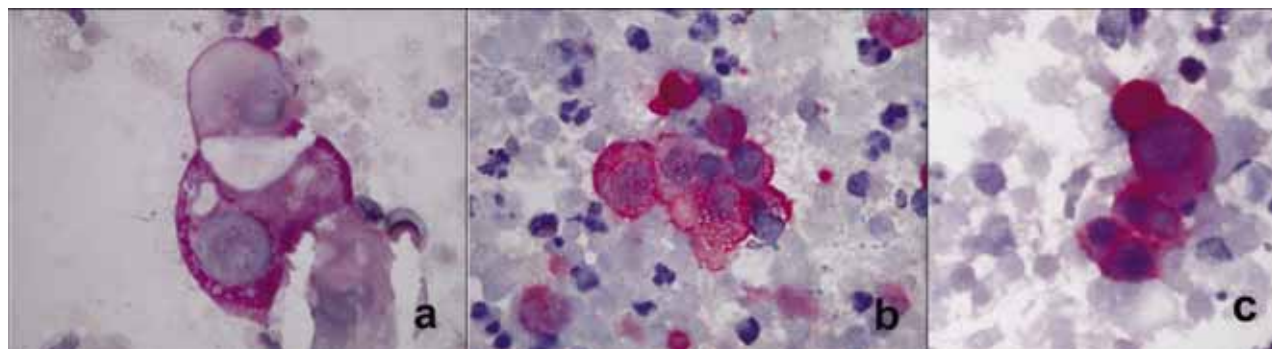
U trajnim citološkim razmazima sedimenta sadržaja tumora jajnika uočavale su se svijetle stanice naglašenih nukleola suspektne morfologije na maligni proces najvjerojatnije epitelnog podrijetla (sl. 1a).

Diferencijalno-dijagnostički radilo se o adenokarcinomu ili karcinomu svjetlih stanica.

U trajnom citološkom razmazu sedimenta ascitesa u upalno i reaktivno promijenjenoj podlozi nalazile su se, uz reaktivno promijenjene stanice mezotela, manje papilarne formacije stanica suspektnog izgleda koje su morfološki odgovarale adenokarcinomu (sl. 1b). Diferencijalno dijagnostički, da bi se potvrdilo podrijetlo stanica u citološkim razmazima sedimenta sadržaja tumora jajnika i ascitesa, učinjeno je citokemijsko bojanje PAS metodom te imunocitokemijsko bojanje na EA, CK7 i Vimentin

ponovno hospitalizirana u Klinici za ženske bolesti i porode zbog tumora debelog crijeva. Učinjena je desna hemikolektomija zbog dvije ulcerirane hemoragične srednje mekane tvorbe promjera 5,5 i 6 cm na serozi debelog crijeva. Intraoperativnom patohistološkom analizom uzorka tumora promjera 0,8 cm postavilo se dijagnozu malignog procesa bez subtipizacije tumora.

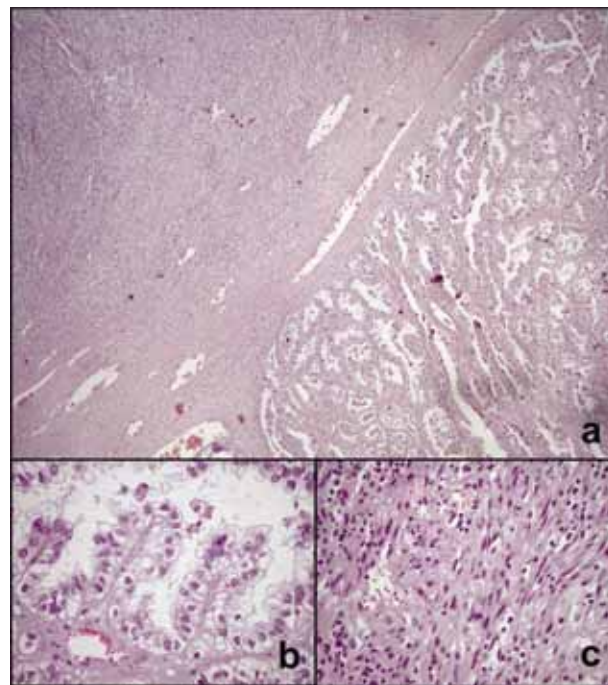
Postoperativno je učinjena morfološka analiza tumora uz imunohistokemijsko bojanje protutijelima danskog proizvođača DacoCytomation Denmark (Dako): CKAE1/AE3 (klon M3515, 1:50 Dako), CK7



Sl. 2. Stanice tumora jajnika: a) imunocitokemijski pozitivne na epitelni biljeg (Ber-EP4), LSAB, x1000; b) citokemijski pozitivne na PAS, x1000; c) imunocitokemijski pozitivne na CK7, LSAB, x1000.

(Dako). Morfološki suspektne stanice bile su EA (sl. 2a) i PAS pozitivne (sl. 2b) u oba uzorka, te CK7 pozitivne u uzorku ascitesa (sl. 2c). Nalaz je odgovarao tumoru epitelnog podrijetla te je na temelju morfologije stanica i rezultata citokemijskog kao i imunocitokemijskog bojanja postavljena dijagnoza karcinoma svjetlih stanica.

Istodobno intraoperativno na patohistološku analizu zaprimljena su adneksa s jajovodom duljine 12,5 cm i tumorski promijenjenim jajnikom veličine 26x22x4 cm glatke vanjske površine. Na presjeku jajnik je bio dijelom solidan, dijelom pseudocističan, kolabiranih prostora bez sadržaja. Intraoperativnom patohistološkom analizom tumora jajnika postavila se dijagnoza karcinoma svjetlih stanica koja je potvrđena i u naknadnim trajnim rezovima. Postoperativno izrezani su i analizirani naknadni trajni rezovi obostranih adneksa, maternice i omentuma u kojima nisu nađene tumorske stanice. Tri mjeseca nakon kirurškog zahvata bolesnica je

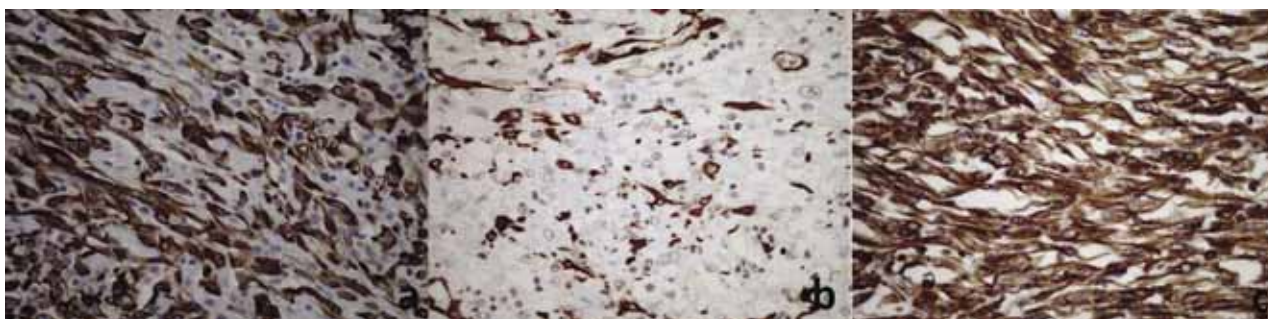


Sl. 3. Patohistološka slika MMMT-a jajnika: a,b) maligne epitelne stanice; a,c) stromalna komponenta (a – povećanje x40; b,c – povećanje x400).

