



Zdravniški vestnik

GLASILO SLOVENSKEGA ZDRAVNIŠKEGA DRUŠTVA ZDRAV VESTN, LETNIK 67, MAJ 1998, str. 1-76, Supl. I

40 LET KLINIČNE HEMATOLOGIJE V LJUBLJANI

VSEBINA

UVODNIK

40 let klinične hematologije v Ljubljani, P. Černelč I-1

PRISPEVKI

Presaditev kostnega mozga - njen razvoj in možnosti, E. D. Thomas I-3

Zdravljenje kronične limfocitne levkemije in ne-Hodgkinovih limfomov s fludarabinom, C. Rozman I-5

Avtologna transplantacija krvotvornih matičnih celic pri zdravljenju akutnih levkemij, B. Labar, D. Nemet, M. Mrsič, V. Bogdanič, D. Batinič, B. Golubič-Čepulič, M. Petrovečki, I. Radman, I. Aurer, D. Sertič I-9

Naše izkušnje pri zdravljenju bolnikov s kronično mieloično ter akutno levkemijo z alogenično presaditvijo krvotvornih matičnih celic, J. Pretnar, S. Zver, M. Benedik-Dolničar I-11

Avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic pri otrocih s solidnimi tumorji in naše izkušnje, M. Benedik-Dolničar, J. Anžič I-15

Zdravljenje solidnih tumorjev odraslih z zelo velikimi odmerki citostatikov in avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic, B. Zakotnik, B. Pajk, J. Pretnar I-19

Zdravljenje napredovane kronične limfocitne levkemije s fludarabinom, P. Černelč I-23

Zdravljenje bolnikov z dlakasto celično levkemijo s kladribinom, U. Mlakar I-27

Koncentracija eritropoetina v serumu pri bolnikih z diseminiranim plazmocitomom pred začetkom zdravljenja, U. Mlakar I-31

Naše izkušnje pri zdravljenju akutne nelimfoblastne levkemije odraslih s protokolom AML 10, M. Modic I-35

Naše izkušnje pri zdravljenju akutne mieloblastne levkemije s kladribinom pri starejših bolnikih, S. Zver, J. Pretnar I-39

Mieloplastični sindrom s pridobljeno korpuskularno hemolitično anemijo in kasnejšim prehodom v AML - prikaz primera, U. Mlakar I-43

Zdravljenje čiste aplastične anemije pri bolniku s kronično limfocitno levkemijo, M. Bervar, P. Černelč I-47

Določanje števila retikulocitov v krvi s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom, I. Preložnik-Zupan I-51

Določanje antigenov CD62P in CD63 s pretočnim citometrom za oceno aktiviranih trombocitov, J. Kralj I-57

Določanje protiteles proti trombocitom pri kronični idiopatični trombocitopenični purpuri s pretočnim citometrom, D. Žontar, P. Černelč I-61

Odnos med koncentracijo heparina v plazmi in motnjo v koagulaciji: Zdravljenje s heparinom med hemodializo, Z. Čede, A. Andoljšek I-65

Kronična mieloična levkemija in molekularno genetični načini ugotavljanja bolezni, T. Pajič, P. Černelč I-69

Spremembe števila in prostornine trombocitov pri idiopatični trombocitopenični purpuri, M. Tomažič, D. Andoljšek I-73

Zdravniški vestnik

Glavni urednik/Editor-in-Chief:

J. Drinovec

Odgovorni urednik/Responsible Editor:

M. Janko

Urednika/Editors:

M. Cevc, P. Dolenc

Sourednik/Co-Editor:

P. Černelč

Uredniški svet/Editorial Council:

P. Kapš (predsednik/president),
I. Švab (namestnik predsednika/vice-president),
J. Bedernjak, F. Dolšek, J. Drinovec, M. Janko, M. Jereb
I. Kapelj, V. Kostevc-Zorko, F. Košir, M. F. Kenda,
S. Levak-Hozjan, V. Petrič, A. Prijatelj, P. Rode, B. Šalamun,
Z. Turk, F. Urlep, T. Vahtar, F. Verovnik, G. Voga, M. Žargi

Uredniški odbor/Editorial Board:

B. R. Binder, Dunaj - Avstrija, B. Brinkmann, Münster - Nemčija, V. Dolenc,
D. Ferluga, S. Herman, S. Julius, Ann Arbor - ZDA, M. Jung, Zürich - Švica, P.
Kapš, D. Keber, M. Kordaš,
I. Krajnc, G. J. Krejs, Graz - Avstrija, G. Lešničar, M. Likar, J. Milič,
Montreal - Kanada,
A. P. Monaco, Harvard - ZDA, D. Pokorn, S. Primožič, M. Rode,
E. Stålberg, Uppsala - Švedska,
J. Šorli, J. Trontelj, B. Vrhovac, Zagreb - Hrvaška, B. Žekš

Poslovna tajnica uredništva/Secretary of the Editorial Office:

K. Jovanovič

Lektorja za slovenščino/Readers for Slovenian:

J. Faganel, T. Korošec

Lektor za angleščino/Reader for English:

A. Snedec

Naslov uredništva in uprave/**Address of the Editorial Office and Administration:**

1000 Ljubljana, Komenskega 4, tel. (061) 317-868

Domača stran na Internetu/Internet Home Page:

<http://vestnik.szd.si/>

Tekoči račun pri/Current Account with

LB 50101-678-48620

UDK 61+614.258(061.1)=863=20
CODEN: ZDVEEB ISSN 1318-0347

To revijo redno indeksirajo in/ali abstrahirajo:
Biological Abstracts, Biomedicina Slovenica,
BIOSIS, Medlars

Zdravniški vestnik izhaja praviloma vsak mesec.
Letna naročnina za člane SZD je vključena v članarino.

To številko so financirali:

Ministrstvo za znanost in tehnologijo in
Ministrstvo za zdravstvo, Zavod za zdravstveno zavarovanje R Slovenije
Po mnenju Urada vlade RS za informiranje št. 4/3-12-1388/95-23/294
šteje Zdravniški vestnik med proizvode, za katere se plačuje
5% davek od prometa proizvodov.

- Tisk Tiskarna JOŽE MOŠKRIČ d. d., Ljubljana - Naklada 4100 izvodov

The Journal appears regularly every month.
Yearly subscription for members of the Slovene Medical Society
is included in the membership amounting.
The issue is subsidized by Ministry for Research and Technology,
Ministry for Health

- Printed by Tiskarna JOŽE MOŠKRIČ d. d., Ljubljana - Printed in 4100 copies

Uvodnik/Leading article

40 LET KLINIČNE HEMATOLOGIJE V LJUBLJANI

Razvoj laboratorijskih preiskav in zahtevnejši načini zdravljenja bolezni krvi in krvotvornih organov v svetu in pri nas so zahtevali specializacijo tako delavcev v laboratoriju kot zdravnikov internistov in tako omogočili nastanek klinične hematologije.

Ustanovitev koagulacijskega laboratorija, uvedba citološkega pregleda kostnega mozga in začetek zdravljenja hemoblastoz s citostatiki so bili temelji za začetek klinične hematologije v Ljubljani pred 40 leti.

Ustanovitev Hematološke in transfuziološke sekcije Slovenije leta 1964 je doprinesla k hitrejšemu razvoju in povezanosti klinične hematologije v Sloveniji.

Ustanovitev Hematološke službe na Interni kliniki leta 1966 je ob vse bolj zapletenih načinih ugotavljanja in zdravljenja malignih hemoblastoz omogočila ustrežnejšo in učinkovitejšo obravnavo bolnikov.

Po preimenovanju Hematološke službe v Hematološko kliniko leta 1978 zasledimo usmeritve znotraj klinike, ki jo sestavljajo enota za anemije, enota za hemoblastoze, enota za hemostazo, hematološka ordinacija ter aseptična ordinacija in specializirani hematološki laboratoriji. Slednji so imeli sprva laboratorij za hemostazo za osnovne in specialne preiskave s tega področja ter citološki laboratorij. Nekaj let kasneje je nastal imunološki laboratorij, kjer izvajamo imunološke preiskave za opredelitev levkemičnih in limfomskih celic ter oceno imunskega odziva. Leta 1997 pa je nastal molekularno genetični laboratorij. V specializiranih hematoloških laboratorijih danes izvajamo preiskave za celoten Klinični center, nekatere pa za vso Slovenijo.

Za strokovni razvoj posamezne enote je zadolžen zdravnik, ki se s tem področjem ukvarja ter specialist medicinske biokemije, kemik oziroma biolog, ki zagotavljajo skupaj z laboratorijskimi tehnikami uvajanje ter kvalitetno izvajanje preiskav, kar potrjujejo pridobljeni atesti mednarodne kontrole kvalitete za laboratorije (IN-STAND).

Ob koncu 60. let smo uvedli citokemična barvanja predvsem za opredelitev akutnih levkemij. V drugi polovici 70. let smo sledili razvoju imunoloških metod v svetu in uvedli sprva določanje podvrst limfocitov, nato pa levkemičnih in limfomskih celic s pomočjo membranskih označevalcev in pretočnega citometra, ki je postala ena od najpomembnejših preiskav specializiranega imunološkega laboratorija. Ob koncu 70. let smo začeli s kultiviranjem matičnih celic v poltrdem agarju za ugotavljanje prizadeti usmerjenih krvotvornih matičnih celic. Poleg tega smo neprestano izpopolnjevali in uvajali nove laboratorijske preiskave s področja hemostaze za potrebe celotnega Kliničnega centra, ki jim že od začetka 70. let dodamo strokovno mnenje hematologa.

Letos smo uspeli uvesti molekularno genetične preiskave, ki jih uporabljamo za ugotavljanje klona pri kronični mieločni levkemiji in preostale levkemije po zdravljenju s citostatiki (minimal residual disease). Predvsem slednje nam omogoča natančno oceniti uspeh zdravljenja in izbrati za presaditev krvotvornih matičnih celic tiste bolnike v klinični remisiji levkemije, ki imajo v kostnem mozgu še levkemični klon celic.

V aseptični ordinaciji izvajamo posege, kot so punkcije in biopsije organov, uvajanje osrednjih venskih katetrov ter redno nego in nadzor bolnikov z osrednjimi venskimi katetri.

Vse intenzivnejše citostatično zdravljenje, ki še poveča nevtropenijo in pomanjkljivo imunsko odzivnost pri bolnikih z akutno levkemijo ter s kroničnimi limfomi visoke stopnje malignosti, nas je spodbudilo v začetku 70. let k preureditvi nekaj navadnih bol-

niških sob v »aseptične«. Z osamitvijo bolnikov in posebnim načinom nege smo izboljšali uspehe zdravljenja.

Dolgoletne izkušnje pri zdravljenju bolnikov s hudo nevtropenijo in pomanjkljivo imunsko odzivnostjo so nam leta 1989 v kratkem času omogočile alogenično in avtologno presajanje krvotvornih matičnih celic, ki je najzahtevnejši način zdravljenja v klinični hematologiji.

Poleg presajanja krvotvornih matičnih celic pri otrocih in odraslih bolnikih s krvnimi boleznimi, smo leta 1997 skupaj s kolegi iz Onkološkega inštituta začeli zdravljenje z zelo velikimi odmerki citostatikov in avtologno presaditvijo perifernih krvotvornih matičnih celic pri bolnicah s karcinomom dojke.

Od leta 1991 smo člani evropske skupine za presaditev kostnega mozga (EBMT).

V zadnjih letih smo sočasno, kot v razvitih državah zahoda uvedli nekaj novih načinov zdravljenja, ki so znatno spremenili napoved poteka bolezni.

Po uvedbi interferona alfa za zdravljenje dlakastocelične levkemije pred štirinajstimi leti, ki je znatno izboljšal potek bolezni, smo to zdravilo leta 1996 začeli redno uporabljati za prvo zdravljenje bolnikov s kroničnimi mieloproliferativnimi boleznimi. Pri kronični mieločni levkemiji je danes interferon alfa prvi način zdravljenja, saj dosežemo najdaljša preživetja bolnikov, ob tem pa je tudi najbolj priporočljiv način zdravljenja pred presaditvijo kostnega mozga.

Novo zdravilo kladribin, ki ga zadnje dve leti uporabljamo kot prvo zdravilo za dlakasto celično levkemijo, je še izboljšalo napoved poteka bolezni. Dolge remisije bolezni po zdravljenju napovedujejo celo možnost popolne ozdravitve.

Fludarabin je danes najučinkovitejše zdravilo za zdravljenje napredovale kronične limfocitne levkemije, predvsem pa za prvo intenzivno zdravljenje bolnikov, ki so kandidati za presaditev krvotvornih matičnih celic.

Vse pogosteje uporabljamo rekombinantna dejavnika za pospešitev delitve in dozorevanja usmerjenih matičnih celic granulocitne (G-CSF) in monocitne-makrofagne (GM-CSF) vrste, ki skrajšata obdobje hude nevtropenije po zdravljenju s citostatiki in po presaditvi kostnega mozga. Njihovo večjo rabo omejuje predvsem velika cena zdravila.

Rekombinantni aktivirani faktor VII se je izkazal kot najbolj učinkovit način zdravljenja krvavitev pri bolnikih s hemofilijo in inhibitorji za faktor VIII.

Zaradi potrebe po redni timski obravnavi bolnika imamo že od začetka 80. let redne sestanke s specialisti-rentgenologi iz skeletne in pljučne diagnostike. Po izpopolnitvi tehnične opreme pa imamo od leta 1991 redne tedenske citološko-histološke seminarje. Redno sodelujemo s kliničnim mikrobiologom, od leta 1993 pa z onkologom-radioterapevtom.

Pri vsakodnevni obravnavi bolnikov sodelujemo s specialisti Zavoda za transfuzijo krvi, Centra za tipizacijo tkiv, Onkološkega inštituta, Inštituta za mikrobiologijo, Kliničnega oddelka za intenzivno interno medicino, Centra za internistično prvo pomoč Oddelka za citogenetiko Inštituta za varovanje zdravja in Inštituta za patologijo ter drugimi specialisti.

Prostorska stiska na bolniškem oddelku nas je leta 1990 spodbudila, da smo uvedli dnevno bolnišnico.

Zahtevnejša ambulantna obravnava bolnikov po presajanju krvotvornih matičnih celic je po letu 1991 zahtevala začetek dela ambulate za te bolnike. Skupaj s Centrom za hemofilijo smo uvedli dispanzerski način obravnave z ambulantnim zdravlje-



njem bolnikov s hemofilijo ter jih naučili samostojnega zdravljenja na domu.

Potreba po naročanju in spremljanju bolnikov v ordinaciji in bolniškem oddelku je leta 1990 spodbudila uvedbo Registra bolnikov z boleznimi krvi in krvotvornih organov in spremljanje z računalniškim programom Hipokrat.

Kot vse specialistične dejavnosti imamo že vrsto let organizirano konziliarno dejavnost za potrebe Kliničnega centra, v zadnjih letih pa tudi konzultantsko dejavnost, ki je na voljo bolnikom z boleznijo krvi in krvotvornih organov in zdravnikom po Sloveniji.

Vsa leta so specializirani laboratoriji Hematološke klinike omogočali raziskovalno dejavnost, izvajanje magistrskih in doktorskih del tako raziskovalcem Hematološke klinike kot tudi drugim v Kliničnem centru, kar potrjujejo številne publikacije v domači in tuji literaturi.

Dolgoletne klinične in pedagoške izkušnje smo vgradili v učbenike Klinična hematologija, hrvaški učbenik klinične hematologije, učbenik Hematologija za laboratorijske tehnike, skupaj z drugimi avtorji v učbenik Interna medicina ter nazadnje v Pravopis medicinskih izrazov.

Izkušnje pri diagnostiki in zdravljenju smo izmenjevali na strokovnih sestankih v okviru Hematološke sekcije, kongresih in simpozijih ter tesno sodelovali z drugimi centri, ki zdravijo boleznijo krvi in krvotvornih organov, predvsem z Royal Free Hospital v Londonu in Centrom za trasplantacijo koštane srži v Zagrebu. Aktivno smo sodelovali pri nastanku prvega skupnega Jugoslovanskega protokola za zdravljenje akutnih levkemij.

Leta 1976 smo organizirali VI. Hematološke dneve v Portorožu, leta 1986 pa V. Kongres hematologov in transfuziologov Jugoslavije z mednarodno udeležbo v Mariboru.

Ne nazadnje že vsa leta predavamo interno medicino in hematologijo na Medicinski fakulteti v Ljubljani, Visoki šoli za zdravstvo v

Ljubljani, na Fakulteti za farmacijo, Tavčarjevih dnevih, podiplomskem izobraževanju iz transfuziologije, hospitalne higijene in splošne medicine ter izvajamo pedagoško delo pri medicinskih sestrah, laboratorijskih tehnikih, študentih stomatologije in medicine, specializantih interne medicine, stomatologije, medicinske biokemije in drugih tako na oddelku, kot v laboratorijih Kliničnega oddelka za hematologijo.

Večletne izkušnje iz zdravstvene nege bolnikov z boleznimi krvi medicinske sestre izmenjujejo v Sekciji hematoloških medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov, ki deluje v okviru Zbornice zdravstvene nege Slovenije od ustanovitve leta 1995.

Za izobraževanje laboratorijskih tehnikov in inženirjev smo letos ustanovili Hematološko sekcijo laboratorijskih tehnikov, ki deluje v okviru Slovenskega združenja za klinično kemijo.

Vzporedno z razvojem v Ljubljani se je klinična hematologija razvijala v vseh velikih slovenskih bolnišnicah, kjer so jo razvijali specialisti internisti usmerjeni v hematologijo, ponekod pa specialisti transfuziologi.

40. jubilej bomo proslavili s strokovnim srečanjem, kjer bomo obravnavali najzahtevnejše načine zdravljenja v hematologiji, kot so presajanje krvotvornih matičnih celic in zdravljenje akutnih levkemij. Na strokovno srečanje smo povabili pionirja in Nobelovega nagrajenca s področja presajanja krvotvornih matičnih celic prof.dr. E. Donnalla Thomasa iz Seattla in Ambasadorja znanosti Slovenije prof.dr.Cirila Rozmana iz Barcelone, ki je uvedel presajanje krvotvornih matičnih celic v čpaniji. Dolgoletne izkušnje s presajanjem krvotvornih matičnih celic bo predstavil prof.dr.Boris Labar iz Zagreba, ki je ta način zdravljenja prvi uvedel v bivši skupni državi.

Prof. dr. Peter Černelč
predstojnik Kliničnega oddelka za hematologijo

THE EVOLUTION OF BONE MARROW TRANSPLANTATION IN THE CURE OF HUMAN DISEASE

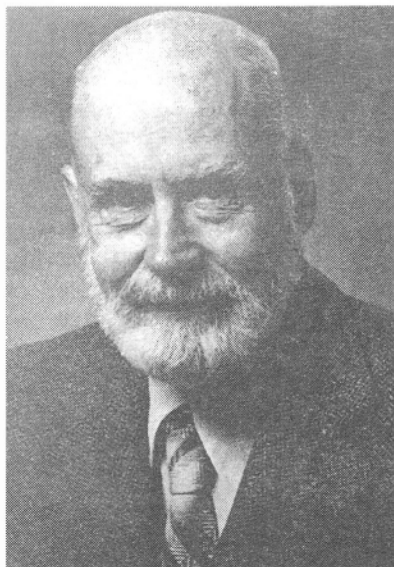
E. Donnall Thomas, M. D.

The modern era of marrow transplantation began about 1970 with development of the knowledge of the human leukocyte antigen (HLA) system for tissue typing and of supportive care technology for immunosuppressed patients without marrow function. At present more than 20.000 marrow transplant are being done each year.

Initial studies involved high-dose chemo-irradiation therapy and infusion of marrow from an HLA matched sibling for diseases such as aplastic anemia and leukemia after failure of all other therapy. Cure of a small number of these patients made it possible to do grafting earlier in the course of the disease with improvement in cure rate.

Increasing definition of the HLA system made it possible to identify unrelated donors compatible with the patient. More than 3 million volunteer donors are now listed in world-wide donor registries. The results of unrelated donor transplants approach the success with sibling donors.

E. Donnall Thomas, M. D., zaslužni profesor interne medicine, University of Washington School of Medicine, Nobelov nagajenee za medicino leta 1990, se je rodil 15. marca 1920 v Texasu v Združenih državah Amerike. Leta 1943 se je vpisal na Harvard School of Medicine in zaključil študij medicine leta 1946. Kot mlad



Major complications have been graft-versus host disease (GVHD) and opportunistic infections. Better immunosuppressive regimens after grafting are helping to control GVHD. Better antibiotics for control of bacterial infections and antivirals, especially acyclovir and gancyclovir, have dramatically controlled infectious complications.

Long-term results of marrow transplantation will be presented showing 70 to 90 per cent survival and care for good risk patients (thalassemia, acute leukemia in remission or chronic myeloid leukemia in chronic phase) and 20 to 60 per cent for more advanced disease.

Topics of current research to be mentioned include the use of peripheral blood cells or cord blood cells for hematopoietic cell transplantation, new immunosuppressive agents for control of GVHD, the potential of adoptive immunotherapy, cytogenetic and polymerase chain reaction technology for selection of patients for early treatment of relapse and the use of donor leukocyte infusions.

zdravnik je delal med drugimi tudi z dr. Josephom Murrayem, ki je bil pionir zdravljenja s presaditvijo ledvic. Leta 1955 se je priključil skupini dr. Ferrebeeja v Mary Imogene Basset Hospital v Cooperstownu, N. Y., kjer je pričel s presaditvami kostnega mozga pri bolnikih z levkemijo. Leta 1963 se je preselil v Seattle in pričel delati na Department of Medicine washingtonske univerze, kjer je skupaj s sodelavci nadaljeval s svojim delom. Leta 1975 se je s svojo skupino preselil v Fred Hutchinson Cancer Research Center v istem mestu. Ustanova je pod vodstvom profesorja Thomasa postala vodilni svetovni center na področju eksperimentalnega in kliničnega presajanja krvotvornih matičnih celc. S svojimi sodelavci, kot Bob Epstein, Rainer Storb, Dean Buckner, Reg Clift, Paul Neiman, Alex Fefer, Joel Meyers, Fred Appelbaum in John Hansen, je opravil v zadnjih dvajsetih letih več kot 4000 presaditev krvotvornih matičnih celic in nadaljeval z intenzivnim kliničnim in laboratorijskim raziskovalnim delom na področju presajanja. S svojim raziskovalnim, predvsem pa kliničnim delom, je omogočil da je danes presaditev krvotvornih matičnih celic postala varen in uspešen način zdravljenja cele vrste poprej neozdravljivih boleznih predvsem krvotvornih organov (levkemije, aplastične anemije), pa tudi nekaterih podedovanih boleznih in nekaterih rakavih boleznih.

Za svoje pionirsko delo na področju presajanja krvotvornih matičnih celic je leta 1990, skupno s svojim prijateljem in sodelavcem na začetku strokovne poti dr. Josephom Murrayem, prejel najvišje priznanje za svoje delo, Nobelovo nagrado za medicino.

Jože Pretnar

EDICIN[®]

vankomicin



**rešuje smrtno nevarne
infekcije**

Med

najčistejšimi in

najučinkovitejšimi

substancami

vankomicina

na svetu



Lek, tovarna farmacevtskih
in kemičnih izdelkov, d.d.

Verovškova 57
1526 Ljubljana
Telefon: 061 / 188 21 11
Telefaks: 061 / 168 35 17

injekcijske stekleničke 1 x 1 g
injekcijske stekleničke 1 x 0,5 g

Research article/Raziskovalni prispevek

TREATMENT OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA AND LOW-GRADE NON HODGKIN'S LYMPHOMAS WITH FLUDARABINE

ZDRAVLJENJE KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE IN NE-HODGKINOVIH LIMFOMOV S FLUDARABINOM

Ciril Rozman

Postgraduate School of Haematology «Farreras Valenti», Hospital Clinic, Department of Medicine, University of Barcelona

Arrived 1998-04-03, accepted 1998-04-07; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-5-8

Key words: purine analogues; chronic lymphoproliferative disorders; patients; surviving

Abstract – Fludarabine belongs to the new generation of purine analogues, used for the therapy of chronic lymphoproliferative disorders.

In chronic lymphocytic leukaemia (CLL), fludarabine can bring about a remission in more than 70% of previously untreated patients, with more than 25% achieving a complete remission. These figures are lower in relapsing or resistant CLL. Fludarabine is more active than either chlorambucil or the combination of cyclophosphamide, doxorubicin and prednisone (CAP). It is still unclear whether this higher activity will be translated into longer survival. In non-Hodgkin's lymphoma (NHL), fludarabine is active chiefly in low-grade types, in which remission rates of about 60% have been achieved in predominantly pretreated patients.

There is growing experience with the use of fludarabine as part of combination therapy both in CLL and low-grade NHL. This drug can be combined with adriamycin, mitoxantrone, cyclophosphamide or glucocorticoids. Generally, higher response rates are achieved with combination therapy than with fludarabine alone.

The most important side-effects are myelosuppression, immunosuppression characterized by a severe and long-lasting depletion of CD4+ T lymphocytes, autoimmune haemolytic anaemia and transfusion-associated graft-versus-host disease.

Fludarabine alone or in combination with other agents should be considered as first line therapy when the aim is to cure the underlying condition, e.g. in young patients with aggressive disease in whom chemotherapy is followed by bone marrow transplantation. In other situations, fludarabine is still an experimental drug, whose definitive place will be determined from ongoing randomized trials.

Introduction

Among purine analogues, two generations can be distinguished. The older generation includes well-known drugs such as mercaptopurine, azathioprine, allopurinol, acyclovir and ganciclovir, which are employed in different clinical situations such as immunosuppression and treatment of leukaemia, gout or viral infections.

The new generation of purine analogues comprises three cytotoxic agents, viz. pentostatin (2-deoxycoformycin), fludarabine (2-fluoro-ara-AMP) and cladribine (2-chlorodeoxyadenosine), which

Ključne besede: purinski analogi; kronične limfoproliferativne bolezni; bolniki; preživetje

Izvleček – Fludarabin je novejšo zdravilo iz skupine purinskih analogov, ki ga uporabljamo za zdravljenje kroničnih limfoproliferativnih bolezni.

S fludarabinom dosežemo pri prej nezdravljenih bolnikih s kronično limfocitno levkemijo (KLL) več kot 70% remisij, od tega 25% popolnih remisij bolezni. Odstotek remisij bolezni pa je znatno manjši pri ponovnem poslabšanju bolezni in pri tistih, ki so bili rezistentni na zdravljenje z drugimi citostatiki. Pri zdravljenju KLL je fludarabin bolj učinkovit kot klorambucil ali CAP (ciklofosfamid, doksorubicin in prednizon). Kljub veliki učinkovitosti fludarabina pri zdravljenju KLL, pa z njim zaenkrat še niso uspeli podaljšati preživetja bolnikov. S fludarabinom dosežemo okoli 60% remisij bolezni pri poprej že zdravljenih bolnikih z ne-Hodgkinovimi limfomi nizke stopnje malignosti (NHL).

Vse več je izkušenj, ki potrjujejo da je fludarabin še učinkovitejši pri zdravljenju bolnikov s KLL in NHL, če ga uporabljamo v kombinaciji z adriamicinom, mitoksantronom, ciklofosfamidom ali glukokortikoidi.

Med neželenimi pojavi je najpomembnejše zaviralno delovanje na kostni mozeg in imunski odziv, predvsem s hudim in dolgotrajnim zmanjšanjem limfocitov T celic pomagalk. Poleg tega se lahko pojavi avtoimunska hemolitična anemija, po transfuziji krvi pa reakcija presadka proti gostitelju.

Fludarabin sam ali v kombinaciji z drugimi zdravili se priporoča kot prvo zdravljenje KLL pri mlajših bolnikih z napredovalo boleznijo, pri katerih želimo zdravljenje nadaljevati s presaditvijo kostnega mozga. Pri drugih bolnikih s kroničnimi limfoproliferativnimi boleznimi je fludarabin še vedno zdravilo, ki se preizkuša in šele zaključki raziskav bodo določili natančno mesto uporabe.

are chiefly used for the therapy of chronic lymphoproliferative disorders. All three purine analogues of the new generation have been designed to impair purine salvage pathways by the inhibition of adenosine deaminase (ADA) or resistance to its action. All three agents are highly active suppressors of normal and malignant lymphoid cells, producing consequences similar to congenital ADA deficiency, in which elevation of intracellular deoxyadenosine triphosphate (dATP) causes nicotinamide adenine nucleotide (NAD) depletion, so that this factor is unavailable for the dehydrogenases that generate ATP in lymphocytes; this

results in apoptotic cell death even when the mitotic rate is low (1, 2).

Pentostatin directly inhibits ADA. In contrast, fludarabine and cladribine, which are halogenated analogues, do not inhibit ADA, but rather are resistant to the enzyme. Additionally, fludarabine and cladribine are phosphorylated intracellularly by deoxycytidine kinase to their triphosphates, which act as chain terminators when incorporated into DNA (3). This process also has important consequences in potentiating the formation of ara-CTP after administration of cytosine arabinoside, with implications for clinical use of the drugs as part of combination therapy for acute myeloid leukaemia (4). Finally, fludarabine also has demonstrable action against a number of DNA repair enzymes, which predicts that it may show useful clinical synergy with agents that induce DNA strand breaks (5).

In the present article, the place of fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and low-grade non-Hodgkin's lymphomas (NHL) will be discussed. The article is divided into the following sections: a) Use of fludarabine for the therapy of CLL; b) Use of fludarabine for the therapy of low-grade NHL; c) Fludarabine as part of combination therapy; d) Side-effects; e) Place of fludarabine in the treatment of CLL and low-grade NHL.

Use of fludarabine for the therapy of CLL

Experience in this field is growing worldwide. For illustrating the use of fludarabine for the therapy of CLL, we shall briefly analyze the results of two retrospective and two prospective trials.

At the MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, a great deal of research on CLL therapy with fludarabine has been performed under the leadership of MJ Keating. Interesting results were obtained by comparing different dosage schedules in previously treated CLL patients (6). A 3-day fludarabine regimen (30 mg/m² i.v. over 15-30 min daily given every 28 days) was compared to weekly fludarabine (the same dose given once a week), 5-day fludarabine (standard schedule) and 5-day fludarabine plus prednisone (30 mg/m² p.o. daily given every 28 days). The overall response to 3-day fludarabine (46%) was significantly higher than that obtained with the weekly schedule (24%), and only slightly lower than that to 5-day fludarabine (58%) or 5-day fludarabine plus prednisone (52%). Conversely, the 3-day schedule was associated with a significantly lower incidence of infection and fever (14%) when compared to 5-day fludarabine (25%) or to 5-day fludarabine plus prednisone (29%). Importantly, different response rates were not translated into different survival rates. These depend on the disease phase in which the therapy is started (7). Previously untreated patients show more favourable survival than previously treated patients. The worst survival is observed in patients refractory to other cytotoxic drugs. The response to fludarabine can be predicted from several variables (8). A less favourable outcome is associated with advanced clinical stage, prior therapy, older age and low albumin levels. The bb₂-microglobulin level is also very useful in this context (9). A response rate of 94% has been observed in patients with normal bb₂-microglobulin levels, whereas elevated levels are associated with progressively lower responses.

The Spanish Cooperative Group (10) obtained similar results in 68 patients with resistant or relapsing B-CLL. Complete remission (CR) was achieved in 4% of patients, partial remission in 24% (PR), a minor response in 37%, and the treatment failed in 35%. The most important factor in predicting the response was the disease phase. In relapsing CLL, there was a significantly higher rate of complete and partial remissions (62%) than in the resistant phase (21%) ($p = 0.005$). Remissions strongly influenced survival. Out of 19 patients achieving a remission, only 3 died, the median survival not being reached, whereas the patients not achieving a remission showed a median survival of only 11 months.

These results are very similar to those of an international retrospective analysis conducted by the National Cancer Institute (11),

which included more than 700 CLL patients, mostly resistant to other therapies. CR was recorded in 3% of patients and PR in 29%. The median duration of remission was 13.1 months and the median survival only 12.6 months.

Two randomized trials have been reported. An American intergroup trial, a joint effort of several cooperative groups, compared fludarabine (25 mg/m² i.v. given daily for 5 days) and chlorambucil (40 mg/m² p.o. on day 1 given weekly for up to 12 months) in previously untreated CLL patients with active disease (12). Nonresponders, or responders whose CLL progressed within 6 months of treatment, were crossed over to the other arm. A significantly higher overall response rate of 70% was obtained among 166 evaluable patients with fludarabine (CR 27% + PR 43%), compared to 43% (CR 3% + PR 40%) among 173 patients on chlorambucil ($p = 0.001$). Response duration following fludarabine was longer than with chlorambucil (median 33 vs 17 months, $p = 0.0002$). Similarly, the median progression-free survival was 27 months for patients receiving fludarabine vs 17 months for patients on chlorambucil ($p < 0.0001$). With a median follow-up of 30 months, there was no difference in overall survival ($p = 0.49$), although this comparison was complicated by the crossover design of the study. In a European prospective randomized trial (13), fludarabine (25 mg/m²/day on days 1-5) was compared to a CAP combination regimen (cyclophosphamide 750 mg/m²/day on day 1, doxorubicin 50 mg/m²/day on day 1, and prednisone 40 mg/m²/day on days 1-5), both given for six months, in advanced-stage CLL patients. Of 196 evaluable patients, 100 were previously untreated whereas 96 patients had received prior therapy. Remission rates were significantly higher after fludarabine than after CAP, with overall response rates of 60% and 44%, respectively ($p = 0.023$). A higher response rate to fludarabine was observed in both untreated (71% vs 60%, $p = 0.26$) and pretreated (48% vs 27%, $p = 0.036$) cases, although the difference was statistically significant only in pretreated cases. In pretreated patients, the duration of remission and survival did not differ between the treatment groups; the median duration of remission was 324 days after fludarabine and 179 days after CAP ($p = 0.22$), while the median survival times were 728 days and 731 days, respectively. In untreated cases, on the other hand, fludarabine induced significantly longer remissions than CAP, with the median after fludarabine not reached and a median of 208 days after CAP ($p < 0.001$). This effect also translated into a tendency towards longer overall survival after fludarabine ($p = 0.087$).

Use of fludarabine for the therapy of low-grade NHL

Less research has been done in this field. It is clear that the efficacy of fludarabine is higher in low-grade NHL when compared to intermediate and high-grade disease. Hochster and co-workers (14) showed a remission rate of 52% (CR + PR) in low-grade NHL, as opposed to only 14% ($p < 0.01$) in intermediate-grade disease. Similar results have been achieved by other authors (15-19). In predominantly pretreated patients, a remission rate of nearly 60% was observed (Tab. 1). Definitive conclusions on the value of fludarabine in these disorders will be obtained from ongoing randomized trials (20).

Fludarabine as part of combination therapy

Experience in this field is growing (20-25). Mostly, patients resistant to other drugs have been treated with such schemes. In general, the response rates have been higher than with fludarabine alone. In our institution (25), we are investigating the efficacy of fludarabine combined with mitoxantrone and cyclophosphamide. In relapsing or resistant chronic lymphoproliferative disorders, we have observed a response rate of 70%. Most importantly, 66% of patients have experienced CR and 35% have shown molecular remissions. In low-grade NHL, it is very important to achieve CR since it is

Tab. 1. Activity of fludarabine in low-grade NHL.