(klon OV-T1 12/30, RTU Dako), Alfa-actin (klon 1A4, 1:50 Dako), Vimentin (klon V9, 1:100 Dako), Calretinin (klon DAK-Calret 1, RTU Dako), Ber-EP4 (poliklonalno, 1:200 Dako), CA125 (klon M11, 1:50 Dako), CD117 (poliklonalno, 1:50 Dako), CD34 (klon QBEnd 10, RTU Dako), GCDFP-15 (klon 23A3, 1:20, Dako), CK20 (klon K_s20.8, RTU, Dako), S-100 (poliklonalno, 1:1000, Dako), BCL2 (klon 124, 1:40, Dako), Desmin (klon D33, 1:200, Dako), ALK Protein (klon ALK1, 1:25, Dako) i WT1 (klon 6F-H2, 1:50, Dako). Histološki tumor je građen od brojnih vretenastih tumorskih stanica, imunohistokemijski CKAE1/AE3, Alfa-actin i Vimentin pozitivne, te se na temelju morfologije i imunohistokemij-

RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Iako etiologija MMMT-a spolnog sustava žena nije poznata, nastanak tumora povezuje se s prethodnim karcinomima dojke povezanih s mutacijama *BRCA1* i *BRCA2* lokusa (8) te s postoperativnom radioterapijom i liječenjem Tamoxifenom kod hormonski ovisnih tumora dojke kao u prikazanom slučaju bolesnice (9,10). Najčešće primarno sijelo MMMT-a je maternica (9,10), rijetko jajnik (1), te tek u nekoliko slučajeva vrat maternice (11). Histološka slika može biti različita, epitelnu komponentu najčešće čini adenokarcinom, endometrioidni ili nediferencirani tip, tek rijetko se spominje



Sl. 4. Imunohistokemijsko bojenje MMMT-a jajnika: a) CKAE1/AE3; b) Alfa actin; c) Vimentin, x400

skog nalaza zaključi da se radi o multifokalnim nodularnim žarištima proliferacije miofibroblasta. Pristupi se reviziji primarnog tumora jajnika te se u dodatnim rezovima trajnih preparata potvrdi, osim već opisane maligne epitelne komponente, i maligna stromalna komponenta tumora (sl. 3 a, b i c).

Imunohistokemijskim bojanjem tumorske stanice epitelne komponente bile su CKAE1/AE3 pozitivne (sl. 4a), CK7 -/+ , a CK20, Ber-EP4, CA125, GCDFP-15, WT1, Calretinin, CD117, CD34, S-100, BCL2, Alfa-actin, Desmin, Vimentin i ALK negativne. Tumorske stanice stromalne komponente bile su Alfa-actin (sl. 4b) i Vimentin pozitivne (sl. 4c).

Konačna dijagnoza odgovarala je malignom miješanom mezodermalnom tumoru jajnika s metastazama stromalne komponente tumora u stijenu debelog crijeva. U tom se slučaju radilo o bolesnici s liječenim invazivnim karcinomom dojke i drugim primarnim tumorom, MMMT-om jajnika. Klinički tijek bolesti bio je izrazito agresivan sa smrtnim ishodom šest mjeseci nakon operacije tumora jajnika.

karcinom svjetlih stanica kao u prikazanom slučaju (12). Opisan je MMMT jajnika sa stanicama prstena pečatnjaka (1) te hormonski ovisni tumori s pozitivnim estrogenskim receptorima i duljim preživljenjem bolesnica (13). Opsežna studija na 40 bolesnica nije pokazala bitne razlike u preživljenju s obzirom na histološki tip maligne stromalne komponente tumora (4).

Kao u prikazanom slučaju, i u drugim studijama autori navode diferencijalno dijagnostičke poteškoće pri postavljanju dijagnoze MMMT-a jajnika jer pri citološkoj punkciji postoji velika mogućnost da se dobije samo jedna komponenta tumora što može dovesti do lažno negativnog nalaza i neprikladnog daljnjeg liječenja bolesnica (14-16). Citologija ascitesa nije pouzdana u postavljanju dijagnoze MMMT-a jajnika zato što se uglavnom nalaze stanice jedne komponente tumora (14,15). Najčešće se dijagnosticira adenokarcinom kao i u prikazanom slučaju (17).

Istraživanja patogeneze invazivnog karcinoma dojke potvrđuju da bolesnice s prisutnim muta-

cijama *BRCA1* i *BRCA2* gena nakon radioterapije te liječenja Tamoxifenom imaju povećani rizik za razvoj drugog primarnog malignog tumora spolnog sustava, te iako veoma rijetko, također i MMMT-a jajnika. Prikaz ovog slučaja potvrđuje navedena istraživanja, te upućuje da u bolesnica s anamnestičkim podacima invazivnog karcinoma dojke koje razviju drugi primarni tumor podrijetla jajnika prilikom postavljanja dijagnoze treba uzeti u razmatranje i MMMT.

L I T E R A T U R A

1. Terada T. Ovarian malignant Mullerian tumor (heterologous whose epithelial component is composed predominantly of signet ring cell carcinoma. *Arh Gynecol Obstet* 2010; jul 23. elektronski medij
2. Brown E, Stuart M, Rye T i sur. Carcinosarcoma of the ovary. 19 years of prospective data from a single center. *Cancer* 2004; 100: 2148-53.
3. Silasi DA, Illuzz JL, Kelly MG i sur. Carcinosarcoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18 (Supl.1): 22-9.
4. Harris M, Delap L, Sengupta P i sur. Carcinosarcoma of the ovary. *Br J Cancer* 2003; 88: 654-57.
5. Gourelly C, All Nafussi A, Abdulkader M, Smith J, Gabra H. Malignant mixed mesodermal tumours: biology and clinical aspects. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1437-46.
6. Bicher A, Levenback C, Silva EG, Burke TW, Morris M, Gerhenson DM. Ovarian malignanat mullerian tumours treated with platinum based chemotherapy. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 735-39.
7. George E, Manivel JC, Dehner LP, Wick MR. Malignant mixed mesodermal tumours: an immunohistochemical study of 47 cases, with histogenetic consideration and clinical corelation. *Hum Pathol* 1991; 22: 215-23.
8. Thai HT, Du F, Tsan Tsou J i sur. Mutations in the BRCA1- asociated ring domain (BARDI) gene in primary breast, ovarian and uterine cancers. *Human Molecular Genetics* 1997; 7: 195-202.
9. Fatiou S, Hatjieleftheriou G, Kyrousis G, Kokka F, Apostolikas N. Long-term tamoxifen treatment: a possible aetiological factor in the development of uterine carcinosarcoma: two case-reports and review of the literature. *Anticancer Res* 2000; 20 (Supl. 3b): 2015-20.
10. Behtash N, Hashemi R, Zarchi KM. Uterine malignancy following Tamoxifen use in breast cancer patients in Iran: case series and literature review. *Asian Pacific J Cancer Prevention* 2009; 10: 163-5.
11. Maheshwari A, Gupta S, Shet T, Wuntka R, Tongaonkar H. Diagnostic dilemma in a case of malignant mixed mullerian tumor of the cervix. *J Surg Oncol* 2006; 4: 36-40.
12. Shy WH, Lee Wh, Lee MC. Malignant mixed Mullerian tumor of the ovary: report of a case report and review of the literature. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1993; 51: 458-73.
13. Geisler JP, Wieman MC, Miller GA, Zhou Z, Geisler HE. Estrogen and progesterone receptors in malignant mixed mesodermal tumors of the ovary. *J Surg Oncol* 1995; 59: 45-7.
14. Silverman JF, Gardner J, Larkin EW, Finley JL, Norris HT. Ascitic fluid cytology in a case of metastatic malignant mixed mesodermal tumor of the ovary. *Acta Cytol* 1986; 30: 173-76.
15. Kato N, Motoyama T. Ascitic fluid cytology of a malignant mixed Müllerian tumor of the peritoneum: a report of two cases with special reference to p53 status. *Diagn Cytopathol* 2009; 37: 281-85.
16. Cryns P, Roothoft NJ, Tialma WA. Malignant mixed müllerian tumor of the ovary and false negative punctures. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 70-2.
17. Murugan P, Siddraju N, Sounbarara J, Havan G, Habeebullah S. Malignant mixed Mullerian tumor in ascitic fluid: A case report with a brief review of literature. *ISPUB. com The Internet J Pathol* 2009; 8: ISSN: 1528-8307.