	N	Previously treated	CR (%)	PR (%)	CR + PR (%)
Whelan (1991) ⁽¹⁵⁾	34	34	18	21	39
Hochster (1991) ⁽¹⁴⁾	25	25	20	32	52
Redman (1992) ⁽¹⁶⁾	40	40	13	45	58
Zinzani (1993) ⁽¹⁷⁾	21	13	14	52	66
Solal-C. (1996) ⁽¹⁸⁾	49	0	37	28	65
Rieux (1996) ⁽¹⁹⁾	108	65	28	35	63
All	277	63.9%	21.7	35.5	57.2

CR – complete remission; PR – partial remission.

Tab. 2. Fludarabine combined with other cytotoxic agents in chronic lymphoproliferative disorders.

Author	Combination	Previously treated	Condition	N (%)	CR (%)	PR (%)	A11
Hohster (1994) ⁽²¹⁾	FC	No	NHL	27	89	11	100
Robertson (1995) ⁽²²⁾	FA	Yes	CLL	30	20	35	55
Zinzani (1995) ⁽²³⁾	FMP	Yes	NHL	18	22	50	72
McLaughlin (1996) ⁽²⁴⁾	FMD	Yes	NHL	51	47	47	94
Barcelona (1997) ⁽²⁵⁾	FMC	Yes	Both	35	66	12	78

F – fludarabine; A – adriamycin; M – mitoxantrone; C – cyclophosphamide; P – prednisone; D – dexamethasone.

Tab. 3. Side-effects of fludarabine.

Myelosuppression
Immunosuppression
Infections
Autoimmune haemolytic anaemia
Transfusion-associated graft-vs-host disease
Other: CNS demyelination, interstitial pneumonitis, tumor lysis syndrome, etc.

translated into longer survival (26). Probably, it is important also to achieve a molecular remission since it is associated with longer failure-free survival (27).

Side-effects

These are classified in Table 3. The three most important side-effects are myelosuppression, immunosuppression and infections. Myelosuppression is the major dose-limiting adverse effect reported with fludarabine. More than 50% of patients develop a severe neutropenia ($<0.5 \times 10^9/L$), a decrease of Hb concentration by 20 g/L from baseline and thrombocytopenia ($<75 \times 10^9/L$) (28, 29). Severe immunosuppression is highly characteristic of all three purine-analogues of the new generation. There is an about 10-fold reduction in the number of peripheral blood CD4 + T lymphocytes (5, 8, 30) and, what is more important, the median time for normalization is about 40 months. In addition, there is a reduction of CD8 + T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes and NK cells. Myelosuppression and immunosuppression are responsible for increased incidence of infections. These can be classified into several categories (6): severe (chiefly pneumonias and septicaemias), less severe, fever of unknown origin and opportunistic infections. The incidence of infections is higher when fludarabine is combined with prednisone. Most authors consider that prednisone should be avoided when administering fludarabine. Byrd and co-workers (31) analyzed 7547 cycles of fludarabine in 2269 patients. They found a 3.2% rate of opportunistic infections. Ninety-seven percent of cases were detected in patients previously treated with prednisone or alkylating agents. The most frequent causative agents were *Pneumocystis carinii*, *Candida* and atypical mycobacteria. Some authors advise preventive therapy against *Pneumocystis carinii* infections. Increased rates of listeriosis have also been observed in patients treated with fludarabine (32, 33).

An important side-effect is autoimmune haemolytic anaemia (AIHA). AIHA or a positive direct antiglobulin test (Coombs test or

DAT) can be observed during the clinical course in about 10-25% of CLL patients (34). From older literature, it is well known that such a side-effect can be associated with several cytotoxic drugs, which probably act as a «trigger-mechanism», by increasing the already existing immune imbalance. There is no agreement on the incidence of «de novo» AIHA or DAT in fludarabine treated patients. In three retrospective analyses, this was 4.5% (35), 7.5% (10) and 15.4% (36). An important question is whether the incidence is higher with fludarabine than with other cytotoxic agents. This can be answered only with the use of prospective protocols. In the European prospective trial (13), the incidence of AIHA was very low. It appeared in only two out of 100 patients treated with fludarabine and in none of 96 patients who received the CAP combination therapy, the difference being insignificant. When all autoimmune phenomena were considered together, there were five cases in the fludarabine group and none in the CAP group ($p = 0.03$).

In an American prospective trial, this issue was not analyzed in detail, but apparently, the incidence of AIHA was higher in patients treated with fludarabine than in the chlorambucil group (37). It is noteworthy that fludarabine-associated AIHA is observed only in CLL and not in other diseases. The onset of AIHA can be extremely severe and often fatal, above all when the patient is being re-treated with fludarabine. Probably, fludarabine should best be avoided when there is a positive DAT or a previous episode of AIHA.

Another severe side-effect observed with fludarabine therapy is transfusion-associated graft-versus-host-disease (GVHD). The general incidence of transfusion-related GVHD is about one in a million transfusions (38). The exact incidence in fludarabine-treated patients is not known, but the published cases (39-41) suggest that it is much higher. The contributing factor is the severe immunosuppression caused by fludarabine. Since GVHD can be associated with a high mortality, it is advisable to irradiate the transfusion components, although this practice has been questioned (42).

Other side-effects have been observed less frequently. A severe, progressive syndrome of CNS demyelination has been reported in patients receiving high-dose fludarabine ($>90 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ for 5 days) (28, 43), but only exceptionally with the currently employed dosage (28). Toxic interstitial pneumonitis has been observed by some authors, including ourselves (44). A few cases of fludarabine-induced tumor lysis syndrome have been reported in CLL and NHL (45). Alopecia appears in less than 2% of patients (28).

Place of fludarabine in the treatment of CLL and low-grade NHL

Before answering this question, it is important to define the aim of therapy in these diseases. This may be to cure the patient, to achieve a remission, to prolong the survival, to improve the quality of life or even to improve the cost/benefit ratio. All these objectives are important, but probably the most important ones are to cure the patient and, if this is not possible, to prolong the survival. When the aim of therapy is to cure the disease, fludarabine appears to be more active than the remaining drugs, since it causes a higher rate of CR and molecular remissions. Thus, in younger patients with aggressive disease, fludarabine, possibly combined with other drugs and followed by bone marrow transplantation, should be considered as first line therapy. In all other circumstances, fludarabine should be reserved as an experimental drug for prospective clinical trials, from which the definitive answers about its place in the treatment of CLL and low-grade NHL will be obtained.

References

- Seto S, Carrera CJ, Kubota M, Wasson DB, Carson DA. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J Clin Invest* 1985; 75: 377-83.

2. Robertson LE, Chubb S, Meyn RE, Story M, Ford R, Hittelman WN et al. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2, -deoxyadenosin and 9-B-D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 1993; 81: 143-50.
3. Huang P, Chubb S, Plunkett W. Termination of DNA synthesis by 9-B-D-arabino-furanosyl-2-fluoroadenine: a mechanism for cytotoxicity. *J Biol Chem* 1990; 265: 16617-25.
4. Ghandi V, Estey E, Keating MJ, Plunkett W. Fludarabine potentiates metabolism of cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia during therapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 116-24.
5. Tallman MS, Hakimian D. Purine nucleoside analogs: Emerging roles in indolent lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995; 86: 2463-74.
6. Robertson LE, O'Brien S, Kantarjian H, Koller C, Beran M, Andreeff M et al. A 3-day schedule of fludarabine in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 1444-9.
7. Keating MJ, O'Brien S, Kantarjian H, Plunkett W, Estey E, Koller C et al. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine as a single agent. *Blood* 1993; 81: 2878-84.
8. O'Brien S, Kantarjian H, Beran M, Smith T, Koller C, Estey E et al. Results of fludarabine and prednisone therapy in 264 patients with chronic lymphocytic leukemia with multivariate analysis-derived prognostic model for response to treatment. *Blood* 1993; 82: 1695-700.
9. Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H, Freireich EJ, O'Brien S. The serumB2-microglobulin (B2m) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 1995; 86 Suppl: 606a (abstract no. 2412).
10. Montserrat E, Lopez-Lorenzo JL, Manso F, Martin A, Prieto E, Arias-Sampedro J et al. Fludarabine in resistant or relapsing B-cell chronic lymphocytic leukemia. The Spanish Group Experience. *Leukemia Lymphoma* 1996; 21: 467-72.
11. Sorensen JM, Vena DA, Fallavollita A, Chun HG, Cheson BD. Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: Five-year follow-up report. *J Clin Oncol* 1997; 15: 4548-465.
12. Rai KR, Peterson B, Elias L, Shepherd L, Hines J, Nelson D et al. A randomized comparison of fludarabine and chlorambucil for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia. A CALGB, SWOG, CTG/NCI-C and ECOG inter-group study. *Blood* 1996; 88: Suppl 1: 141a (abstract no. 552).
13. The French Cooperative Group on CLL. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1996; 347: 1432-8.
14. Hochster HS, Kim K, Green MD, Mann RB, Neiman RS, Oken MM et al. Activity of fludarabine in previously treated non-Hodgkin's low-grade lymphoma: Results of an Eastern Cooperative Group Study. *J Clin Oncol* 1992; 10: 28-32.
15. Whelan JS, Davis CL, Rule S, Ranson M, Smith OP, Metha AP et al. Fludarabine phosphate for the treatment of low-grade lymphoid malignancy. *Br J Cancer* 1991; 64: 120-3.
16. Redman JR, Cabanillas F, Velasquez WAS, McCaughlin P, Hagemester FB, Swan F et al. Phase II trial of fludarabine phosphate in lymphoma: An effective new agent in low-grade lymphoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 790-4.
17. Zinzani DL, Lauria F, Rondelli D, Berferat D, Raspadaor D, Bocchia M et al. Fludarabine: An active agent in the treatment of previously treated and untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1993; 4: 575-8.
18. Solal-Celigny P, Brice P, Brousse N, Caspard H, Bastion Y, Haioun C et al. Phase II trial of fludarabine monophosphate as first-line treatment in patients with advanced follicular lymphoma: a multicenter study by the Group d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1996; 14: 514-9.
19. Rieux C, Dumontet C, Bastion Y, Salles G, Espinouse D, Sonet A et al. Fludarabine treatment in indolent lymphoma patients: Analysis of 108 patients treated in one center. *Ann Oncol* 1996; 7: Suppl 3: 149 (abstract no. 552).
20. Salles G, Tilly H, Delfau M-H, Bouabdallah R, MacIntyre E, Bosly A et al. GELF-94: A randomized prospective trial of therapeutic alternatives (intensive therapy with PBSCT or fludarabine) in poor prognosis follicular lymphoma (FL) patients (PTS) with molecular and cytogenetic studies (a GELA study). *Ann Oncol* 1996; 7: Suppl 3: 148 (abstract no. 550).
21. Hochster H, Oken M, Bennett J, Wolf B, Gordon L, Raphael B et al. Efficacy of cyclophosphamide (CYC) and fludarabine (FAMP) as first line therapy of low-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL) - ECOG 1491. *Blood* 1994; 84: Suppl 1: 383a (abstract no. 1517).
22. Robertson LE, O'Brien S, Kantarjian H, Koller C, Beran M, Andreeff M et al. Fludarabine plus doxorubicin in previously treated chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 943-5.
23. Zinzani PL, Bendandi M, Tura S. FMP regimen (Fludarabine, mitoxantrone, prednisone) as therapy in recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 1995; 55: 262-6.
24. McLaughlin P, Hagemester FB, Romaguera JE, Sarris AH, Pate O, Younes A et al. Fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone: An effective new regimen for indolent lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1262-8.
25. Author's institution: Unpublished results.
26. Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F, Escoda L, Terol MJ, Marin P et al. Low-grade lymphoma: clinical and prognostic studies in a series of 143 patients from a single institution. *Leuk Lymphoma* 1994; 15: 159-65.
27. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, Smith T, Hagemester F, Rodriguez MA et al. The Clinical significance of molecular response in indolent follicular lymphomas. (Submitted).
28. Ross SR, McTavish D, Faulds D. Fludarabine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in malignancy. *Drugs* 1993; 45: 737-59.
29. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2431-48.
30. Fenchel K, Bergmann L, Wijermans P, Engert A, Pralle H, Mitrou PS et al. Clinical experience with fludarabine and its immunosuppressive effects in pretreated chronic lymphocytic leukemias and low-grade lymphomas. *Leuk Lymphoma* 1995; 18: 485-92.
31. Byrd JC, Hargis JB, Kester KE, Hospenthal DR, Knutson SW, Diehl LF. Opportunistic pulmonary infections with fludarabine in previously treated patients with low-grade lymphoid malignancies: A role for *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis. *Am J Hematol* 1995; 49: 135-42.
32. Anaissie E, Kontoyiannis DP, Kantarjian H, Elting L, Robertson LE, Keating M. Listeriosis in patients with chronic lymphocytic leukemia who were treated with fludarabine and prednisone. *Ann Intern Med* 1992; 117: 466-9.
33. Hequet O, de Jaureguiberry JP, Jaubert D, Gisserot O, Muzellec Y, Brisou P. Listeriosis after fludarabine treatment for chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1997; 39: 89-91.
34. Foon KA, Rai KR, Gale RP. Chronic lymphocytic leukemia: New insights into biology and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 525-35.
35. Di Raimondo F, Giustolisi R, Cacciola E, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson LB et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia patients treated with fludarabine. *Leuk Lymphoma* 1993; 11: 63-8.
36. Myint H, Copplestone JA, Orchard J, Craig V, Curtis D, Prentice AG et al. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 91: 341-4.
37. Rai KR (1997, personal communication).
38. Linden JV, Pisciotto PT. Transfusion-associated graft-versus-host disease and blood irradiation. *Transfus Med Rev* 1992; 6: 116-23.
39. Briz M, Cabrera R, Sanjuan I, Fores R, Diez JL, Herrero M et al. Diagnosis of transfusion-associated graft-versus-host disease by polymerase chain reaction in fludarabine-treated B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 91: 409-11.
40. Maung ZT, Wood AC, Jackson GH, Turner GE, Appleton AL, Hamilton PJ. Transfusion-associated graft-versus-host disease in fludarabine-treated B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 88: 649-52.
41. Williamson LM, Wimperis JZ, Wood ME, Woodcock B. Fludarabine treatment and transfusion-associated graft-versus-host disease. *Lancet* 1996; 348: 472-3.
42. Briones J, Pereira A, Alcorn I. Transfusion-associated graft-versus-host disease (TA-GVHD) in fludarabine-treated patients: is it time to irradiate blood component? *Br J Haematol* 1996; 93: 739-40.
43. Chun HG, Leyland-Jones B, Cheson BD. Fludarabine phosphate: a synthetic purine antimetabolite with significant activity against lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1991; 9: 175-88.
44. Cervantes F, Salgado C, Montserrat E, Rozman C. Fludarabine for prolymphocytic leukaemia and risk of interstitial pneumonitis. *Lancet* 1990; 336: 1130.
45. Killick S, Mercieca J, Nandi A, Behrens J. Fludarabine-induced tumour lysis in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lab Haem* 1997; 19: 79-80.

Professional article/Strokovni prispevek

AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION IN THE TREATMENT OF ACUTE LEUKAEMIAS

AVTOLOGNA TRANSPLANTACIJA KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC PRI ZDRAVLJENJU AKUTNIH LEVKEMIJ

Boris Labar, Nemet Damir, Mirando Mrić, Vinko Bogdanić, Drago Batinić, Branka Golubić-Čepulić, Mladen Petrovečki, Ivo Radman, Igor Aurer, Dubravka Sertić

Klinički bolnički centar Zagreb, Klinike i zavodi Rebro, Klinika za unutrašnje bolesti, Zavod za hematologiju, Kišpatičeva 12, Zagreb, Hrvatska.

Arrived 1998-04-08, accepted 1998-04-20; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-9-10

Key words: acute myeloblastic leukaemia; acute lymphoblastic leukaemia; autologous transplantation; haematopoietic stem cell

Abstract—Background. Autologous haematopoietic stem cell transplantation (ASCT) is increasingly performed for the treatment of acute leukaemias. In the period between 1988 and 1998, 57 ASCT in patients with acute myeloblastic leukaemia (AML) and 45 ASCT in patients with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) have been performed. In 99 procedures the source of stem cells was bone marrow and in 3 procedures peripheral stem cells. Patients were prepared for transplantation with cyclophosphamide and total body irradiation or cyclophosphamide with high dose busulfan. Relapse rate in patients with AML in first remission was 39% and 72% in patients treated in advanced disease. Relapse rate in patients with ALL in first remission was 45% and 65% in patients treated in advanced disease. Estimated leukaemia free long term survival is 56% for AML patients in first remission and 23% for patients with advanced disease. Estimated leukaemia free long term survival is 54% for ALL patients in first remission and 29% for patients with advanced disease.

Conclusions. Autologous stem cell transplantation is effective and relative safe method of therapy for AML and ALL in first remission and results are approaching allografts. Relapse is still the major problem of autografting. Autologous stem cell transplantation is considered as routine treatment approach for adult patients with acute leukaemias in first remission and without matched family donor.

Introduction

Autologous stem cell transplantation (ASCT) has been increasingly performed for the treatment of acute leukaemias (1, 2). Most patients with acute leukaemia enter complete remission after induction chemotherapy (3, 4). The majority, however, relapses during the first year of remission despite various types of intensive consolidation and maintenance chemotherapy (5, 6). Therefore in the recent years, in adult patients especially patients younger than 60 years of age a postremission therapy has been intensified by performing allogeneic or autologous stem cell transplantation (7, 8).