S U M M A R Y

PRIMARY OVARIAN MALIGNANT MIXED MESODERMAL TUMOR (MMMT) AS A SECOND PRIMARY TUMOR IN A PATIENT WITH INVASIVE BREAST CARCINOMA - CASE REPORT

K. ŠENTIJA¹, I. KRIVAK BOLANČA¹, S. KATALENIĆ SIMON¹, V. KUKURA^{2,4},
A. ŠKRTIĆ^{3,4} and S. GAŠPAROV^{3,4}

¹Merkur University Hospital, Department of Clinical Cytology and Cytogenetics, Division of Gynecological Cytology and Cytogenetics, ²Department of Gynecology and Obstetrics, ³Department of Pathology and Cytology, ⁴University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia

Malignant mixed mesodermal tumor (MMMT) of the ovary is a rare aggressive tumor that consists of an epithelial (carcinoma) and a stromal (sarcoma) component. MMMT accounts for less than 2% of ovarian cancers and has a very poor prognosis. We present a case and difficulties of diagnosing an ovarian MMMT in a postmenopausal woman with a history of invasive breast carcinoma treated postoperatively with radiotherapy and tamoxifen. A 52-year-old patient presented with unilateral ovarian tumor and moderately elevated CA125 (107 U/mL) and underwent laparotomy. Fine needle aspiration of the ovary and ascites for cytologic analysis, and tumor biopsy for histopathology were performed intraoperatively. Intraoperative cytologic sample showed necrotic background with rare single malignant cells with pale, abundant cytoplasm and conspicuous nucleoli suggesting clear cell carcinoma. Ascites sample showed inflammatory and reactive background with suspected papillary formations mimicking adenocarcinoma. Postoperatively, cytochemical PAS staining and immunocytologic staining with epithelial antigen (EA), cytokeratin (CK)7 and vimentin showed EA and PAS positivity for ovarian tumor, and EA and CK7 for ascites, suggesting a clear cell carcinoma. Histology revealed ovarian clear cell carcinoma. Three months later, the patient underwent hemicolectomy because of tumors on the right large bowel serosa with intraoperative morphological finding of metastatic malignant tumor without other specific features. Postoperative morphological analysis and immunohistochemical staining of the tumor revealed two malignant components, epithelial and stromal one. Repeat histologic analysis of the ovarian tumor confirmed ovarian MMMT (with a clear cell carcinoma component). Other studies of breast cancer emphasize that patients with invasive breast cancer and mutations of BRCA1 and BRCA2 genes are at an increased risk of primary ovarian cancer. Our study confirmed it and suggested considering a second primary malignant tumor of ovarian origin in patients with a history of breast carcinoma, postoperatively treated with radiotherapy and tamoxifen. Although rare, second primary ovarian tumors may present as MMMT.

Key words: malignant mixed mesodermal tumor, ovary, second primary tumor, breast cancer, tamoxifen

www.plivamed.net

Receipt **stručnog** usavršavanja.

- ⚡ Bogatstvo vijesti i članaka
- ⚡ Online testovi
- ⚡ PLIVA Vademecum
- ⚡ Stručni skupovi

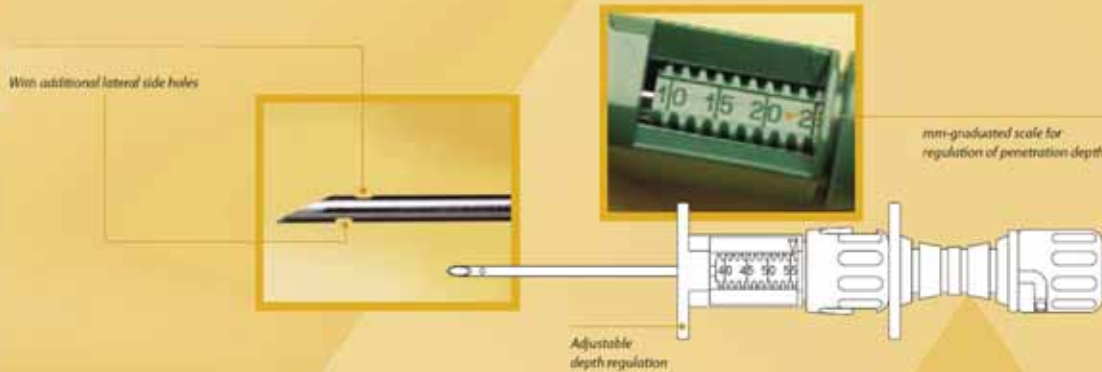


Izmjereno **9000** korisnika!



SOMATEX[®]

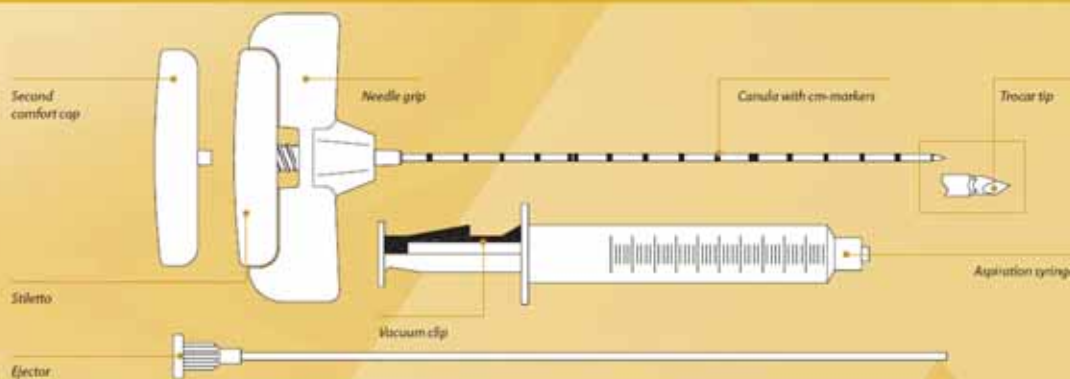
Medical Technologies GmbH



ASPI - CUT PUNCTURE NEEDLE

- made of stainless steel
- graduated scale for exact adjustment of the puncture depth
- adjustable depth stopper
- Luer-Lock Adapter for a safe syringe connection
- sharp tip for atraumatic penetration

Order no.	Gauge	Diameter	Length	Color	Description
181 011	18	1,2 mm	40 mm	pink	-
181 013	15	1,8 mm	40 mm	blue	-
181 015	14	2,1 mm	25 mm	green	With additional lateral side holes
181 016	14	2,1 mm	55 mm	green	With additional lateral side holes