Ključne besede: akutna mieloblastna levkemija; akutna limfoblastna levkemija; autologna presaditev; krvotvorne matične celice

Izvleček – Izhodišča. Autologna presaditev krvotvornih matičnih celic se uporablja vse pogosteje pri zdravljenju bolnikov z akutnimi levkemijami. Avtorji so v obdobju od leta 1988 do 1998 opravili 57 avtolognih presaditev pri bolnikih z akutno mieloblastno levkemijo (AML) in 45 presaditev pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo (ALL). Bolnike so pripravili na presaditev s ciklofosfamidom in obsevanjem celega telesa ali pa s ciklofosfamidom in velikimi odmerki busulfana. Pri 99 presaditvah je bil vir krvotvornih matičnih celic kostni mozeg, pri 3 presaditvah pa matične celice zbrane iz periferne krvi. Delež relapsov po presaditvi pri bolnikih z AML v prvi remisiji je bil 39%, pri tistih v napredovalem obdobju bolezni pa 72%. Delež relapsov po presaditvi pri bolnikih z ALL v prvi remisiji je bil 45%, pri tistih v napredovalem obdobju bolezni pa 65%. Ocenjeno preživetje brez ponovitve levkemije bolnikov z AML v prvi remisiji je 56%, v napredovalem obdobju bolezni pa 23%. Ocenjeno preživetje brez ponovitve levkemije bolnikov z ALL v prvi remisiji je 54%, v napredovalem obdobju bolezni pa 29%.

Zaključki. Autologna presaditev kostnega mozga je učinkovit in varen način zdravljenja bolnikov z AML in ALL v prvi remisiji bolezni. Uspehi se približujejo rezultatom zdravljenja z alogenično presaditvijo. Relaps bolezni je še vedno najpomembnejši vzrok neuspeha avtologne presaditve. Avtorji menijo, da je avtologna presaditev krvotvornih matičnih celic ustaljen način zdravljenja odraslih bolnikov z akutno levkemijo, ki nimajo skladnega sorodnega darovalca.

In this study a preliminary report of the treatment results with ASCT for acute leukaemia is presented.

Patients and Methods

Patients: Between March 1988 and March 1998, patients with acute leukaemia (57 patients with acute myeloblastic leukaemia /AML/ and 45 with acute lymphoblastic leukaemia /ALL/ were autografted at the Division of Haematology, Department of Medicine, University Hospital Centre, Zagreb, Croatia. Table 1 indicates patients' characteristics.

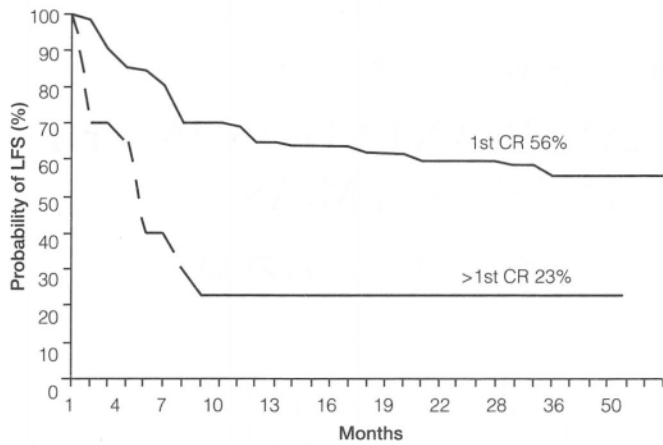


Fig. 1. The probability of leukaemia free survival (LFS) in patients with AML.

Tab. 1. Patients' characteristics.

		AML	ALL
No of patients		57	45
Age	median	30	22
	(range)	2-54	4-50
Sex	M/F	30/27	26/19
Stage at ASCT	1 st CR/>1 st CR	42/15	29/16
Source of stem cell	BM/PBSC	55/2	44/1

AML – acute myeloblastic leukaemia; ALL – acute lymphoblastic leukaemia; BM – bone marrow; PBSC – peripheral blood stem cell; CR – complete remission

Stem cell: The source of stem cell was bone marrow in 99 patients and peripheral blood in 3. patients.

Conditioning: The conditioning regimen for ALL patients and proportion of AML consisted of cyclophosphamide and total body irradiation (9). Most of AML patients received busulfan and cyclophosphamide (10).

Methods of cryopreservation of stem cells, cell assessment and supportive care measures are described in details elsewhere (11).

Results

The probability of long term leukaemia free survival (LFS) of patients with AML in 1st complete remission (CR) is 56%. For patients with advanced disease the probability of LFS is 23% (Fig. 1). The relapse rate for patients autografted in 1st CR is 39% at 4 years, and for patients treated in advanced disease is 72% at 4 years.

The probability of LFS for patients with ALL in 1st CR is 54% at 5 years and for patients in 2nd or 3rd remission 29% at 3 years. All six patients with ALL autografted in relapse died in the 1st posttransplant year (Fig. 2).

The probability of relapse for ALL patients autografted in 1st CR or advanced disease is 45% and 65% respectively.

The relapse is the major problem of autografting. For both AML and ALL patients relapse is the main cause of death in more than 80% of patients.

Discussion

Autologous stem cell transplantation is effective and relatively safe method for therapy of acute leukaemia in remission. The LFS of about 55% for both AML and ALL patients autografted in 1st CR is very encouraging although the number of patients is relatively

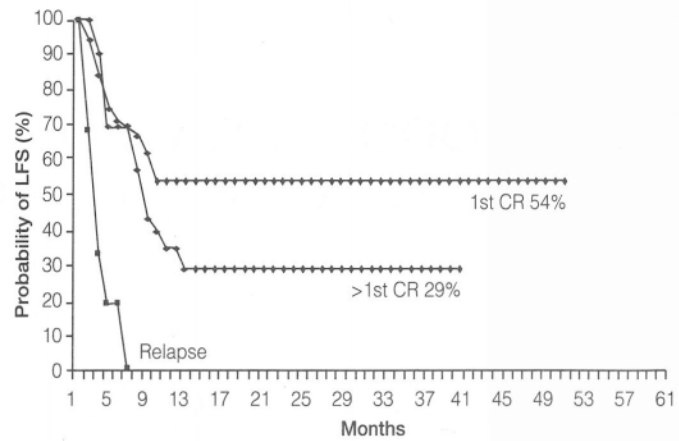


Fig. 2. The probability of leukaemia free survival (LFS) in patients with ALL.

small. The LFS of autografted patients approaches our results of allografting (12). These results are superior to chemotherapy. For patients receiving intensive consolidation chemotherapy long term LFS for both AML and ALL patients in 1st CR is between 25 – 30% (13).

Relapse rate is still a major problem of autografting, and 40–45% of patients relapsed at 4 year period. Treatment related mortality of less than 10% is also reported by others (14). The mortality cause by the treatment procedure is not significantly different from those reported for the intensive consolidation chemotherapy (15).

In conclusion, autologous stem cell transplantation is routine treatment approach for adult patients with acute leukaemia in 1st complete remission.

References

- Stone RM, Mayer RJ. Treatment of the newly diagnosed adult with de novo acute myeloid leukaemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7: 47–64.
- Cripe LD. Adult acute leukemia. *Current Problems Cancer* 1997; 21: 1–64.
- Bishop JF. The treatment of adult acute myeloid leukemia. *Sem Oncol* 1997; 24: 57–69.
- Mrsić M, Nemet D, Labar B et al. Chemotherapy versus allogeneic bone marrow transplantations in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Transplant Proc* 1993; 25: 1268–70.
- Reiffers J, Lacombe F, Puntoso M. Treatment of acute myeloid leukemia in adult. *Rev Pratic* 1996; 46: 62–8.
- Burnett AK. The treatment of acute leukemia. *Lancet* 1997; 349: 270–5.
- Labar B, Maszi T, Morabito F et al. Allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia – IGCI experience. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 1009–12.
- Labar B, Mrsić M, Nemet D et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus chemotherapy for patients with acute myelogenous leukemia in first remission. *Transplantation* 1994; 6: 235–9.
- Labar B, Bogdanić V, Nemet D et al. Total body irradiation with or without lung shielding for allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9: 343–7.
- Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP. Bone Marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* 1987; 70: 1382–8.
- Nemet D, Labar B, Bogdanić V et al. Autologous bone marrow transplantation for haematological malignancies – Experience of the Centre of Zagreb. *Wien Med Wschr* 1995; 145: 61–4.
- Labar B, Nemet D, Mrsić M et al. Autologous versus allogeneic marrow transplantation for patients with acute myeloid leukemia in 1st remission. *Cancer Res Ther Control*. Vol 5. In press 1998.
- Gorin Nc, Aegerter P, Auvert B for the EBMT. Autologous bone marrow transplantation for acute leukaemia in remission: an analysis on 1322 cases. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4: 3–5.
- Labar B, Mrsić M, Nemet D et al. Age as a prognostic factor following stem cell transplantation in acute leukemia. *Croatian Med J* 1997; 38: 332–7.
- Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 217–23.

Strokovni prispevek/Professional article

NAŠE IZKUŠNJE PRI ZDRAVLJENJU BOLNIKOV S KRONIČNO MIELOIČNO TER AKUTNO LEVKEMIJO Z ALOGENIČNO PRESADITVIJO KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC

ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION FOR CHRONIC GRANULOCYTIC AND ACUTE LEUKAEMIAS IN UNIVERSITY MEDICAL CENTRE LJUBLJANA

Jože Pretnar,¹ Samo Zver,¹ Majda Benedik-Dolničar²

¹ Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

² Hematološko-onkološka služba, Pediatrična klinika, Klinični center, Vrazov trg 1, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-03-13, sprejeto 1998-03-29; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-11-3

Ključne besede: akutne levkemije; kronična mieloična levkemija; alogenična presaditev; krvotvorne matične celice

Izvleček – Izhodišča. Alogenična presaditev krvotvornih matičnih celic je učinkovit način zdravljenja bolnikov z akutno in kronično mieloično levkemijo. Avtorji so v obdobju od leta 1989 do 1997 opravili 36 takih posegov pri bolnikih z različnimi vrstami levkemij. Pri 14 bolnikih s kronično mieloično levkemijo je bilo uspešnih 80% presaditev, pri 22 bolnikih z akutno levkemijo pa 50%. Najpogostejši vzrok smrti pri bolnikih s kronično mieloično levkemijo je bila intersticijska pljučnica s citomegalovirusom, pri akutni limfoblastni levkemiji relaps bolezni, pri akutni mieloblastni levkemiji pa poleg relapsa še neželeni učinki zdravljenja (reakcija presadka proti gostitelju, veno-okluzivna bolezen jeter, trombocitna trombocitopenična purpura). Avtorji v razpravi primerjajo svoje rezultate s podatki iz literature.

Zaključki. Uspešnost zdravljenja akutnih levkemij in kronične mieloične levkemije z alogenično presaditvijo krvotvornih matičnih celic v ljubljanskem Kliničnem centru je primerljiva s podatki, ki jih najdemo v literaturi drugih evropskih in ameriških centrov.

Key words: acute leukaemias; chronic granulocytic leukaemia; haematopoietic stem cells; allogeneic transplantation

Abstract—Background. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation is promising treatment for acute leukaemias and chronic granulocytic leukaemia. In the period from 1989 till 1997 authors performed 36 related allogeneic transplants for various types of leukaemia. The procedure was successful in 80% of patients with chronic granulocytic leukaemia and in 50% of patients with acute leukaemias. The most frequent cause of the death in patients with chronic granulocytic leukaemia was cytomegaloviral interstitial pneumonia and relapse in patients with acute lymphoblastic leukaemia. In patients with acute myeloblastic leukaemia authors, beside relapse observed also three causes of death related to the transplantation procedure (acute graft versus host disease, liver veno-occlusive disease and thrombotic-thrombocytopenic purpura). Authors discuss and compare their results with the published studies.

Conclusions. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation programme in University Medical Centre Ljubljana is running successfully and the results are comparable to the data published in the literature.

Uvod

Prve presaditve krvotvornih matičnih celic (PKMC) so v Sloveniji pričeli izvajati hitro za prvimi poizkusi takega zdravljenja po svetu. Tako je Černelč opravil prvo PKMC pri bolniku z akutno levkemijo že leta 1960 v Mariboru (1). V naslednjih letih so opravljali PKMC pri agranulocitozah in drugih okvarah kostnega mozga tudi v drugih slovenskih bolnišnicah (2, 3). Zaradi številnih zapletov in slabih uspehov zdravljenja so v naslednjih letih PKMC opustili. To zdravljenje se je ponovno uveljavilo šele v sedemdesetih letih po odkritju sistema tkivnih antigenov. V Sloveniji smo pričeli s sodobnim načinom PKMC leta 1989. O podrobnostih zdravljenja s PKMC in o naših izkušnjah smo že poročali tudi v Zdravniškem vestniku (4, 5).

Bolniki in metode dela

Pregledali smo dokumentacijo bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML), akutno limfoblastno levkemijo (ALL) in kronično mieloično levkemijo (KML), ki smo jih zdravili z alogenično PKMC na Kliničnem oddelku za hematologijo in na Pediatrični kliniki od začetka leta 1989 do konca leta 1997. Vse bolnike smo pripravili na presaditev s kombinacijo velikih odmerkov ciklofosfamida in frakcioniranim obsevanjem celega telesa ali pa s kombinacijo velikih odmerkov ciklofosfamida in busulfana, ne glede na vrsto levkemije. Za preprečevanje akutne reakcije presadka proti gostitelju (aGVHD) smo uporabljali kombinacijo ciklosporina in metotreksata. Bolnike smo pred PKMC in po njej osamili v enoposteljnih sobah s sistemom obratne osamitve. Okužbe v obdobju hude nevtropenije smo preprečevali s kombinacijo kinolonov (najpogosteje ciprofloksacin) in protiglivnih zdravil (flukonazol). Leta

1991 smo pričeli bolnike po PKMC zdraviti z dejavniki, ki spodbujajo nastanek kolonij granulocitov ter granulocitov in makrofagov (G-CSF in GM-CSF). Značilnosti bolnikov, uspeh zdravljenja in vzrok smrti so prikazani na tabelah 1 in 2.

Tab. 1. Značilnosti bolnikov z ALL in AML, ki smo jim opravili PKMC.

Tab. 1. Characteristics of the patients transplanted for ALL and AML.

Bolnik Patient	Starost Leta Age Years	Diagnoza Diagnosis	Datum PKMC Date of Tx	Datum dogodka Date of event	Vzrok smrti Cause of death
HM*	38	AML - S	01. 06. 1989	21. 01. 1997	REL
KJ	18	AML - 2R	09. 09. 1989	28. 11. 1989	HEPATITIS
JD	25	ALL - 1R	21. 11. 1991	/	/
VM	23	ALL - 1R	05. 03. 1992	/	/
IS	35	AML - 1R	21. 05. 1992	/	/
PE	35	AML - 1R	01. 10. 1992	/	/
LA	32	AML - 1R	18. 04. 1993	/	/
DI	3	AML - 1R	26. 05. 1993	/	/
PA	41	ALL - 1R	19. 08. 1993	06. 04. 1994	REL
DM	37	AML - 2R	07. 10. 1993	12. 04. 1994	REL
PM*	24	ALL - 1R	20. 01. 1994	27. 02. 1995	REL
GV	37	AML - 1R	31. 03. 1994	/	/
PR	38	AML - S	07. 10. 1994	/	/
HA	36	AML - 2R	08. 12. 1994	31. 12. 1994	VOD
PD	32	ALL - 1R	08. 06. 1995	/	/
TM*	27	AM - 1R	18. 01. 1996	05. 09. 1996	REL
ČI	47	AML - 1R	19. 09. 1996	30. 12. 1996	TTP
KT	5	ALL - 2R	19. 11. 1996	27. 01. 1997	REL
TD	23	ALL - 1R	05. 12. 1996	/	/
KM	18	ALL - 1R	27. 02. 1997	/	/
EF	37	AML - S	19. 03. 1997	07. 11. 1997	REL
KK	45	AML 1R	04. 07. 1997	27. 08. 1997	aGVHD

Bolniki označeni s * so imeli še drugo PKMC. Patients with * had second HSCT.

Legenda: AML - akutna mieloblastna levkemija (acute myeloblastic leukaemia); ALL - akutna limfoblastna levkemija (acute lymphoblastic leukaemia); S - sekundarna levkemija (secondary leukaemia); 1R - 1. remisija (first remission); 2R - 2. remisija ali napredovala bolezen (second remission or advanced disease); REL - relaps (relapse); VOD - veno-okluzivna bolezen jeter (veno-occlusive liver disease); TTP - trombotična trombocitopenična purpura (thrombotic-thrombocytopenic purpura); aGVHD - akutna reakcija presadka proti gostitelju (acute graft versus host disease).

Tab. 2. Značilnosti bolnikov s KML, ki smo jim opravili PKMC.

Tab. 2. Characteristics of the patients transplanted for CGL.

Bolnik Patient	Starost/Age Leta/Years	Datum PKMC Date of Tx	Datum dogodka Date of event	Vzrok smrti Cause of death
NS	29	21. 04. 1989	/	/
JA	26	30. 10. 1989	27. 12. 198	CMV-IP
OM	37	20. 09. 1990	/	/
ŽA	41	11. 04. 1991	/	/
LI	48	03. 12. 1992	/	/
PF	26	27. 01. 1993	/	/
HC	33	18. 11. 1993	/	/
MM	48	26. 05. 1994	14. 07. 1994	CMV-IP
GS	40	26. 01. 1995	/	/
MM	46	13. 04. 1995	/	/
PF	35	26. 10. 1995	/	/
GM	53	25. 04. 1996	/	/
VA	41	24. 10. 1996	12. 09. 1997	/
KO	30	23. 01. 1997	/	/

Legenda: CMV-IP - citomegalovirusna intersticijska pljučnica (cytomegaloviral interstitial pneumonia); ČS - prizadetost osrednjega živčevja (central nervous system involvement).

Rezultati

V devetletnem obdobju smo v Enoti za PKMC na Kliničnem oddelku za hematologijo in na Hematološkem oddelku Pediatrične klinike opravili skupno 60 PKMC. Od tega smo opravili 36 alogeničnih PKMC pri bolnikih z levkemijami, in sicer 14 pri bolnikih s KML ter 22 pri bolnikih z akutnimi levkemijami. Od tega 14 PKMC pri bolnikih z AML in 8 PKMC pri bolnikih z ALL. Pri dveh bolnikih

z AML in enem bolniku z ALL smo zaradi relapsa boleznii opravili še drugo PKMC. Pri teh treh smo presadili krvotvorne matične celice, ki smo jih po stimulaciji z rastnim dejavnikom granulocitne vrste (G-CSF) zbrali iz periferne krvi. Starost bolnikov s KML je bila od 26 do 53 let, mediana 38,5 let. Starost bolnikov z ALL in AML je bila od 3 do 47 let, mediana 33,5 let. Pri vseh bolnikih je prišlo do delovanja presadka.

Od 14 bolnikov s KML so umrli trije (21%). Dva bolnika sta umrla drugi mesec po PKMC zaradi pljučnice, ki jo je povzročil citomegalovirus, ena bolnica pa je umrla 11 mesecev po presaditvi zaradi nepojasnjene prizadetosti osrednjega živčevja, najverjetneje vaskulitisa zaradi kronične reakcije presadka proti gostitelju (GVHD). Vsi drugi bolniki so živi, brez kliničnih in laboratorijskih znakov ponovitve levkemije.

Od 22 bolnikov z ALL in AML je umrlo 11 bolnikov (50%), in sicer trije z ALL (37%) in osem z AML (57%). Pri vseh treh bolnikih z ALL je bil vzrok smrti ponovitev boleznii po PKMC. Od osmih bolnikov z AML so štirje umrli zaradi ponovitve boleznii, drugi pa zaradi različnih zapletov, vezanih na presaditev (jetna odpoved zaradi reaktivacije hepatitisa B, veno-okluzivna bolezen jeter, trombotična trombocitopenična purpura, septična okužba ob hudi akutni reakciji GVHD). Vsi trije bolniki, ki smo jim zaradi ponovitve levkemije opravili drugo PKMC, so umrli v kratkem času po presaditvi zaradi različnih zapletov, povezanih s posegom.

Razpravljanje

KML je s konvencionalnim zdravljenjem še vedno praviloma neozdravljiva bolezen. Alogenična PKMC, tako sorodna kot nesorodna, je znatno izboljšala napoved poteka te boleznii. Tako lahko s presaditvijo ozdravimo do 80% bolnikov (6, 7). Uspešnost presaditev, ki smo jih opravili v Ljubljani, se približuje tem odstotkom. S konvencionalnim zdravljenjem ALL in AML s kemoterapijo je možno trajno ozdraviti le majhno število teh bolnikov. Delež ozdravljenih bolnikov je okoli 10 do 40 odstotkov, odvisno od vrste levkemije (8, 9). Z alogenično PKMC ta odstotek povečamo na 40 do 70%. Uspešnost presaditve je odvisna od vrste prognozičnih dejavnikov, kot so starost bolnika, vrsta levkemije, citogenetične anomalije, stadij boleznii - prva remisija ali napredovala bolezen itd. (10-15). Odstotek uspešnih PKMC pri naših bolnikih z ALL je tak kot drugod. Nekoliko slabši pa so naši uspehi pri zdravljenju bolnikov z AML, saj je bilo zdravljenje neuspešno v več kot 50%. Taki rezultati so lahko ne naključni, zaradi majhnega števila opravljenih presaditev, bolj verjetno pa so posledica deleža bolnikov z AML s slabimi kazalniki napovedi poteka (sekundarne AML, AML v napredovalem obdobju boleznii). Takih bolnikov je bilo v naši skupini 6 od 14 (42%). Če upoštevamo samo bolnike s primarnimi AML v prvi remisiji boleznii, naraste uspešnost presaditev na 62 odstotkov, kar je primerljivo z uspehi drugih centrov. V naši državi opravimo večino alogeničnih PKMC pri bolnikih z levkemijami. V zadnjih letih smo opravili od 4 do 7 takih posegov, kar predstavlja približno 2 do 4 alogenične PKMC na leto na en milijon prebivalcev. S tem smo se približali številu alogeničnih PKMC na milijon prebivalcev v razvitih državah srednje Evrope (Madžarska, Češka, Slovaška, Hrvaška). Še vedno pa znatno zaostajamo za skandinavskimi državami, nekaterimi državami zahodne Evrope in Izraelom, kjer opravijo od 10 do več kot 20 sorodnih alogeničnih PKMC na en milijon prebivalcev (16). Menimo, da alogenična PKMC tudi v okviru naših možnosti tako glede opremljenosti enote za PKMC kot števila osebja, bistveno izboljša prognozo in možnosti popolne ozdravitve pri bolnikih z akutnimi levkemijami in KML.

Zaključek

Alogenična PKMC predstavlja učinkovit način zdravljenja bolnikov z akutno levkemijo in kronično mieloično levkemijo, ki ga tudi v naši državi izvajamo že devet let. Uspešnost zdravljenja ALL, AML in KML v naši enoti lahko primerjamo s podatki, ki jih najdemo v

literaturi. Tudi število alogeničnih PKMC na en milijon prebivalcev se v Sloveniji postopno približuje številu presaditev na en milijon prebivalcev v državah srednje Evrope in nekaterih državah bivšega vzhodnega bloka, medtem ko je celotno število alogeničnih presaditev še vedno majhno tako zaradi samega števila prebivalcev Slovenije kakor tudi majhnega števila primernih sorodnih darovalcev.

Literatura

- Černelč M, Kušar V, Mihev I. Nenavadna komplikacija po transplantaciji kostnega mozga. *Zdrav Vestn* 1962; 31: 17–20.
- Vidali P. Primer toksične okvare kostnega mozga in terapija s transplantacijo kostnega mozga. *Zdrav Vestn* 1964; 33: 178.
- Pogačnik M. Uspešna terapija agranulocitoze s transplantacijo kostnega mozga. *Zdrav Vestn* 1964; 33: 179.
- Pretnar J, Bohinjec M, Černelč P, Lukič L, Zwitter M. Presaditev kostnega mozga pri zdravljenju levkemij – naše prve izkušnje. *Zdrav Vestn* 1990; 59: 265–7.
- Pretnar J. Presajanje krvotvornih matičnih celic. *Zdrav Vestn* 1996; 65: 267–8.
- Gratwohl A. Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. *Bone Marrow Transpl* 1993; 12: 509–16.
- Clift RA, Buckner CD, Thomas ED et al. Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide. *Blood* 1994; 84: 2036–43.
- Roberts WM, Rivera GK, Raimondi SC et al. Intensive chemotherapy for Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1994; 343: 331–2.
- Chiu EKW, Chan LC, Liang R et al. Poor outcome of intensive chemotherapy for adult acute lymphoblastic leukemia – a possible dose effect. *Leukemia* 1994; 8: 1469–73.
- Sebban C. Allogeneic bone marrow transplantation in adult acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: a comparative study. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2580–7.
- Reiffers J, Stoppa AM, Rigal-Huguet F et al. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation versus chemotherapy for treatment of acute myeloid leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: Suppl 2: 36.
- Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1995; 332: 217–23.
- Blaise D, Gaspard AM, Stoppa AM et al. Allogeneic or autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant* 1990; 5: 7–12.
- Chao NJ, Forman SJ, Schmidt GM et al. Allogeneic bone marrow transplantation for high-risk acute lymphoblastic leukemia during first complete remission. *Blood* 1991; 78: 1923–7.
- Buckner CD, Clift RA. Allogeneic transplantation in acute myelogenous leukemia: are we stuck? *Leukemia and Lymphoma* 1993; 11: Suppl 2: 25–8.
- Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1995. *Bone Marrow Transpl* 1997; 19: 407–19.

DIFLUCAN*

(flukonazol)



Hitro zdravljenje glivičnih okužb z dolgotrajnim učinkom

- pri glivičnih okužbah kože
- pri vaginalni kandidijazi
- pri oportunističnih glivičnih okužbah

Povzetek informacij za predpisovanje zdravila

Indikacije in odmerki: glej tabelo. **Uporaba pri starejših:** kot je navedeno v tabeli, razen pri ljudeh z ledvičnimi okvarami pri katerih so potrebni manjši odmerki - glej popolne informacije za predpisovanje. **Uporaba pri otrocih:** pri otrocih ne smemo preseči najvišjega dnevnega odmerka, ki je primeren za odrasle - glej popolne informacije za predpisovanje in priporočljive odmerke za otroke. **Dajanje zdravila:** DIFLUCAN lahko dajemo oralno ali v obliki intravenske infuzije. Odmerki so pri obeh načinih enaki. **Kontraindikacije:** Znana preobčutljivost na flukonazol ali sorodne triazole. **Opozorilo:** Pri bolnikih, pri katerih pride do pomembnega povečanja jetrnih encimov, moramo pred nadaljevanjem zdravljenja z DIFLUCANOM oceniti razmerje med tveganjem in koristnostjo. Poročajo tudi o anafilaktičnih reakcijah. **Varnostni ukrepi:** Ker so na voljo le omejeni podatki, odsvetujemo uporabo pri nosečnicah, razen kadar se zdi to lečečemu zdravniku nujno potrebno. **Dojenje:** ne priporočamo uporabe. **Interakcije z drugimi zdravili:** Potrebno je skrbno spremljanje bolnikov, ki istočasno jemljejo antikoagulanse, oralno sulfonilurejo ali fenitoin, ciklosporin in teofilin. Pri bolnikih, ki istočasno jemljejo rifampicin, so morda potrebni večji odmerki DIFLUCANA. **Stranski učinki:** Najpogostejši stranski učinki so vezani na gastrointestinalni trakt: slabost, abdominalna nelagodje, diareja in vetrovi. Poročajo tudi o kožnem izpuščaju. Pri bolnikih s hudo osnovno boleznijo so med zdravljenjem z DIFLUCANOM in primernimi učinkovinami opazili spremembe v testnih rezultatih ledvičnih in hematoloških funkcij ter bolezenske spremembe jeter, vendar pa sta klinična pomembnost in povezava z zdravljenjem še nepotrjeni.

Na željo posredujemo dodatne informacije. Pred predpisovanjem DIFLUCANA se je potrebno seznaniti s celotnimi informacijami za predpisovanje zdravila.

Glivične okužbe kože in onihomikoze

Odmerki:
50 mg/dan ali
150 mg/eden*

*za tinea versicolor je priporočljiv odmerek 50 mg/dan

Trajanje:
2-4 tedne**

**za tinea pedis je morda potrebno 6 tedensko zdravljenje

3-6 mesecev***

***onihomikoze

Vaginalna kandidijaza

Odmerek:
150 mg

Trajanje:
Enkratni odmerek

Sistemska kandidijaza

Odmerki:
400 mg (prvi dan)
200-400 mg/dan

Trajanje:
Odvisno od
kliničnega odziva

Profilaksa:
50 mg/dan

Orofaringealna in sluznična kandidijaza

Odmerki:
50 mg/dan*

*pri zelo hudih okužbah sluznice je morda potrebno 100 mg/dan

Trajanje:
1-2 tedna**

**pri okužbah sluznice je morda potrebno 30 dnevno zdravljenje

Profilaksa:
50 mg/dan

Kriptokoki meningitis

Odmerki:
400 mg (prvi dan)
200-400 mg/dan

Trajanje:
6-8 tednov

Profilaksa:
200 mg/dan



* Blagovna znamka Pfizer Inc.

Pfizer International Corporation

Podružnica Ljubljana
Dunajska 156, 1113 Ljubljana - Slovenija
tel.: 061/188 12 76

Strokovni prispevek/Professional article

AVTOLOGNA PRESADITEV KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC PRI OTROCIH S SOLIDNIMI TUMORJI IN NAŠE IZKUŠNJE

AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION FOR SOLID TUMORS IN CHILDREN AND OUR EXPERIENCES

Majda Benedik-Dolničar, Jožica Anžič

Služba za onkologijo in hematologijo, Pediatrična klinika, Klinični center, Vrazov trg 1, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-04-07, sprejeto 1998-04-16; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-15-8

Ključne besede: otrok; rak; visoko odmerjena kemoterapija; kostni mozeg

Izveček – Izhodišča. Uspešnost zdravljenja otrok s solidnimi tumorji in zasevki oz. ponovitvijo bolezni je slaba. Zato intenzivno preučujejo načine zdravljenja s povečanimi odmerki kemoterapije s presaditvijo krvotvornih matičnih celic. Predstavljamo ta način zdravljenja pri pogostejših solidnih tumorjih otrok in pri štirih lastnih bolnikih.

Zaključki. Čeprav je minilo že skoraj 20 let od prvih poizkusov, pa do danes še ni uspelo dokazati odločilnega pomena tega zdravljenja pri solidnih tumorjih otrok, razen pri neuroblastomu z zasevki.

Key words: child; cancer; high-dose chemotherapy; bone marrow

Abstract – Background. Efficiency of treatment for children with solid tumors with metastases at presentation or with recurrent disease is rather bad with conventional treatment. More intensive treatment modalities with autologous stem cell rescue is in spotlight of current research. We report our experiences in autologous bone marrow transplantation in treatment of solid malignancies in four patients.

Conclusions. Although almost 20 years after first attempts, except in treatment of metastatic neuroblastoma, superiority of this treatment in children with solid malignancies with bad prognostic features is still not convincingly proved.

Uvod

Letno zbolijo za rakom 11/100000 otrok do 15 leta starosti, kar pomeni v Sloveniji približno 50 otrok. V Sloveniji, tako kot tudi v razvitih državah, zdravimo mladostnike do dopolnjenega 18 leta praviloma v otroški ustanovi, kjer imajo zagotovljeno nadaljevanje šolanja in možnosti za druge dejavnosti, ki jih potrebujejo za čim manj moten razvoj. Tako obravnamo vsako leto približno 60 otrok, ki na novo zbolijo za rakom.

Najpogostejša maligna bolezen pri otrocih je levkemija (30%), sledijo tumorji osrednjega živčnega sistema (20%), limfomi (13%), neuroblastom (6,8%), skupina tumorjev mehkih tkiv (6,2), kjer je najpogostejši rhabdomyosarkom, Wilmsov tumor (5,7%), kostni tumorji (4,7%), očesni tumorji (2,5), germinalni tumorji (2,4), tumorji jeter (1,3%) in različni drugi zelo redki tumorji (7,4%). Danes je dolgotrajno preživetje otrok z vsemi oblikami raka približno 60-odstotno.

Presaditev krvotvornih matičnih celic pri otrocih s solidnimi tumorji

Uspešnost zdravljenja otrok s solidnimi tumorji z zasevki oz. ponovitvijo bolezni je slaba. Zato intenzivno preučujejo zdravljenje z zelo visokimi odmerki citostatikov z obsevanjem celega telesa ali brez t.i. mieloablativno zdravljenje (MAZ), ki povzroči trajno popolno odpoved kostnega mozga, če zdravljenju ne priključimo še

presaditve krvotvornih matičnih celic (KMC). Ker je dokazano, da MAZ s presaditvijo KMC lahko pozdravi bolnike z malignimi krvnimi boleznimi, ki se niso odzvale na običajno zdravljenje, so v poznih 70. letih pričeli s takim zdravljenjem še pri solidnih tumorjih s slabo napovedjo poteka. Izbrali so najprej citostatike, ki imajo dokazano povečan učinek na tumor ob povečanem odmerku. Ti citostatiki morajo biti toksični za kostni mozeg, a povzročati čim manj okvar drugih organov in čim manj poznih posledic. Te zahteve izpolnjuje alkilirajoči citostatik melfalan, ki je predvsem toksičen le za kostni mozeg in sicer premosorazmerno odmerku. Ima kratko razpolovno dobo, kar omogoča uporabo kostnega mozga, ki ni zmrznjen in je dokazano učinkovit v visokih odmerkih pri otroških solidnih tumorjih, ki so neobčutljivi na običajno zdravljenje ali se po običajnem zdravljenju ponovijo. Poleg melfalana, ki je najpomembnejši, pa nekatere sheme vključujejo tudi visoke odmerke etopozida, thiope, ciklofosfamide, busulfana, karboplatina in doksorubicina, vendar še ni dokazano, da je kakršnakoli kombinacija boljša od samega melfalana (1).

Danes celo pri majhnih otrocih s telesno težo 8 do 10 kg vedno več uporabljamo avtologno presaditev perifernih krvotvornih matičnih celic (PKMC). Dokazali so, da število nevtrofilcev in trombocitov pri tem načinu dosti hitreje poraste kot po avtologni oz. alogenični presaditvi kostnega mozga z uporabo rastnih dejavnikov hematopoeze ali brez. Uspešnost PKMC je odvisna od števila matičnih celic (CD 34⁺), ki jih zberemo v periferni krvi (prag za hitro obnovitev hematopoeze je 2-krat 10⁶ CD 34⁺ celic/kg TT) (1). Zapleti niso pogostejši, pa tudi obdobja brez ponovitve bole-

zni se ne spremenijo. Celoten postopek je cenejši za 17% pri odraslih in celo za 29% pri otrocih. Klinični in ekonomski razlogi torej govorijo v prid avtologni presaditvi PKMC pri solidnih tumorjih (2).

Zaradi nevarnosti, da presadimo tudi tumorske celice, moramo kakovost presadka PKMC tako kot avtologni presadek kostnega mozga, preveriti z ustreznimi laboratorijskimi tehnikami, ki so odvisne tudi od vrste tumorja. V uporabi je metoda polimerazne verižne reakcije (PCR) in dokazovanje tumorskih celic s specifičnimi monoklonskimi protitelesi. V preteklosti so uporabljali za očiščenje kostnega mozga mafosamid ali imunomagnetno tehniko, kar pa je podaljšalo obdobje aplazije za en teden. Glavno težavo predstavlja zbiranje kostnega mozga oz. PKMC čim bolj zgodaj v procesu zdravljenja, ko matične celice še niso osiromašene ali poškodovane in je zato njihov izkoristek večji, ob tem pa naj ne bi bilo tumorskih celic (1).

Vendar je uspešnost zbiranja matičnih celic pri solidnih tumorjih še vprašljiva, ker je za zdaj še vedno težko povsem odstraniti tumorske celice. Z današnjimi tehnikami lahko zmanjšamo delež tumorskih celic največ za 1–4 logaritme, pri tem pa izgubimo do 50% CD 34⁺ celic. Alogenična presaditev KMC zaenkrat ni dala boljših uspehov zdravljenja (1).