MARROW CUT BIOPSY NEEDLE

- made of most resisting stainless steel
- extremely sharp diamond tip for easy penetration into the marrow cavity
- tapered distal tip
- ergonomically designed handle for sufficient pressure
- second comfort cap
- Luer-Lock connector for secure syringe attachment
- biopsy pusher

Marrow Cut

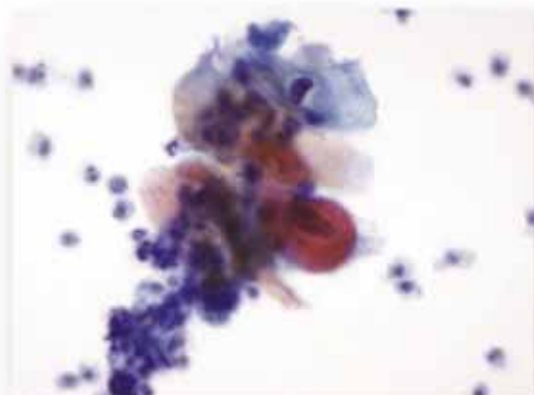
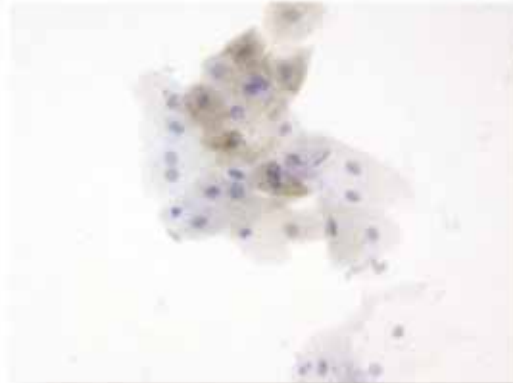
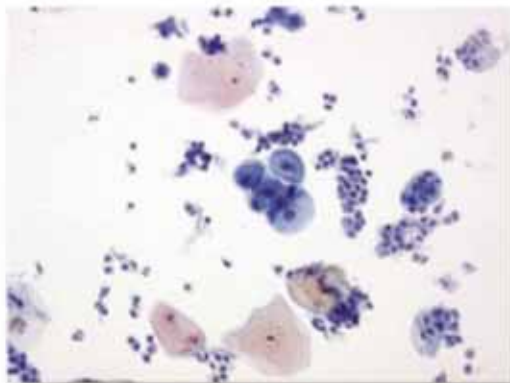
Order no.	Gauge	Diameter	Length
180 980	11	3.0 mm	100 mm
180 990	8	4.0 mm	100 mm
180 995	8	4.0 mm	150 mm



p16^{INK4a}



Heinzlova 15 a
10000 Zagreb, Hrvatska
tel. 01 2396 888
www.aandb.hr





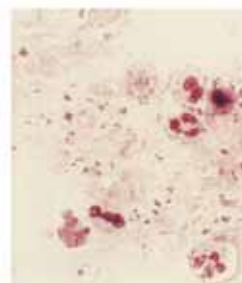
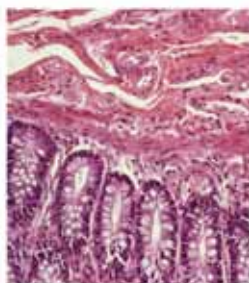
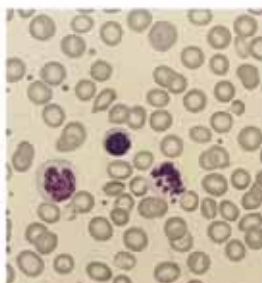
Kvaliteta bez ustupaka i dugogodišnja tradicija naši su aduti!

Već više od 100 godina razvijamo proizvode za mikroskopiju. Široka paleta boja, otopina boja i reagensa za hematologiju, citologiju, histologiju i bakteriologiju konstantno se nadopunjava sukladno potrebama naših kupaca. Uz to vodimo računa o ekološkim zahtjevima, ali i o regulatornim pitanjima.

Sve smo proizvode za mikroskopiju, a koji se koriste za dijagnostiku na uzorcima ljudskog tkiva, prilagodili zahtjevima EU za in-vitro dijagnostičke proizvode i obavili CE registraciju.

Na svakoj etiketi i svakoj uputi za korištenje naših proizvoda pronaći ćete oznake IVD i CE – samo takvi proizvodi garantiraju Vam sigurnost u postavljanju dijagnoza i izvrsnu reproducibilnost rezultata Vašeg laboratorija.

Bez obzira kojim se dijelom stanične dijagnostike bavili, mi imamo prava rješenja za Vas!



Kitovi za enzimsku citokemiju LEUCOGNOST®

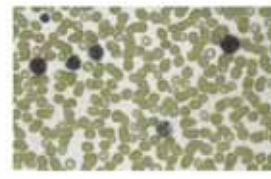
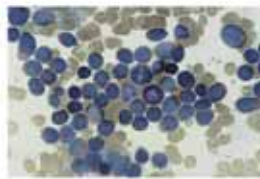
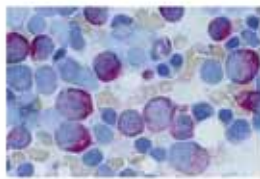
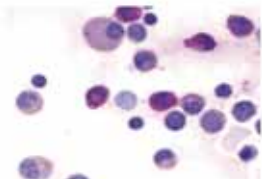
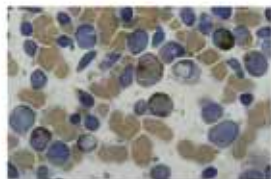
Gotove otopine u setovima za sve često korištene i relevantne metode

Detaljne upute i tehnički podaci dostupni i na hrvatskom jeziku

Sastav i protokol korištenja sukladan međunarodnim standardima

Zaštita korisnika od izlaganja opasnim kemikalijama i poboljšanje standarda kvalitete u laboratoriju

- 116300 LEUCOGNOST® ALPA
- 116301 LEUCOGNOST® EST
- 116302 LEUCOGNOST® PAS
- 116303 LEUCOGNOST® POX
- 116199 LEUCOGNOST® NASDCL
- 116304 LEUCOGNOST® AP
- 116305 LEUCOGNOST® Basis kit
- 112084 HEMATOGNOST Fe®



Više podataka o Merckovim proizvodima potražite na internetu: <http://www.merck-chemicals.com.hr> ili se obratite uredu u Zagrebu. Za komercijalna pitanja molim obratite se ovlaštenom distributeru.

Ovlašteni distributer za Republiku Hrvatsku:

MEDIC d.o.o.

Trg Dražena Petrovića 3/6, 10000 Zagreb

Tel. 01/4800111, 4800107

Fax. 01/4800108

e-mail: medic@medic.hr

MERCK d.o.o.

Andrije Hebranga 32 – 34

HR - 10000 ZAGREB

Tel. 01/4864105, 4864106

Fax. 01/4864191

e-mail: kemija@merckgroup.com

UPUTE AUTORIMA

Časopis ACTA MEDICA CROATICA objavljuje uvodne, izvorne radove, preglede, klinička zapažanja, osvrti, primjere iz kontinuirane medicinske edukacije, sažetke radova s kongresa i simpozija, pisma uredništvu, prikaze knjiga i drugo. Objavljuje i tematske brojeve časopisa uz gosta-urednika. Prihvatanje kategoriziranog članka obvezuje autora da isti članak ne smije objaviti na drugome mjestu bez dozvole Uredništva.