Postopki presajanja KMC so zvišali preživetje pri bolnikih z nevroblastomom in Ewingovim sarkomom z metastazami za 30% (1). Kljub temu pa, razen pri nevroblastomu, pomen tega načina zdravljenja pri solidnih tumorjih še ni dokazan, ker so vsi podatki še vedno le rezultat posameznih študij.

Nevroblastom

Nevroblastom, ki je najbolj pogost solidni tumor pri otroku zunaj centralnega živčnega sistema, je sicer redek tumor. Pojavlja se pri 0,7 do 1 otroku / 100000 otrok letno do 15 leta, večinoma že do 5 leta starosti. 70% bolnikov uvrstimo glede na starost (več kot eno leto), stadij (4 po mednarodni klasifikaciji stadijev nevroblastoma) in/ali neugodno histologijo in biologijo (pomnožitev kopij onkogene N-myc) v skupino z visokim tveganjem. Pri približno 85% teh bolnikov je odgovor na kemoterapijo, ki vključuje tudi cisplatin, dober, vendar se pri večini bolnikov bolezen kasneje ponovi (3). Ko so uvedli še MAZ s presaditvijo kostnega mozga, so ugotovili, da ni izrazilo boljših rezultatov, le bolezen se je ponovila kasneje (4). Vloga obsevanja celega telesa še ni povsem razjasnjena. Čeprav je nevroblastom radiosenzitiven tumor, pa je odmerek pri obsevanju celega telesa le 12 GY, kar je manj, kot je dokazani učinkoviti odmerek pri nevroblastomu (od 20–35 GY), ki pa povzroča pomembne pozne posledice. Dokazali so enako učinkovitost le z visoko odmerjeno kemoterapijo s thiotepo in ciklofosamidom brez obsevanja celega telesa (3). Pri nekaterih bolnikih so namesto obsevanja uporabili zdravljenje z 131-J-metajodbenzilguanidinom (MJBG) v odmerku od 100 do 300 mCi, ki ga kopicijo tkiva in tumorji nevrálnega grebena (5,6). Poleg tega, da lahko uniči tumor, je toksičen le za kostni mozeg, vendar v glavnem le, če je infiltriran z malignimi celicami. Uspešnost tega načina je bila 57%, vendar brez dolgotrajnih remisij. Da bi povečali učinkovitost tega načina obsevanja, so uvedli še hiperbarično komoro za povečanje oksigenacije tumorja (7). Poizkušali so tudi z novimi načini zdravljenja, n.pr. z retinoidno kislino, da bi sprožili diferenciacijo nevroblastomskih celic v benigne ganglionevrome (4).

Vseeno pa MAZ in avtologna presaditev KMC očiščenih tumorskih celic, v prvi popolni ali zelo dobri remisiji omogoča, da preživi 5 let 35–50% bolnikov (8). To pa je v primerjavi z le 5–18% pri konvencionalni kemoterapiji bistven napredek (9). Ni pa še povsem jasno, ali z intenzivno kemoterapijo, operacijo in lokalnim obsevanjem dosežemo bistveno slabše rezultate (8).

Dober odziv na kemoterapijo je pomemben za napoved poteka uspešnosti presaditve KMC.

Avtologna presaditev KMC po MAZ lahko izboljša prognozo nevroblastoma z visokim tveganjem, vendar je uspešnost tega načina odvisna od prisotnosti tumorskih celic. Nedavno so odkrili, da so

preostale nevroblastomske celice zelo klonogene in povzročajo ali pripomorejo k ponovitvi bolezni. Zato skušajo tumorske celice odstraniti iz presadka z različnimi laboratorijskimi tehnikami – z imunoadsorpcijo ali imunomagnetno pozitivno selekcijo osamijo le CD34⁺ matične celice (10). Anti-GD2 protitelo pa ima neposreden citotoksičen učinek na nevroblastomske celice. Ko bo to protitelo na voljo komercialno, bo lahko učinkovito odstranilo oz. zmanjšalo nevroblastomske celice in vitro (1). Najpogostejši vzrok neuspešne presaditve matičnih celic je prisotnost tumorskih celic v telesu ali v avtolognem presadku KMC (10). Kajti nevroblastomske celice v krvnem obtoku so zelo klonogene in tvorijo tumor. Metode čiščenja pa so omejene, v najboljšem primeru zmanjšajo delež tumorskih celic za 2–4 logaritme. Nevroblastomske celice so označili z genom, ki je rezistenten na neomicin. Nato so pri bolnikih s presaditvijo neočiščenega kostnega mozga te celice dokazali na mestu ponovitve bolezni. Vse to dokazuje, da vrnjene nevroblastomske celice odločilno prispevajo k ponovitvi bolezni (3).

Rabdomiosarkom

Bolniki z mehko tkivnimi sarkomi z zasevki ob odkritju bolezni, rabdomiosarkom je med njimi najpogostejši, imajo zelo slabo napoved poteka. Tisti, ki imajo zasevke v pljučih, imajo le 10–20% možnosti preživetja, z zasevki v kosteh ali kostnem mozgu pa manj kot 10%. Pomembno je odmerjanje in sestava kemoterapije. Kaže, da je intenzivna kemoterapija z odmerki obsevanja, ki so dokazano učinkoviti za to vrsto bolezni, odločilnejše za izboljšanje zdravljenja kot pa presaditev kostnega mozga ali PKMC.

Ewingov sarkom

Ewingov sarkom je maligni nediferencirani tumor, ki izhaja večično iz kosti in redkeje iz mehkih tkiv. Danes so dokazali klinično in v poizkusih, da izhaja iz primitivnega nevrálnega tkiva (11). S povečanjem odmerkov ifosfamida, vinkristina, doksorubicina z ali brez etopozida, se je povečal delež bolnikov brez ponovitve bolezni po treh letih od odkritja na približno 70%. Kljub intenzivnejšemu prvemu zdravljenju pa še vedno najdemo podskupine bolnikov n.pr. z zasevki ob odkritju bolezni, predvsem v kostnem mozgu in kosteh, z obsežnim primarnim tumorjem (pogosto aksialnega izvora kot je medenica). Pri teh bolnikih je dolgotrajno preživetje le 20–30%, tako kot pri bolnikih s ponovitvijo bolezni (1, 11, 12). Študija kaže, da obsevanje celega telesa, melfalan in etopozid v visokih odmerkih s karboplatinom ali brez ter presaditev KMC v obdobju, ko ni več mogoče dokazati bolezni, lahko podaljša preživetje teh bolnikov na 45 +/- 12% v 6 letih od začetka zdravljenja. Druga študija pa govori, da je busulfan v zelo visokih odmerkih in melfalan brez obsevanja vsega telesa uspešen v 52% po 3 letih od diagnoze (1). V raziskavi, v katero je bilo vključenih 17 bolnikov s slabo napovedjo, pa se je pokazalo, da v vseh 4 primerih z alogenično presaditvijo kostnega mozga ni prišlo do ponovitve bolezni, v ostalih 13 primerih z avtologno presaditvijo, pa kar v osmih. Zato so v novem poizkusu s 13 bolniki, petim dodali poleg avtologne presaditve kostnega mozga še interleukin-2, da bi sprožil antitumorske mediatorje (ena ponovitev bolezni), 8 pa ne (5 ponovitev bolezni). Sklepali so, da bi morda še boljše rezultate lahko dosegli z imunološkimi antitumorskimi mehanizmi, ne pa z dodatnim povečevanjem odmerkov kemoterapije in obsevanjem (11).

Možganski tumorji

Tumorji osrednjega živčnega sistema so najbolj pogost soliden tumor v otroški dobi.

Visoko maligni glialni tumorji so z običajnim zdravljenjem praviloma smrtni. Manj kot 10% otrok z nepopolno kirurško odstranitvijo gliomom 4. stopnje malignosti živi 1 leto; nobeden pa ne več

po 3 letih. Dodatno obsevanje podaljša preživetje po 3 letih na manj kot 10%. Čeprav so ti tumorji nedvomno občutljivi na kemoterapijo, je malo dokazov, da bi dodatna kemoterapija po operaciji in obsevanju razen pri določenih skupinah meduloblastoma povečala preživetje. Kemoterapija je pri teh bolnikih slabo učinkovita morda zato, ker v standardnih odmerkih zaradi pregrade ne doseže osrednjega živčnega sistema.

Poizkusili so s kombinacijo zelo visokih odmerkov thiope in ciklofosfamida ter hiperfrakcioniranim obsevanjem (lahko zmanjša kasne posledice obsevanja na normalnem možganskem tkivu) primarnega tumorja in avtologno presaditvijo kostnega mozga pri bolnikih z difuznim, infiltrativno rastočim gliomom možganskega debla in astrocitomom 3. ali 4. stopnje. Skupina je imela le 9 bolnikov. Pri dveh je bil dokazan delni odgovor na kemoterapijo. Po dodatnem obsevanju sta bila dva otroka (eden z majhnim in eden z delnim odgovorom na kemoterapijo) v popolni remisiji, ki je trajala več kot 22 mesecev. Mogoče bodo dodatne študije odkrile bolnike, ki bodo najverjetneje odgovorili na kombinacijo obsevanja in visoko odmerjeno kemoterapijo (13).

Kaže, da zdravljenje ponovitve meduloblastoma z MAZ in presaditvijo KMC obeta več. Ker povzroča obsevanje kraniospinalne osi otrok pred 3. letom starosti težke pozne posledice, zdaj v mnogih centrih zdravijo meduloblastom po operaciji z običajno kemoterapijo, da lahko obsevanje odložijo na kasneje ali pa sploh ne obsevajo. Če se je bolezen ponovila, so jih po operaciji zdravili z busulfanom in thiopepo v visokih odmerkih ter presaditvijo kostnega mozga, kasneje pa so še lokalno obsevali tumor. Pri polovici od 20 bolnikov, so dosegli približno 31 mesečno obdobje brez bolezn. MAZ naj bi torej bilo učinkovito pri ponovitvi meduloblastoma (1).

Wilmsov tumor (nefroblastom)

Večino otrok z Wilmsovim tumorjem lahko pozdravimo s kemoterapijo in operacijo. Nekateri potrebujejo še obsevanje. Pri okoli 20% vseh se bolezen ponovi in polovica teh jih umre (14). Pri neugodnem rabdoidnem histološkem podtipu z nelokalizirano boleznijo, kjer je ozdravljenje še vedno manjše kot 30%, in nekaterih prognostično slabih oblikah ponovitve lahko z MAZ in KMC dosežemo ozdravljenje. Pred presaditvijo so uporabljali visoke odmerke melfalana in vinkristina pa tudi etopozida ter karboplatina. Vse kaže, da je tak način zdravljenja pri rezistentnem ali tumorju s slabo napovedjo poteka upravičen. Teoretično lahko Wilmsov tumor, ki je zelo občutljiv na kemoterapijo, tako kot B celični ne-Hodgkinov limfom ozdravimo pri ponovitvi z zvišanimi odmerki enakih citostatikov, kot jih je bolnik dobil prvič (1).

Retinoblastom

Zdravljenje retinoblastoma je uspešno v več kot 90%. Zlasti hematogeno razširjen retinoblastom zunaj očesa ima še vedno slabo napoved poteka. Ker pa je retinoblastom občutljiv na kemoterapijo, je zdravljenje s kemoterapijo in obsevanjem pri razširjeni boleznijo zunaj očesa uspešno v več kot 50%. Opisan je bolnik s ponovitvijo boleznijo z oddaljenimi zasevki, ki je bil še 17 mesecev po presaditvi kostnega mozga brez znakov bolezn. Remisijo boleznijo so dosegli z običajno intravensko in intratekalno kemoterapijo, nato pa so mu po cisplatinu, etopozidu, melfalanu v visokih odmerkih obsevali celo telo (12 GY) in opravili avtologno presaditev kostnega mozga. Z monoklonskimi protitelesi so ob odvzemu kostnega mozga dokazali, da ni bilo več malignih celic (15).

Naše izkušnje

Na hematoonkološkem oddelku Pediatrične klinike v Ljubljani smo v obdobju od začetka leta 1991 do konca leta 1996 presadili avtologni kostni mozeg pri 4 otrocih s solidnim tumorjem z zasevki. Dva otroka sta imela nevroblastom, dva pa rabdomyosarkom.

Predstavitev bolnikov z nevroblastomom

Bolnik 1

Pri dečku, starem 13 mesecev, smo maja 1991 dokazali nevroblastom v levi nadledvični žlezi, v stadiju II. Zdravljen je bil le z operacijo. Julija 1992 smo ponovno odkrili nevroblastom, tokrat z zasevki v kostnem mozgu in kosteh. Pred avtologno presaditvijo kostnega mozga je prejel intravensko en krog kemoterapije (ciklofosfamid, cisplatin, tenipozid), dvakrat MJBG v odmerku 150 in 100 mCi. Ko ni bilo več znakov aktivne boleznijo smo odvzeli kostni mozeg (brez čiščenja). Zatem je prejel še dva kroga kemoterapije (vinkristin, DTIC, ifosfamid, adriamicin oz. vindezin, cisplatin, etopozid). Aprila 1993 je bila po visokih odmerkih karboplatina in melfalana opravljena avtologna presaditev kostnega mozga, kljub znakom začetnega napredovanja boleznijo. 17. dan po avtologni presaditvi kostnega mozga je umrl zaradi sepse. Pri obdukciji so ugotovili zasevke tumorja v lobanji in spodnjem delu desne stegenice.

Bolnik 2

Deklica, stara 7 let in pol je bila sprejeta na kliniko zaradi nevroblastoma z zasevki v kostnem mozgu (stadij IV) avgusta 1992. Po enem krogu ciklofosfamida, cisplatinu, tenipozidu je prejela MJBG 100 in 142 mCi i.v. ter še dva kroga kemoterapije (vinkristin, DTIC, ifosfamid, adriamicin oz. vindezin, cisplatin, etopozid). Po tem zdravljenju pri citološkem pregledu nismo več našli malignih celic v kostnem mozgu in deklici je kirurg odstranil ostanek še delno vitalnega tumorja leve nadledvične žleze. Nato je prejela še dva kroga enake kemoterapije. Ob tem ji je bil dvakrat odvzet kostni mozeg (brez čiščenja). Junija 1993 je bila po visokih odmerkih karboplatina in melfalana opravljena avtologna presaditev kostnega mozga. Junija 1995 je bila dokazana ponovitev nevroblastoma v trebuhu ob aorti levo, v mediastinumu in v kosteh. Po 6-mesečnem poizkusu zdravljenja z MJBG 200 in 100 mCi v kombinaciji z hiperbarično komoro ter enim ciklusom kemoterapije (karboplatin, etopozid) je deklica umrla zaradi intrakranialne krvavitve v času delne remisije boleznijo.

Predstavitev bolnikov z rabdomyosarkomom

Bolnik 1

Devet let star deček je bil zaradi rabdomyosarkoma mehkih tkiv leve dlani s številnimi kostnimi zasevki sprejet oktobra 1995. leta. Prejel je 8 krogov izmenjajoče se intenzivne kemoterapije (epirubicin, karboplatin, vinkristin; aktinomycin D, ifosfamid, vinkristin oz. etopozid, ifosfamid, vinkristin) po shemi SIOP-a za mehko tkivne tumorje z zasevki. Po 6 krogih, ko je bil brez kliničnih znakov boleznijo, smo mu odvzeli kostni mozeg. Med nadaljevanjem kemoterapije je bil še obsevan na vseh znanih mestih tumorja z 47 do 50 GY. Junija 1996 je sledila zelo visoko odmerjena kemoterapija z melfalanom in avtologna presaditev kostnega mozga. Posledice zdravljenja so alopecija v področju obsevanja glave, težave pri odvajanju vode ter pareza spodnjih okončin. Marca 1998 se je bolezen ponovila v trebuhu ob hrbtenici, deloma še v področju, kjer je bil obsevan.

Bolnik 2

Deklica, stara 10 let, je bila sprejeta junija 1996 zaradi rabdomyosarkoma desne golene v stadiju IV (zasevki v oddaljenih bezgavkah in hilusu pljuč). Po 8 krogih izmenjajoče se intenzivne kemoterapije po shemi SIOP-a za mehko tkivne tumorje z zasevki smo ji, ko je bila bolezen v delni dobri remisiji, odvzeli kostni mozeg. Obsevanje primarnega mesta tumorja je prejela pri 7. in 8. ciklu kemoterapije v odmerku 41 GY, v področju zasevkov v bezgavkah pa od 16 do 36 GY. Pred presaditvijo kostnega mozga aprila 1997 je prejela še en ciklus enake kemoterapije in zelo visoko odmerjeni melfalan. Pet mesecev kasneje smo dokazali ponovitev boleznijo v desnih dimeljskih bezgavkah, ki so bile obsevane z 36 GY. Boleznijo je bilo največ v bezgavkah ob aorti, kjer je prej ni bilo. Aktivna bolezen pa je bila dokazana tudi v bezgavki desno nad ključnico. Decembra 1997 je umrla.

Sklep

Pri solidnih tumorjih otrok s slabo napovedjo poteka intenzivno preučujejo načine zdravljenja s povečanimi odmerki s presaditvijo krvotvornih matičnih celic ali brez. Mogoče bo boljše razumevanje in izraba učinka medsebojnega delovanja zdravil in farmako-

kinetike premagalo mehanizme celične rezistence. Čeprav je minilo že skoraj 20 let od prvih poizkusov pa do danes še ni uspelo dokazati odločilnega pomena tega zdravljenja pri solidnih tumorjih otrok, razen pri nevroblastomu z zasevki. Potrebno je počakati na rezultate mednarodnih randomiziranih študij, če bodo dokazale učinkovitost tega zelo toksičnega in dragega načina zdravljenja (1).

Naše izkušnje s prvimi avtolognimi presaditvami kostnega mozga pri solidnih tumorjih dokazujejo, da je takšno zdravljenje tudi pri nas izvedljivo. Zaenkrat v Sloveniji zaradi pomanjkanja ustreznih naprav še ni možno čiščenje kostnega mozga oz. selekcija krvotvornih matičnih celic. Širitev indikacij bomo sprejeli, ko bodo znani rezultati ustreznih večjih študij in ko bodo sprejeta ustrezna priporočila SIOP-a.

Literatura

- Ladenstein R, Philip T, Gardner H. Autologous stem cell transplantation for solid tumors in children. *Curr Op Ped* 1997; 9: 55-69.
- Hartman O, Le Corroller AG, Blaise D et al. Peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for solid tumors and lymphomas: Hematologic recovery and costs. A randomized, controlled trial. *Ann Inter Med* 1997; 126: 600-7.
- Kletzel M, Abella EM, Sandler ES et al. Thiotepa and cyclophosphamid with stem cell rescue for consolidation therapy for children with high-risk neuroblastoma: A phase I/II study of the pediatric blood and marrow transplant consortium. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 49-54.
- Robertson KA. Pediatric bone marrow transplantation. *Curr Op Ped* 1993; 5: 103-9.
- Mastrangelo R, Lasorella A, Iavarone A et al. Critical observations on neuroblastoma treatment with 131-I-Metaiodobenzylguanidine at diagnosis. *Med Pediatr Oncol* 1993; 21: 411-5.
- De Kraker J, Hoefnagel CA, Caron H, Voute PA, Tiel van Buul MMC, Valdes Olmos R. Targeted radiotherapy with iodine-131-meta-iodobenzylguanidine (MIBG) as first line treatment of neuroblastoma advanced disease patients. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23: 179-9.
- Voute PA, Van der Kleij AJ, De Kraker J, Hoefnagel CA. M-131-IBG treatment of patients with relapsed neuroblastoma combined with oxygen treatment under hyperbaric conditions. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23: 179-9.
- Sanders JE. Bone marrow transplantation for pediatric malignancies. In: Link MP ed. *Pediatric Oncology*. *Pediatr Clin North*. 1997; 44: 1005-20.
- Kremens B, Klingebiel T, Herrmann F et al. High-dose consolidation with local radiation and bone marrow rescue in patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23: 470-5.
- Tchirkov A, Kanold J, Giollant M et al. Molecular monitoring of tumor cell contamination in leukapheresis products from stage IV neuroblastoma patients before and after positive CD34 selection. *Med Pediatr Oncol* 1998; 30: 228-32.
- Sandoval C, Meyer WH, Parham DM et al. Outcome in 43 children presentation with metastatic Ewing sarcoma: The St. Jude children's research hospital experience, 1962 to 1992. *Med Pediatr Oncol* 1996; 26: 180-5.
- Hartman O, Valteau-Couanet, Benhamou E. Chimiothérapie à hautes doses suivie d'autogreffe de moelle dans les tumeurs solides de l'enfant: les arguments pour. *Bull Cancer* 1995; 82: 36-41.
- Kedar A, Maria BL, Graham-Pole J et al. High-dose chemotherapy with marrow reinfusion and hyperfractionated irradiation for children with high-risk brain tumors. *Med Pediatr Oncol* 1994; 23: 428-36.
- Garaventa A, Hartmann O, Bernard JL et al. Autologous bone marrow transplantation for pediatric Wilms tumor: The experience of the European bone marrow transplantation solid tumor registry. *Med Pediatr Oncol* 1994; 22: 11-4.
- Saarinne UM, Sariola H, Hovi L. Recurrent disseminated retinoblastoma treated by high-dose chemotherapy, total body irradiation, and autologous bone marrow rescue. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991; 13: 315-9.

Pregledni prispevek/Review article

ZDRAVLJENJE SOLIDNIH TUMORJEV ODRASLIH Z ZELO VELIKIMI ODMERKI CITOSTATIKOV IN AVTOLOGNO PRESADITVIJO KRVOTVORNIH MATIČNIH CELIC

HIGH DOSE CHEMOTHERAPY WITH AUTOLOGOUS PERIPHERAL BLOOD STEM CELL SUPPORT IN SOLID TUMOURS IN ADULTS

Branko Zakotnik,¹ Bojana Pajk,¹ Jože Pretnar²

¹ Onkološki inštitut, Zaloška 2, 1105 Ljubljana, Slovenija

² Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana, Slovenija

Prispelo 1998-04-10, sprejeto 1998-04-17; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-19-22

Ključne besede: zdravljenje s citostatiki; maligne bolezni; matične celice

Key words: high dose chemotherapy; solid tumours

Izvleček – Izhodišča. Zdravljenje s citostatiki je poleg kirurške odstranitve tumorja in obsevanja z ionizirajočimi žarki pomemben način zdravljenja pri bolnikih s solidnimi tumorji (karcinomi, germinalni tumorji, sarkomi, melanom). Z običajnimi odmerki citostatikov se uspeh zdravljenja pri večini razsejanih solidnih tumorjev (razen germinalnih) v zadnjih letih ni izboljšal. Za vrsto citostatikov so dokazali, da je učinek na tumor sorazmeren z odmerkom zdravila. Večanje odmerkov nekaterih citostatikov je omogočila uporaba citokinov, predusem pa autologna presaditev krvotvornih matičnih celic, ki znatno skrajšajo obnovev kostnega mozga po zdravljenju. Z velikimi odmerki citostatikov in avtologno presaditvijo krvotvornih matičnih celic zdravimo nekatere bolnike s karcinomom dojke in bolnike z germinalnimi tumorji, v manjši meri pa bolnice s karcinomom jajčnikov, mikrocelularnim karcinomom pljuč, gliomom in Ewingovim sarkomom. Pri drugih solidnih tumorjih ta način zdravljenja zaenkrat ni uspešen.

Abstract – Background. Chemotherapy is besides surgery and radiotherapy an important mode of treatment in patients with solid tumours (carcinoma, germinal tumours, sarcoma, melanoma). There has been little improvement in the effectiveness of conventional dose chemotherapy in most common solid tumours in recent years. It has been demonstrated that the dose response curve is very steep for most cytostatic agents, and therefore it seemed rational that with higher doses of these drugs a higher cure rate could be achieved. Very high doses of some cytostatic drugs could be applied with many new approaches of supportive care, mainly autologous peripheral stem cells that substantially shorten the period of aplasia. Such treatment is currently used in many prospective clinical trials in breast cancer, germinal tumours, ovarian cancer, microcellular lung cancer, gliomas and Ewing sarcoma. In other solid tumours it seems that high dose chemotherapy as it is used today is not appropriate.

Zaključki. Končno oceno tega načina zdravljenja pričakujemo kmalu po letu 2000, ko bo zaključenih veliko prospektivnih randomiziranih raziskav.

Conclusions. The place of high dose chemotherapy as standard treatment in solid tumours has still to be defined. We expect that this will be known soon after year 2000 when most of prospective randomised clinical trials that are ongoing will reach a conclusion.

Uvod

Zdravljenje s citostatiki je poleg kirurške odstranitve tumorja in obsevanja z ionizirajočimi žarki pomemben način zdravljenja pri bolnikih s solidnimi tumorji, kot so karcinomi, germinalni tumorji, sarkomi in melanom. Te neoplazme zavzemajo okrog 95% vseh malignih bolezni (1). Z uvajanjem novih načinov zdravljenja, predvsem novih citostatikov in hormonske terapije, se je preživetje teh bolnikov pomembno podaljšalo (2). Najpomembnejši napovedni dejavnik preživetja je stadij bolezni. Uspeh kombiniranega zdravljenja je tem boljši, čim bolj zgodaj bolezen odkrijemo. Pri razsejanih solidnih tumorjih, razen pri germinalnih, dosežemo z zdravljenjem s citostatiki velikokrat le kratkotrajno izboljšanje bolezni. Za vrsto citostatikov so dokazali, da je učinek na tumor sorazmeren z odmerkom zdravila (3, 4) kar predstavlja teoretično osnovo za zdravljenje z zelo velikimi odmerki. Večanje odmerka omejuje

toksičnost zdravila, ki je pri različnih citostatikih različna (hematotoksičnost, kardiotoxičnost, nefrotoksičnost, hepatotoksičnost, ...). Pri citostatikih, ki se največ uporabljajo v zelo velikih odmerkih je zaviralno delovanje na kostni mozeg tisto, ki omejuje nadaljnje večanje odmerka. Temu so se v preteklosti izognili na ta način, da so bolniku pred zdravljenjem s citostatiki odvzeli zadostno količino kostnega mozga in ga nato neposredno po zdravljenju vrnil. S takim načinom so lahko zvečali odmerke nekaterih citostatikov pet do desetkrat. Ta način zdravljenja je bil drag in zamuden, saj je bil potreben poseg v splošni anesteziji, izvajanje take terapije večkrat zapored pa je bilo zelo zahtevno. Z napredkom zbiranja krvotvornih matičnih celic v periferni krvi, ki poteka ambulantno, pa je postalo tako zdravljenje dostopno. Običajno zdravljenje z zelo visokimi odmerki citostatikov (ZVOC) poteka tako, da bolniku najprej z levkoferezo odvzamemo iz venske krvi krvotvorne matične celice (KMC). Izplavljanje KMC iz kostnega mozga običaj-

no povečamo s citokini ali s kombinacijo citostatikov in citokinov. Temu sledi ZVOC in nato transfuzija KMC. S tem skrajšamo obdobje aplazije na 7 do 10 dni.

Zdravljenje z ZVOC in KMC trenutno v svetu, predvsem pa v Evropi še ni povsod običajen način zdravljenja pri bolnikih s solidnimi tumorji (5). Leta 1996 so v Evropi zdravili z ZVOC 2382 bolnikov s solidnimi tumorji. Od tega 1347 bolnic z rakom dojke, 283 bolnikov z germinalni tumorji, 196 z neuroblastom, 117 z Ewingov sarkomom, 85 s sarkomi mehkih tkiv, 55 z gliomi, in 299 drugih. Le pri zdravljenju 3% bolnikov so uporabili krvotvorne matične celice iz kostnega mozga, pri zdravljenju 3% bolnikov krvotvorne matične celice periferne krvi in kostnega mozga pri vseh drugih pa krvotvorne matične celice periferne krvi (6). Trenutno poteka v svetu več prospektivnih kliničnih raziskav na tem področju z namenom, da se ugotovi prava vrednost takega zdravljenja. Namen tega prispevka je kratak pregled teh raziskav pri posameznih boleznih in poročilo o takem zdravljenju pri naših bolnikih.

Epitelijske neoplazme

Epitelijske neoplazme (karcinomi) predstavljajo večino neoplazem tako v svetu kot pri nas. Leta 1995 je v Sloveniji zbolelo za rakom 6508 bolnikov pri katerih je bila diagnoza potrjena s histološko ali citološko preiskavo, od tega 5584 zaradi karcinomov (1). ZVOC se uporablja največ pri zdravljenju karcinoma dojke, redkeje pri zdravljenju karcinoma jajčnikov in mikrocelularnega karcinoma pljuč (5), v še manjšem obsegu pa pri zdravljenju drugih epitelijskih neoplazem.

Karcinom dojke

V Sloveniji zboli letno okrog 700 bolnic zaradi karcinoma dojke. Pri približno 45% teh bolnic je bolezen omejena na dojko, pri približno 45% je razširjena v pazdušne bezgavke, v 10% pa je bolezen razsejana (1).

Običajno zdravljenje s citostatiki je pri razsejani bolezni učinkovito v 40–75% (navadno gre za delno remisijo bolezni). Čas do ponovitve bolezni pa je kratak (9–18 mesecev). Mediana preživetja teh bolnic je približno 2 leti.

Prognosa bolnic z vnetnim rakom dojke in bolnic z rakom dojke z 10 ali več pozitivnimi pazdušnimi bezgavkami je slaba čeprav nimajo ugotovljenih zasevkov v druge organe. Kljub zdravljenju s citostatiki pride pri 55–87% teh bolnic v 5 letih do ponovitve bolezni in kar pri 70–90% bolnic v 10 letih po zaključenem prvem zdravljenju (7, 8).

Rezultati zdravljenja bolnic z razsejanim rakom dojke z ZVOC in KMC v nekaterih randomiziranih kliničnih raziskavah, ki pa vključujejo le manjše število bolnic so enaki ali boljši kot pri običajnem načinu zdravljenja. Približno četrtnina teh bolnic preživi več kot 3 leta po ZVOC brez znakov bolezni (9, 10). Indikacije za zdravljenje teh bolnic izven kliničnih raziskav niso povsem enotne. Bolnice, ki so primerne za vključitev v take raziskave so tiste pri katerih z običajnim zdravljenjem s citostatiki dosežemo popolno remisijo bolezni.

Peters s sodelavci ugotavlja, da je pri bolnicah z nerazsejano boleznijo, vendar z ≥ 10 pozitivnimi pazdušnimi bezgavkami, zdravljenih z ZVOC 5 letno preživetje brez znakov bolezni 71% (11). Tudi v drugih kliničnih raziskavah (faza II) nekateri opisujejo pri bolnicah z ≥ 10 pozitivnimi bezgavkami, ki so jih zdravili z ZVOC, 5 letno preživetje brez znakov bolezni v 56% (12) in drugi 4 letno preživetje brez znakov bolezni v 70% (13).

Po mnenju nekaterih raziskovalcev je za uspešno zdravljenje potrebnih več zaporednih krogov ZVOC, le to pa omejuje velika toksičnost zdravljenja. Z novimi kombinacijami citostatikov in prilagoditvami že obstoječih načinov so uspeli toksičnost toliko zmanjšati, da je mogoče varno dajanje tudi treh zaporednih krogov ZVOC (14, 15). Prvi izsledki večjih randomiziranih kliničnih raziskav, ki trenutno potekajo so obetajoči, končna ocena zdravljenja pa bo na voljo po letu 2000.

Karcinom jajčnikov

Letno zboli za rakom jajčnikov v Sloveniji približno 160 žensk. Pri približno 60% bolnic je bolezen ob odkritju že napredovala do stadija III ali IV (1).

Z običajnim zdravljenjem s citostatiki bolnic v stadiju III in IV po operaciji dosežemo popolno remisijo bolezni v 60–80%, toda 5 letno preživetje teh bolnic je le 10–20% (16).

V različnih kliničnih raziskavah (faza I in II) so ugotovili, da z zdravljenjem teh bolnic z ZVOC in KMC sicer dosežejo popolno remisijo bolezni v 70–90%, vendar se bolezen hitro ponovi, preživetje pa je enako kot pri običajnem načinu zdravljenja (17). Nekateri raziskovalci opisujejo 20–50% 5 letno preživetje, če so bolnice zdravili z ZVOC neposredno po zaključenem običajnem načinu zdravljenja (18). Izsledki raziskav, ki vključujejo v ZVOC tudi citostatik paclitaxel, obetajo izboljšanje prognoze bolnic z rakom jajčnikov. (19)

Mikrocelularni karcinom pljuč

Vsako leto v Sloveniji zboli zaradi karcinoma pljuč okoli 1000 novih bolnikov. Od tega približno 20% zaradi mikrocelularnega raka pljuč (1). Le okrog 5% bolnikov, ki so zboleli za rakom na pljučih v Sloveniji v obdobju 1988–1990 je preživel 5 let od ugotovitve bolezni (2). Zaradi hitre rasti tumorja in zelo dobrega odziva na običajno zdravljenje s citostatiki je izgledalo, da je mikrocelularni rak pljuč najprimernejša bolezen za zdravljenje z ZVOC. Raziskave niso pokazale pomembnega podaljšanja preživetja, saj se je bolezen zelo hitro ponovila (20). Tako kot običajno zdravljenje tudi ZVOC pri mikrocelularnem raku pljuč ni na mestu. Preskušajo zelo intenzivno zdravljenje z več zaporednimi krogi ZVOC (21, 22).

Germinalni tumorji

Rak na modih je najpogostejši tumor pri moških v starosti 15 do 35 let. Leta 1995 je v Sloveniji zbolelo 56 bolnikov (1). Delež ozdravitve je pri bolnikih z rakom na modih velik tudi pri napredovali bolezni. Uspehi zdravljenja so se zlasti izboljšali po vključitvi cisplatina v zdravljenje (23, 24). Uspeh ozdravitve je pri bolnikih z nizkim stadijem bolezni 95–100%, pri bolnikih z razširjeno boleznijo pa na uspeh zdravljenja vplivajo stadij bolezni, tumorska masa in izsledki tumorskih markerjev.

Običajno razsejana bolezen zdravimo s citostatiki in operativno odstranitev ostanke tumorja. Ozdravitev dosežemo pri 65–95% bolnikov, pri približno 15% bolnikov zdravljenje ni učinkovito. Pri približno 10% bolnikov se bolezen ponovi po doseženi popolni remisiji. Pri ponovitvi bolezni dosežemo z zdravljenjem s citostatiki ponovno popolno remisijo pri približno 60% bolnikov. Pri polovici od njih pride do ponovne ponovitve bolezni (25).

Namen uporabe vedno bolj intenzivnih načinov zdravljenja kot so ZVOC in presaditev KMC kostnega mozga oziroma presaditev KMC periferne krvi je doseči večji odstotek popolnih remisij, kasnejšo ponovitev bolezni, daljše preživetje bolnikov pri ponovitvi bolezni kakor tudi pri tistih z neugodnimi prognostičnimi dejavniki ob ugotovitvi bolezni (26–30).

Po podatkih v literaturi je približno 22% bolnikov, ki so jih zdravili z ZVOC in podporo KMC periferne krvi in/ali KMC kostnega mozga brez znakov bolezni več kot leto dni po zaključenem zdravljenju (31).