Upute autorima u skladu su s tekstem International Committee of Medical Journals of Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (N Engl J Med 1997; 336: 305-15).

Oprema rukopisa

Članci i svi prilozi dostavljaju se na hrvatskom jeziku u tri istovjetna primjerka i na disketi u Wordu. Rad ne smije imati više od 20 stranica, tipkanih dvostrukim proredom (najviše 30 redaka na jednoj stranici). S obje strane teksta valja ostaviti bijeli rub širine 3,6 cm.

Izvorni radovi sadrže ove dijelove: uvod, cilj rada, metode rada, rezultati, rasprava i zaključci. Uvod je kratak i jasan prikaz problema, cilj sadrži kratak opis svrhe istraživanja. Metode se prikazuju tako da čitatelju omogućuje ponavljanje opisana istraživanja. Poznate se metode ne opisuju, nego se navode izvorni literaturni podaci. Ako se navode lijekovi, rabe se njihova generička imena (u zagradi se može navesti njihovo tvorničko ime). Rezultate treba prikazati jasno i logički, a njihovu značajnost dokazati odgovarajućim statističkim metodama. U raspravi se tumače dobiveni rezultati i uspoređuju s postojećim spoznajama na tom području. Zaključci moraju odgovoriti postavljenom cilju rada.

Naslov rada, puna imena i prezimena autora, ustanova u kojoj je rad napravljen te adresa prvoga autora dostavljaju se na posebnom listu papira.

Sažetak na hrvatskom jeziku prilaže se u obimu od najviše 200 riječi na posebnom listu papira.

Prilog radu je i prošireni strukturirani sažetak (cilj, metode, rezultati, rasprava, zaključak) na engleskom jeziku (Summary) (500-600 riječi) uz naslov rada, inicijale imena i prezime autora te naziv ustanova na engleskom jeziku.

Ispod sažetka (i summary-ja) navode se ključne riječi koje su bitne za brzu identifikaciju i klasifikaciju sadržaja rada.

Tablice se prikazuju na posebnom listu papira. Moraju imati redni broj koji ih povezuje s tekstem i naslov. I svaka slika treba imati svoj redni broj prema redosljedu kojim se pojavljuje u tekstu i ime prvog autora rada. Opis slika (legenda) tiska se također na posebnom listu papira prema svom rednom broju. Fotografije se primaju crno-bijele na sjajnom papiru. Crteži se mogu izraditi tušem na bijelom papiru ili otisnuti na računalnom laserskom ili tinalnom štampaču grafičkim tehnikama visoke rezolucije.

Popis literature

Piše se na posebnom papiru s rednim brojevima prema redosljedu kojim se citat pojavljuje u tekstu. Literatura se citira prema dogovoru postignutom u Vancouveru, a za naslove časopisa treba rabiti kraticu navedenu u Index medicus.

Uz rad je obvezno priložiti izjavu o suglasnosti koautora o publiciranju rada te o nepostojanju sukoba interesa.

Članak u časopisu (navedite sve autore ako ih je 6 ili manje; ako ih je 7 ili više, navedite prva tri i dodajte: i sur.:

Smerdelj M, Pećina M, Hašpl M. Surgical treatment of infected knee contracture after war injury. Acta Med Croatica 2000; 53: 151-5.

Suplement časopisa

Djelmiš J, Ivanišević M, Mrzljak A. Sadržaj lipida u placenti trudnica oboljelih od dijabetesa. Acta Med Croatica 2001; 55 (Supl. 1): 47-9.

Knjige i monografije

Mould RF. Introductory medical statistics. Turnbridge Wells: Pitman Medical, 1976.

Guluyer AY, ur. Health indicators. An international study for the European Science Foundation. Oxford: M. Robertson, 1983.

Poglavlje u knjizi

Weinstein I, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. U: Sodeman WA, ur. Pathologic physiology: mechanism of disease. Philadelphia: WB Saunders, 1974, 457-72.

Disertacija ili magistarski rad

Cigula M. Aktivnosti nekih enzima u humanom serumu kao pokazatelji apsorpcije žive (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet, 1987, str. 127.

Citiranje literature objavljene u elektroničkom formatu Web

Hoffman DI, St John's Wort. 1995; [4 stranice]. Dostupno na URL adresi: <http://www.healthy.net/library/books/hoffman/materiamedical/stjhns.htm>. Datum pristupa informaciji: 16. srpnja 1998.

Morse SS. Factors in the emergence of infectious disease. Emrg Infect Dis [elektronički časopis na internetu] 1995; [24 ekrana/stranice] Dostupno na URL adresi: <http://www.cdc/god/nsidoc/EID/eid.htm>. Datum pristupa informaciji 26. prosinca 1999.

Knjiga na CD-ROM-u

The Oxford English dictionary [knjiga na CD-ROM-u]. II. izdanje. New York, N. Y: Oxford University Press, 1992.

Gershon ES. Antisocial behavior. Arch Gen Psychiatry [časopis na CD-ROM-u]. 1995; 52: 900-1.

Softver (program)

Epi Info [kompjutorski program]. Verzija 6. Atlanta, GA. Center for Disease Control and Prevention, 1994.

Radovi se šalju na adresu Uredništva časopisa. Urednički odbor šalje prispjeli rad na anonimnu recenziju (dva recenzenta). Ako recenzent predlaže promjene ili dopune rada, kopija recenzije dostavlja se autoru radi konačne odluke i ispravka teksta. Autor dobiva probni otisak rada na korekturu.

Uredništvo ne mora radove objavljivati onim redom kojim pristižu.

Rukopisi se ne vraćaju.

NOTES FOR CONTRIBUTORS

ACTA MEDICA CROATICA publishes leading articles/editorials, original articles, reviews, case reports, annotations, examples of continuing medical education, abstracts from congresses and symposia, letters to the Editor, book reviews and other contributions. Issues dedicated to a topic chosen by guest-editors are also published. All manuscripts should be written in Croatian. Acceptance of a categorized manuscript precludes its submission/publication elsewhere.

Manuscript preparation

All manuscripts should be submitted in Croatian in three hard copies and on diskette in Word. Original papers should not exceed 20 double space pages (maximum 30 lines *per* page).

Original papers should contain: Introduction, Objective(s), Methods, Results, Discussion and Conclusions. In the Introduction section, the issue should be clearly and concisely presented. In Objective(s), the aim of the study is briefly described. In the Methods section, the methodology, apparatus and procedures used in the study should be identified in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Widely known methods need not be described but original references should be used. For drugs, generic names should be used (trade names can be mentioned in parentheses). Results should be clearly and logically presented, and their significance should be demonstrated by appropriate statistical methods. In Discussion the results obtained are discussed against the existing state of the art. Conclusions should correspond with the aim(s) set in the Objective(s).

The title, first and last name(s) of the author(s), institution(s) and address of the corresponding author should be submitted on a separate sheet of paper.

Synopsis written in Croatian should contain maximum 200 words on a separate sheet of paper.

Typescript should contain extended structured [Objective(s), Methods, Results, Discussion, Conclusion(s)] abstract (500-600 words) with title of the manuscript, initials of authors' first name(s), full last name(s) and institution(s) in English.

Below the Abstract, key words that will assist indexers in cross indexing the article should be provided.

Each table is presented on a separate sheet. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. The same applies to figure legends. On the back of each figure put the name of the first author, the figure number and the «top», preferably with a soft pencil. Black-and-white glossy photographs should be submitted. Drawings should be made by Indian ink on white paper or printed by laser or ink jet printer using high resolution graphic techniques.

References are submitted on separate pages in the numbered sequence following their mention in the text. References are cited according to the «Vancouver style» proposed by the International Committee of Medical Journals Editors (N Engl J Med 1991; 324: 421-8 and BMJ 1991; 302: 338-41). The titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus.

The manuscript must be accompanied by a statement on all authors' agreement on paper publication as well as on nonexistence of conflict of interest.

Article in the journal (if where are six or less authors, they should all be mentioned; if there are seven or more authors, the first three should be mentioned and the «*et al.*» should be added.

Example: Smerdelj M, Pećina M, Hašpl M. Surgical treatment of infected knee contracture after war injury. Acta Med Croatica 2000; 53: 151-5.

Supplement

Djelmiš J, Ivanišević M, Mrzljak A. Sadržaj lipida u placenti trudnica oboljelih od dijabetesa. Acta Med Croatica 2001; 55 (Supl. 1): 47-9.

Books and monographs

Mould RF. Introductory medical statistics. Turnbridge Wells: Pitman Medical, 1976.

Guluyer AY, ur. Health indicators. An international study for the European Science Foundation. Oxford: M. Robertson, 1983.

Chapter (of a book)

Weinstein I, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. U: Sodeman WA, ur. Pathologic physiology: mechanism of disease. Philadelphia: WB Saunders, 1974, 457-72.

Disertation or MA Thesis

Cigula M. Aktivnosti nekih enzima u humanom serumu kao pokazatelji apsorpcije žive (disertacija). Zagreb: Medicinski fakultet, 1987, str. 127.

Citation of literature published in electronic format Web, Electronic journal, Book on CD-ROM, Journal on CD-ROM, Softver (program)

Examples done in Notes for Contributors in Croatian (preceding page).

Manuscripts should be sent to the Address of the Editorial Board. Upon the receipt, the manuscript is forwarded by Editorial Board for anonymous review (two reviewers). If changes or amendments of the manuscript are proposed by the reviewer(s), a copy of the reviewer's report is sent to the author for final correction of the text. Galley proofs are sent to the author for correction.

The Editorial Board is not obliged to publish the manuscripts in order of their receipt and acceptance.

Manuscripts are not returned to the authors.

acta medica croatica

The Journal of the Academy of Medical Sciences of Croatia
Acta Med Croatica • Vol. 65 (Supl. 1) • pp 1-244 Zagreb, September 2011

Table of Contents

Forwords

- 3 Annotation to the history of Merkur University Hospital and to the development of clinical cytology in Merkur University Hospital**
Ž. Vidas
- 5 Perception of cytology from the clinician standpoint**
B. Jakšić
- 11 55 years of clinical cytology in Zagreb – 55 reasons for anniversary**
I. Kardum-Skelin, I. Krivak Bolanča, M. Šunjić Stakor
- 15 50 years of the Laboratory for Gynecologic Cytology and Clinical Genetics**
E. Đordijevski, I. Krivak Bolanča

Editorial

- 17 Why is cytology a profession (branch), not a method?
Ten rules for success of the cytology profession**
I. Kardum-Skelin

Original Articles

- 23 The purpose of clinical laboratory accreditation in transplantation medicine**
Z. Flegar-Meštrić, A. Nazor, S. Perkov, B. Šurina, Z. Šiftar, I. Ožvald, Ž. Vidas
- 31 The unclassifiable myeloproliferative neoplasm – morphological, cytogenetic and clinical features**
A. Borovečki, A. Škrtić, M. M. Kardum Paro, R. Lasan, M. Dominis
- 37 Post-transplant lymphoproliferative disease in liver transplant recipients – Merkur University Hospital single center experience**
T. Filippec-Kanižaj, J. Budimir, V. Čolić-Cvrlje, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, S. Naumovski-Mihalić, A. Mrzljak, S. Ostojić Kolonić, N. Sobočan, T. Bradić, Z. Mišetić Dolić, B. Kocman, M. Katičić, S. Židovec-Lepej, A. Vince
- 45 Diagnostic and prognostic significance of CD45 cell surface antigen expression in hematologic malignancies with main focus on acute leukemias**
Nj. Gredelj-Šimec, B. Jelić-Puškarčić, A. Ostojić, Z. Šiftar, D. Fiala, I. Kardum-Skelin, R. Vrhovac, B. Jakšić
- 53 P16NIK4A expression in premalignant cervical lesions**
I. Krivak Bolanča, S. Katalenić Simon, K. Šentija, Ž. Duić, V. Kukura, G. Zovko, J. Valetić, J. Vraneš
- 59 Standardization in laboratory hematology by participating in external quality assurance programs**
A. Nazor, Z. Šiftar, Z. Flegar-Meštrić
- 67 Association of CD34 cell surface antigen expression with cytomorphological characteristics of acute promyelocytic leukemia blasts and clinical characteristics of patients: one center experience**
A. Ostojić, M. Pažur, Z. Šiftar, M. M. Kardum Paro, B. Jelić-Puškarčić, Nj. Gredelj-Šimec, D. Radić-Krišto, I. Kardum-Skelin, R. Vrhovac, B. Jakšić
- 75 Flow cytometry and acute renal rejection confirmed by histopathologic analysis**
Z. Šiftar, I. Sokolić, M. M. Kardum Paro, A. Nazor, M. Knotek, M. Sabljar-Matovinović, Ž. Vidas, Z. Flegar-Meštrić
- 81 Fine needle aspirate of lymph node as the analytical sample for immunophenotyping**
V. Švencbir, V. Anić, Z. Šiftar, M. M. Kardum Paro, S. Ostojić Kolonić, I. Krivak Bolanča, I. Kardum-Skelin

Reviews

- 89 Recollections of the development of clinical cytology at Merkur University Hospital**
I. Črepinko
- 101 Education of cytotechnologists – are we satisfied with what we had, we have, and what we want?**
V. Anić, I. Kardum-Skelin
- 105 Significance of participation in programs of external quality assessment in molecular diagnostic - our experience**
M. M. Kardum Paro, Z. Šiftar, D. Juretić, Z. Flegar-Meštrić

Clinical Observations

115 Causes and frequency of unsatisfactory cervicovaginal smears

Lj. Gavranović, S. Rakek Novak, I. Krivak Bolanča

121 Erythrocyte morphology in urine determined by light microscopy in patients with bladder cancer

G. Knežević, K. Parigros, B. Križaj, V. Anić, M. Pažur, B. Jelić-Puškaric, D. Šušterčić, I. Kardum-Skelin

Case Reports

127 Acute plastiv bronchitis – case report

G. Cavrić, S. Naumovski-Mihalić, I. Kardum-Skelin, S. Džebro, B. Jelić-Puškaric, D. Šušterčić, B. Škurla, I. Premužić Meštrović, T. Filipeć-Kanižaj, I. Prkačin, D. Bartolek, K. Jurić, D. Mosler

133 Isolated myeloid sarcoma involving the mediastinum

B. Jelić-Puškaric, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, M. Pažur, R. Vrhovac, D. Radić-Krišto, Nj. Gredelj-Šimec, D. Obad Kovačević, J. Plaščak, S. Gašparov, B. Jakšić

139 Antiaggregation therapy after percutaneous coronary intervention in a patient with thrombocytopenia – case report

H. Jerkić, T. Letilović, K. Narančić Skorić, B. Skorić, I. Premužić Meštrović, D. Počanić, D. Kozmar, S. Kranjčević

143 Clear cell carcinoma of the endometrium confined to atrophic endometrial polyp – case report

S. Katalenić Simon, I. Krivak Bolanča, K. Šentija, G. Zovko, M. Podgajski, J. Valetić, A. Škrtić

149 Hepatocellular carcinoma initially diagnosed by fine needle aspiration cytology of the pelvic bone metastasis

B. Kocman, I. Kardum-Skelin, T. Filipeć-Kanižaj, A. Mrzljak, S. Naumovski-Mihalić, Ž. Vidas, D. Obad Kovačević, I. Kocman

155 Multifocal epitheloid hemangioendothelioma treated by liver transplantation – case report

B. Kocman, I. Kardum-Skelin, T. Filipeć-Kanižaj, D. Škegro, Ž. Vidas, S. Jadrijević, V. Čolić-Cvrlje

161 Preoperative diagnosis of Fallopian tube carcinoma by cytology

I. Krivak Bolanča, V. Fenzl, V. Kukura

167 Extramedullary multiple myeloma of the colon – case presentation and literature review

I. Mandac Rogulj, B. Aćamović, T. Filipeć-Kanižaj, S. Gašparov, D. Radić-Krišto, A. Planinc-Peraica, E. Čorović-Arneri, S. Ostojić Kolonić

173 Multiple myeloma in a patient with chronic lymphocytic leukemia – case report and literature review

I. Mandac Rogulj, D. Radić-Krišto, V. Milunović, S. Ostojić Kolonić, B. Jelić-Puškaric, A. Planinc Peraica

179 Acute renal failure as first manifestation of B-CLL

I. Mandac Rogulj, I. Prkačin, M. Sabljarić-Matovinović, D. Galešić Ljubanović, D. Šušterčić

183 Erythroblasts in the peripheral blood of adult patient as an adverse prognostic sign – case report

D. Mosler, G. Cavrić, S. Naumovski-Mihalić, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, B. Jelić-Puškaric, I. Prkačin, I. Premužić Meštrović, T. Bračić, A. Nazor, E. Lazić Mosler

189 Needle tract seeding of hepatocellular carcinoma after liver transplantation

A. Mrzljak, I. Kardum-Skelin, D. Blašković, D. Škegro, S. Jadrijević, V. Čolić-Cvrlje

197 Long-term indolent course of pleomorphic mantle cell lymphoma with multiple chromosomal abnormalities

M. Pažur, A. Ostojić, B. Jelić-Puškaric, I. Kardum-Skelin, R. Vrhovac, S. Gašparov, R. Lasan Trčić, B. Jakšić

203 Disseminated aspergillosis in a patient with simultaneous pancreas and kidney transplant

A. Piljac, D. Fiala, I. Prkačin, D. Škegro, I. Kovačević Vojtušek, S. Gracin, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, M. Sabljarić-Matovinović, M. Knotek

207 Bilateral pleural effusion as first manifestation of multiple myeloma

D. Radić-Krišto, S. Ostojić Kolonić, I. Kardum-Skelin, I. Mandac Rogulj, R. Vrhovac, A. Planinc-Peraica

213 Pleural mesothelioma – case report

I. Premužić Meštrović, M. Dragičević, D. Mosler, T. Meštrović, E. Lazić Mosler, D. Kozmar, S. Kranjčević, D. Počanić, G. Cavrić, K. Narančić Skorić, T. Letilović, H. Jerkić, H. Zeljko, I. Kardum-Skelin

217 Secondary (AA) renal/bone amyloidosis complicating rheumatoid arthritis

I. Prkačin, B. Škurla, D. Počanić, T. Bulum, S. Bulimbašić, I. Kardum-Skelin

223 Hyperhemolytic syndrome in a patient without hemoglobinopathies

I. Prkačin, J. Mesarić, G. Cavrić, S. Jurenec, Ž. Hundrić-Hašpl, I. Kardum-Skelin

229 Primary ovarian malignant mixed mesodermal tumor (MMMT) as a second primary tumor in a patient with invasive breast carcinoma

K. Šentija, I. Krivak Bolanča, S. Katalenić Simon, V. Kukura, A. Škrtić, S. Gašparov

244 Notes for Contributors

acta medica croatica

Časopis Akademije medicinskih znanosti Hrvatske
Acta Med Croatica • Vol. 65 (Supl. 1) • Str. 1-244 Zagreb, rujan 2011.

Sadržaj

Predgovori

- 3 Osvrt na povijest Kliničke bolnice Merkur i razvoj kliničke citologije u Kliničkoj bolnici Merkur**

Ž. Vidas

- 5 Pogled na citologiju kroz naočale kliničara**

B. Jakšić

- 11 55 godina citologije u KB Merkur Zagreb – 55 razloga za obljetnicu**

I. Kardum-Skelin, I. Krivak Bolanča, M. Šunjić Stakor

- 15 50 godina Laboratorija za ginekološku citologiju i kliničku genetiku**

E. Đordijevski, I. Krivak Bolanča

Uvodnik

- 17 Zašto je citologija struka, a ne metoda? Deset pravila za uspješnost citološke struke**

I. Kardum-Skelin

Izvorni radovi

- 23 Značenje akreditacije kliničkih laboratorija u transplantacijskoj medicini**

Z. Flegar-Meštrić, A. Nazor, S. Perkov, B. Šurina, Z. Šiftar, I. Ožvald, Ž. Vidas

- 31 Neklasificirana mijeloproliferativna neoplazma – morfološke, citogenetske i kliničke karakteristike**

A. Borovečki, A. Škrtić, M. M. Kardum Paro, R. Lasan, M. Dominis

- 37 Post-transplantacijska limfoproliferativna bolest u bolesnika s transplantacijom jetre – iskustvo KB Merkur**

T. Filipec-Kanižaj, J. Budimir, V. Čolić-Cvrle, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, S. Naumovski-Mihalić, A. Mrzljak, S. Ostojić Kolonić, N. Sobočan, T. Bradić, Z. Mišetić Dolić, B. Kocman, M. Katičić, S. Židovec-Lepej, A. Vince

- 45 Dijagnostičko i prognostičko značenje izražaja biljega CD45 u hematološkim zloćudnim bolestima s posebnim osvrtom na akutne leukemije**

Nj. Gredelj-Šimec, B. Jelić-Puškarčić, A. Ostojić, Z. Šiftar, D. Fiala, I. Kardum-Skelin, R. Vrhovac, B. Jakšić

- 53 Ekspresija staničnog proteina P16INK4A kod premalignih promjena vrata maternice**

I. Krivak Bolanča, S. Katalenić Simon, K. Šentija, Ž. Duić, V. Kukura, G. Zovko, J. Valetić, J. Vranes

- 59 Standardizacija u laboratorijskoj hematologiji sudjelovanjem u programima vanjske procjene kvalitete**

A. Nazor, Z. Šiftar, Z. Flegar-Meštrić

- 67 Povezanost izražaja biljega CD34 s morfološkim značajkama blasta u akutnoj promijelocitnoj leukemiji i kliničkim značajkama oboljelih: iskustvo jednog centra**

A. Ostojić, M. Pažur, Z. Šiftar, M. M. Kardum Paro, B. Jelić-Puškarčić, Nj. Gredelj-Šimec, D. Radić-Krišto, I. Kardum-Skelin, R. Vrhovac, B. Jakšić

- 75 Protočna citometrija i akutno odbacivanje bubrega dokazano patohistološkim nalazom**

Z. Šiftar, I. Sokolić, M. M. Kardum Paro, A. Nazor, M. Knotek, M. Sabljar-Matovinović, Ž. Vidas, Z. Flegar-Meštrić

- 81 Punktat limfnog čvora kao analitički uzorak za fenotipizaciju stanica**

V. Švenčbir, V. Anić, Z. Šiftar, M. M. Kardum Paro, S. Ostojić Kolonić, I. Krivak Bolanča, I. Kardum-Skelin

Pregledi

- 89 Sjećanja na razvoj kliničke citologije u Kliničkoj bolnici Merkur**

I. Črepinko

- 101 Edukacija citotehnologa – jesmo li zadovoljni s onim što smo imali, što imamo, a što bismo željeli?**

V. Anić, I. Kardum-Skelin

- 105 Značenje sudjelovanja u programima vanjske procjene kvalitete u molekularnoj dijagnostici - vlastita iskustva**

M. M. Kardum Paro, Z. Šiftar, D. Juretić, Z. Flegar-Meštrić

Klinička zapažanja

- 115 Nezadovoljavajući uzorci i njihova učestalost u cervikovaginalnim razmazima**
Lj. Gavranović, S. Rakek Novak, I. Krivak Bolanča
- 121 Podrijetlo eritrocita u urinu određivano svjetlosnim mikroskopom kod bolesnika s karcinomom mokraćnog mjehura**
G. Knežević, K. Parigros, B. Križaj, V. Anić, M. Pažur, B. Jelić-Puškarčić, D. Šušterčić, I. Kardum-Skelin

Prikazi bolesnika

- 127 Akutni odljevni bronhitis – prikaz bolesnika**
G. Cavrić, S. Naumovski-Mihalić, I. Kardum-Skelin, S. Džebro, B. Jelić-Puškarčić, D. Šušterčić, B. Škurla, I. Premužić Meštrović, T. Filipec-Kanižaj, I. Prkačin, D. Bartolek, K. Jurić, D. Mosler
- 133 Izolirani mijeloidni sarkom medijastinuma**
B. Jelić-Puškarčić, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, M. Pažur, R. Vrhovac, D. Radić-Krišto, Nj. Gredelj-Šimec, D. Obad Kovačević, J. Plaščak, S. Gašparov, B. Jakšić
- 139 Antiagregacijska terapija nakon perkutane koronarne intervencije kod bolesnika s trombocitopenijom – prikaz bolesnika**
H. Jerkić, T. Letilović, K. Narančić Skorić, B. Skorić, I. Premužić Meštrović, D. Počanić, D. Kozmar, S. Kranjčević
- 143 Endometralni karcinom svijetlih stanica u atrofičnom endometralnom polipu – prikaz bolesnice**
S. Katalenić Simon, I. Krivak Bolanča, K. Šentija, G. Zovko, M. Podgajski, J. Valetić, A. Škrtić
- 149 Hepatocelularni karcinom primarno dijagnosticiran citološkom punkcijom metastatskog procesa u zdjeličnoj kosti**
B. Kocman, I. Kardum-Skelin, T. Filipec-Kanižaj, A. Mrzljak, S. Naumovski-Mihalić, Ž. Vidas, D. Obad Kovačević, I. Kocman
- 155 Multifokalni epitelioidni hemangioendoteliom jetre liječen ortotopnom transplantacijom jetre – prikaz bolesnika**
B. Kocman, I. Kardum-Skelin, T. Filipec-Kanižaj, D. Škegro, Ž. Vidas, S. Jadrijević, V. Čolić-Cvrlje
- 161 Preoperativna citološka dijagnoza karcinoma jajovoda – prikaz bolesnice**
I. Krivak Bolanča, V. Fenzl, V. Kukura
- 167 Ekstramedularna infiltracija kolona u bolesnika s multiplim mijelomom – prikaz bolesnika i pregled literature**
I. Mandac Rogulj, B. Aćamović, T. Filipec-Kanižaj, S. Gašparov, D. Radić-Krišto, A. Planinc-Peraica, E. Čorović-Arneri, S. Ostojić Kolonić
- 173 Multipli mijelom u bolesnika s dugogodišnjom kroničnom limfocitnom leukemijom – prikaz bolesnika i pregled literature**
I. Mandac Rogulj, D. Radić-Krišto, V. Milunović, S. Ostojić Kolonić, B. Jelić-Puškarčić, A. Planinc-Peraica
- 179 Akutno zatajenje bubrega kao prva manifestacija kronične limfocitne leukemije**
I. Mandac Rogulj, I. Prkačin, M. Sabljarić-Matovinović, D. Galešić Ljubanović, D. Šušterčić
- 183 Eritroblasti u perifernoj krvi odraslog bolesnika kao nepovoljan prognostički predznak – prikaz bolesnika**
D. Mosler, G. Cavrić, S. Naumovski-Mihalić, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, B. Jelić-Puškarčić, I. Prkačin, I. Premužić Meštrović, T. Bradić, A. Nazor, E. Lazić Mosler
- 189 Presadba hepatocelularnog karcinoma uzduž bioptičkog kanala igle nakon transplantacije jetre**
A. Mrzljak, I. Kardum-Skelin, D. Blašković, D. Škegro, S. Jadrijević, V. Čolić-Cvrlje
- 197 Dugogodišnji indolentni tijek pleomorfog limfoma plaštene zone s multiplim kromosomskim abnormalnostima**
M. Pažur, A. Ostojić, B. Jelić-Puškarčić, I. Kardum-Skelin, R. Vrhovac, S. Gašparov, R. Lasan Trčić, B. Jakšić
- 203 Diseminirana aspergiloza u bolesnice s transplantiranim bubregom i gušteračom**
A. Piljac, D. Fiala, I. Prkačin, D. Škegro, I. Kovačević Vojtušek, S. Gracin, I. Kardum-Skelin, D. Šušterčić, M. Sabljarić-Matovinović, M. Knotek
- 207 Bilateralni pleuralni izljev kao prva manifestacija multiplog mijeloma**
D. Radić-Krišto, S. Ostojić Kolonić, I. Kardum-Skelin, I. Mandac Rogulj, R. Vrhovac, A. Planinc-Peraica
- 213 Mezoteliom pleure – prikaz bolesnika**
I. Premužić Meštrović, M. Dragičević, D. Mosler, T. Meštrović, E. Lazić Mosler, D. Kozmar, S. Kranjčević, D. Počanić, G. Cavrić, K. Narančić Skorić, T. Letilović, H. Jerkić, H. Zeljko, I. Kardum-Skelin
- 217 Sekundarna amiloidoza (AA) bubrega i koštane srži u bolesnice s reumatoidnim artritisom**
I. Prkačin, B. Škurla, D. Počanić, T. Bulum, S. Bulimbašić, I. Kardum-Skelin
- 223 Sindrom hiperhemolize u bolesnice bez hemoglobinopatije**
I. Prkačin, J. Mesarić, G. Cavrić, S. Jurenec, Ž. Hundrić-Hašpl, I. Kardum-Skelin
- 229 Maligni miješani mezodermalni tumor jajnika (MMMT) – drugi primarni tumor u bolesnice s invazivnim karcinomom dojke**
K. Šentija, I. Krivak Bolanča, S. Katalenić Simon, V. Kukura, A. Škrtić, S. Gašparov
- 243 Upute autorima**