Avtorji so poskušali oceniti napovedne dejavnike, ki vplivajo na uspeh zdravljenja z ZVOC. Z multivariatno analizo so ugotovili, da so statistično najpomembnejši naslednji prognostični dejavniki: obseg bolezni pred zdravljenjem z ZVOC, primarno mesto tumorja in koncentracija tumorskega markerja v krvi (horionski gonadotropin) pred ZVOC. Ugotovili so, da imajo bolniki s primarnim tumorjem na modih, pri katerih je bilo zdravljenje s cisplatinom učinkovito in so imeli pred zdravljenjem z ZVOC nizke vrednosti tumorskega markerja, več kot 50% verjetnosti, da bodo preživeli

dve leti ali več. Pri bolnikih z drugimi manj ugodnimi prognozičnimi dejavniki je verjetnost ozdravitve le 10% do 30%. Med različnimi načini ZVOC niso ugotovili pomembnih razlik pri preživetju bolnikov (32).

Klinične raziskave še niso potrdile pravega pomena ZVOC kot konsolidacijskega načina zdravljenja po zdravljenju s citostatiki pri ponoviti boleznih (31).

Iz rezultatov različnih kliničnih raziskav lahko povzamemo, da ZVOC niso primerni kot zdravljenje za bolnike neodzivne na zdravljenje s cisplatinom (31, 33).

Po mnenju nekaterih raziskovalcev je zdravljenje z ZVOC in KMC obetajoče kot prvo zdravljenje za bolnike z neugodnimi prognozičnimi dejavniki (31, 32). V literaturi še ni dovolj podatkov o morebitno večjem uspehu zdravljenja z več kot enim krogom ZVOC (33).

Drugi solidni tumorji

Potekajo tudi klinične raziskave (faza I in II) pri bolnikih z Ewingovim sarkomom in gliomi (34). O večjih uspehih ne poročajo, saj se bolezen hitro ponovi.

Izsledki zdravljenja solidnih tumorjev z zelo visokimi odmerki citostatikov pri naših bolnikih

Zdravljenje solidnih tumorjev z ZVOC in KMC periferne krvi smo pričeli leta 1997 in sicer kot dopolnilno zdravljenje pri bolnicah s karcinomom dojke z več kot 10 prizadetih pazdušnih bezgavk.

Ker tak način zdravljenja še ni priznan kot običajen, nameravamo vključevati te bolnice v mednarodni protokol za zdravljenje raka dojke (IBCSG – International Breast Cancer Study Group) v katerem na Onkološkem inštitutu sodelujemo že vrsto let.

V sodelovanju s Kliničnim oddelkom za hematologijo smo do sedaj zdravili na ta način dve bolnici, obe mlajši od 40 let z velikim številom prizadetih pazdušnih bezgavk. Bolnici sta prejeli tri kroge ZVOC (epidoksorubicin, ciklofosfamid) v razmaku treh tednov in ob vsakem krogu zdravljenja sta prejeli transfuzijo KMC. Te smo pred začetkom zdravljenja zbrali iz venske krvi z levkoferezami na Zavodu RS za transfuzijo krvi v Ljubljani. Za povečanje števila KMC v krvi smo uporabili rastni dejavnik G-CSF (Neupogen).

Med akutnimi neželenimi pojavi smo ugotavljali navzeo, bruhanje in zaviralno delovanje na kostni mozeg. Obdobje pancitopenije je bilo le 7 do 10 dni, pri nobeni od bolnic ni prišlo do okužbe. V tem času sta prejeli profilaktično ciprofloksacin, flukonazol in acyclovir.

Bolnici nista potrebovali transfuzije koncentriranih trombocitov, prejeli sta le enkrat transfuzijo koncentriranih filtriranih in obsevanih eritrocitov. Tudi v obdobju po presaditvi bolnici nista imeli okužbe. Redno ju kontroliramo vsake tri mesece. Do sedaj nismo ugotovili kasnih neželenih pojavov niti ponovitve bolezni.

Zaključek

Zdravljenje z ZVOC in KMC pri solidnih tumorjih še ni običajen način zdravljenja in tudi v svetu trenutno poteka v glavnem kot klinične raziskave, vsekakor pa je eden izmed obetajočih načinov zdravljenja pri nekaterih solidnih tumorjih. Pravo vrednost tega zdravljenja pa bomo lahko ocenili po zaključku randomiziranih kliničnih raziskav v začetku prihodnjega tisočletja.

Literatura

1. Incidenca raka v Sloveniji 1995. Ljubljana: Onkološki inštitut, Register raka za Slovenijo, 1998.

2. Pompe-Kirn V, Zakotnik B, Volk N, Benulič T, Škrk J. Preživetje bolnikov z rakom v Sloveniji. Ljubljana: Onkološki inštitut, 1995.
3. Frei E III, Canellos GP. Dose: a critical factor in cancer chemotherapy. *Am J Med* 1980; 69: 585–94.
4. Skipper HE. Criteria associated with destruction of leukemia and solid tumor cells in animals. *Cancer Res* 1987; 27: 2636–45.
5. Goldman JM, Schmitz N, Niethammer D, Gratwohl A. Allogenic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe in 1998. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 21: 1–7.
6. Gratwohl A, Hermans J, Baldomero H. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1995. *European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant*, 1997; 19: 5, 407–19.
7. Bearman SI, Shpall EJ, Jones RB, Cagnoni PJ, Ross M: High-dose chemotherapy with progenitor cell support for metastatic and high risk primary breast cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 60–7.
8. Goldhirsch A: Breast cancer. In: Cavalli F, Hansen H, Kaye SB. Eds. *Textbook of Medical Oncology*. Martin Dunitz, 1997: 53–82.
9. Peters WP, Jones RB, Vredenburgh J, Shpall EJ. A large prospective randomized trial of high dose combination alkylating agents (CPB) with autologous cellular support (ABMS) as consolidation for patients with metastatic breast cancer achieving complete remission after intensive doxorubicin based induction therapy (AFM). *Proc Am Soc Clin Oncol* 15, 1996: 149–9.
10. Bezvoda WR, Seymour L, Dansey RD. High dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2483–9.
11. Peters WP, Beny D, Vredenburgh J, Hussein A. Five year follow up high dose combination alkylating agents with ABMT as consolidation after standard dose CAF for primary breast cancer involving ≥ 10 axillary lymph nodes (DUKE/CALGB 8782). *Proc Am Soc Clin Oncol* 14, 1995: 933–3.
12. Gianni AM, Siena S, Bregni M, Di Nicola M. Five year results of high dose sequential adjuvant chemotherapy in breast cancer with ≥ 10 positive nodes. *Proc Am Soc Clin Oncol* 14, 1995: 61–1.
13. Garcia-Conde J, Sola C, Solano C, Azagra P. High-dose chemotherapy (HDCT) and autologous peripheral stem-cell transplantation (AP SCT) after standard chemotherapy in high risk breast cancer patients (≥ 10 axillary node involvement after surgery). *Proc Am Soc Clin Oncol* 15, 1996: 994–4.
14. Rodenhuis S, Westermann A, Holtkamp MJ, Nooijen WJ, Baars JW. Feasibility of multiple courses of high dose Cyclophosphamide, Thiotepa, and Carboplatin for breast cancer or germ cell cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14, 1473–83.
15. Basser RL, To LB, Begley CG, Juttner A. Adjuvant treatment of high risk breast cancer using multicycle high dose chemotherapy and filgrastim mobilized peripheral blood progenitor cells. *Clin Cancer Res* 1995; 1, 715–21.
16. NIH Consensus Conference: Ovarian Cancer-Screening, Treatment, Follow up. *JAMA* 1995; 273: 491–7.
17. Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Purdy MP: Future strategies for the treatment of advanced ovarian cancer using high dose chemotherapy and autologous bone marrow support. *Gynecol Oncol* 1994; 54: 357–61.
18. Veins P, Gravis G, Blaise D. High dose chemotherapy (HDC) with bone marrow rescue for patients with FIGO stage III or IV common epithelial ovarian carcinoma responding to first treatment. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1995; 14: 285–5.
19. Fennelly D, Schneider J, Spriggs D. Dose escalation of paclitaxel with analysis of progenitor-cell mobilization and hematologic support of advanced ovarian cancer patients receiving rapidly sequenced high-dose carboplatin/cyclophosphamide courses. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1160–0.
20. Humblet Y, Symann M, Bosly A. Late intensification chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in selected small-cell carcinoma of the lung: a randomized study. *Journal of Clinical Oncology* 1987; 5 (12): 1864–73.
21. Leyvraz S, Perey L, Lange A, Ketterer N, Bosquee L, Rosti G, Pasini F, Hamdan O, Humblet Y, Cetto GL, Marangolo M. Sequential high-dose ICE chemotherapy with circulating progenitor cells (CPC) in patients with small cell lung carcinoma (SCLC): an EBMT study. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1996; 15: A1133–3.
22. Jennis A, Levitan N, Pecora AL, Isaacs R, Lazarus H. Sequential high dose chemotherapy (HDC) with filgrastim/peripheral stem cell support (PSCS) in extensive stage small cell lung cancer (SCLC). *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol*. 1996; 15: A1021–1.
23. Sternberg C. Cancers of the genitourinary tract. In: Cavalli F, Hansen H, Kaye SB eds. *Textbook of Medical Oncology*. Martin Dunitz, 1997: 202–8.
24. Einhorn LH. Testicular cancer: A new and improved model. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1777–81.
25. Loehrer PJ, Laver R, Roth BJ, Williams SD, Kalasinski LA. Salvage therapy in recurrent germ cell cancer: ifosfamide and cisplatin plus either vinblastine or etoposide. *Ann Int Med* 1988; 109: 540–6.
26. Droz JP, Pico JL, Ghosu M. Long-term survivors after salvage high-dose chemotherapy with bone marrow rescue in refractory germ cell cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27: 831–5.
27. Ibrahim A, Zambon E, Bourhis JH. High dose chemotherapy with etoposide, cyclophosphamide and escalating dose of carboplatin followed by autologous bone marrow transplantation in cancer patients. A pilot study. *Eur J Cancer* 1993; 29 A: 1398–403.
28. Motzer RJ, Guleti SC, Tang WP. Phase I trial with pharmacokinetic analyses of high-dose carboplatin, etoposide and cyclophosphamide with autologous bone marrow transplantation in patients with refractory germ cell tumours. *Cancer Res* 1993; 53–3.

29. Lotz JP, Mochover D, Malassagne B. Phase I-II study of two consecutive courses of high-dose epipodophyllotoxin, ifosfamide and carboplatin with autologous bone marrow transplantation for treatment of adult patients with solid tumours. *J Clin Oncol* 1991; 9: 1860-70.
30. Motzer RJ, Mazumdar M, Basl GJ. High-dose carboplatin, etoposide and cyclophosphamide for patients with refractory germ cell tumours: Treatment results and prognostic factors for survival and toxicity. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1098-105.
31. Droz JP, Culine S, Biron P, Kramar A. High-dose chemotherapy in germ-cell tumours. *Ann Oncol* 1996; 7: 997-1003.
32. Beyer J, Kramar A, Mandanas R. High-dose chemotherapy as salvage treatment in germ cell tumours: A multivariate analysis of prognostic variables. *J Clin Oncol* 1996; 14: 4.
33. Tjan-Heijnen VCG, Oosterhov GON, Wit R, De Mulder P. Treatment in germ cell tumours: state of the art. *Eur J Surg Oncol* 1997; 23: 110-22.
34. Antman KH, Souhami RL. High-dose chemotherapy in solid tumours. *Annals of Oncology* 1993; 4 Suppl 1: S29-S44.

Strokovni prispevek/Professional article

ZDRAVLJENJE NAPREDOVALE KRONIČNE LIMFOCITNE LEVKEMIJE S FLUDARABINOM

TREATMENT OF ADVANCED-STAGE CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA WITH FLUDARABINE

Peter Čermelč

Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-04-04, sprejeto 1998-04-07; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-23-5

Ključne besede: predhodno zdravljeni bolniki; fludarabin; trajanje učinka zdravljenja

Key words: previously treated patients; fludarabine; duration of response

Izvleček – Izhodišča. Fludarabin pomeni novo možnost zdravljenja za bolnike z napredovalo kronično limfocitno levkemijo (KLL), ko zdravljenje s klorambucilom ni več učinkovito.

Abstract – Background. Fludarabine is a new option in the treatment of patients with advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia (CLL) failing on therapy with chlorambucil.

Bolniki in zdravljenje. S fludarabinom smo zdravili 15 bolnikov z napredovalo B-KLL, pri kateri drugi načini zdravljenja niso bili več učinkoviti. Starost štirih bolnic in enajstih bolnikov je bila od 40 do 73 let (mediana 59 let). Fludarabin smo dajali 25 mg/m² telesne površine/dan 5 dni. Zdravljenje smo ponavljali na 28 dni.

Patients and treatment. Fludarabine was given to 15 patients with advanced B-CLL who no longer to other treatment modalities. There were 4 women and 11 men, aged 40 to 73 years (median 59 yrs). The patients received fludarabine 25 mg/m² per day over 5 consecutive days. The regimen was repeated every 28 days.

Rezultati. Po zdravljenju s fludarabinom smo dosegli popolno remisijo bolezní pri dveh od petnajstih bolnikov (13%), delno remisijo pri petih bolnikih (33%), medtem ko je bilo pri osmih bolnikih (54%) zdravljenje neuspešno. Bolniki, pri katerih je bilo zdravljenje uspešno, so prejeli povprečno 4 kroge zdravljenja. Čas od zaključka zdravljenja s fludarabinom do poslabšanja bolezní je bil pri tistih, kjer smo dosegli popolno remisijo bolezní, povprečno 22 mesecev, pri bolnikih z delno remisijo povprečno 13 mesecev, skupno pa povprečno 16 mesecev.

Results. Two of the 15 patients (13%) showed a complete remission and 5 (33%) a partial remission. Eight patients (54%) showed no therapeutic response. Fludarabine proved effective in patients who completed an average of 4 treatment cycles. The average progression-free interval after fludarabine was 22 months in patients with a complete remission and 13 months in patients with a partial remission, the average overall interval being 16 months.

Zaključki. Zdravljenje s fludarabinom je bilo uspešno, s tem pa tudi boljša kakovost življenja pri skoraj polovici prej zdravljenih bolnikov z napredovalo KLL. Učinek zdravljenja je bil daljši pri tistih bolnikih, kjer smo dosegli popolno remisijo bolezní.

Conclusions. Fludarabine has provided an effective therapy and has improved the quality of life in nearly one half of the pretreated patients with advanced B-LLC. The beneficial effect of therapy lasted longer in patients showing a higher therapeutic response.

Uvod

Kronična limfocitna levkemija (KLL) je najpogostejša oblika levkemije v zahodnih državah, saj doseže po 60. letu starosti pogostost več kot 20 novih primerov bolezní na leto na 100.000 prebivalcev (1). Moški zbolevajo enkrat pogosteje kot ženske.

Za bolezen je značilna klonska proliferacija in kopičenje neoplastičnih limfocitov B. Kadar bolezen slučajno ugotovimo pri pregledu krvi (limfocitoza več kot 5,0×10⁹/L) in je omejena na kostni mozeg (infiltracija z več kot 30% limfocitov), govorimo o klinično razvojni stopnji A. Pri razdelitvi KLL po razvojnih stopnjah ločimo pet enakovrednih področij povečanih bezgavk in organov: povečane bezgavke v vratu, pazduhah in dimljah ter povečana vranica in jetra. Pri klinično razvojni stopnji A so lahko povečane bezgavke in/ali organi v manj kot treh območjih, pri stopnji B pa v treh ali več področjih. Pri stopnji C imajo bolniki anemijo (koncentracija hemoglobina manj kot 100 g/L) in/ali trombocito-

penijo (število trombocitov manj kot 100×10⁹/L) (2). Pri okoli 60% bolnikov s KLL (stopnja A) poteka bolezen počasi in ne potrebujejo zdravljenja, medtem ko pri 40% bolnikov s povečanimi bezgavkami, jetri, vranico in znaki odpovedi kostnega mozga, poteka bolezen hitreje. Povprečno preživetje je pri slednjih le nekaj let.

Za oceno napovedi poteka KLL je najpomembnejša razširjenost bolezní ob ugotovitvi, poleg tega pa še čas podvojitve števila limfocitov v krvi, način limfocitne infiltracije kostnega mozga in citogenetične nepravilnosti (2-4).

Klorambucil je alkilirajoči citostatik, s katerim običajno začnemo zdravljenje KLL. Pri bolnikih s klinično razvojno stopnjo C klorambucilu dodamo glukokortikoide. Izboljšanje bolezní dosežemo pri 40-77% bolnikov, ki pred tem še niso bili zdravljeni (5, 6). Čeprav so s kombinacijo ciklofosfamida, doksorubicina, vinkristina in prednisona (CHOP) dosegli izboljšanje napredovale bolezní v večjem odstotku, pa se preživetje bolnikov ni podaljšalo (7-9).

Tab. 1. *Odzivnost na zdravljenje s fludarabinom.*Tab. 1. *Response to treatment with fludarabine.*

	PR	DR	PR+DR	NZ
Vsi bolniki All patients	2/15 (13%)	5/15 (33%)	7/15 (46%)	8/15 (54%)
Razširjenost bolezni Clinical stage				
B	2	2	4	5
C	1	2	3	3
Obdobje do poslabšanja bolezni (mesece) Progression-free intervals (months)	20	13	16	

PR – popolna remisija / complete remission

DR – delna remisija / partial remission

NZ – neuspešno zdravljenje / unsuccessful treatment

Uporaba purinskih analogov, kot sta fludarabin in kladribin, je v drugi polovici osemdesetih let pomenila novo možnost zdravljenja za bolnike z napredovalo KLL, ko drugi načini zdravljenja niso bili več učinkoviti (10, 11). Fludarabin (9-beta-D-arabinofuranozil-2-fluoro-adenin monofosfat) je fluorirani analog ara-adenina, ki je relativno odporen proti delovanju encima adenozin deaminaze (12). Pri bolnikih s KLL in ne-Hodgkinovimi limfomi so v kliničnih raziskavah I. in II. Grever in sod. (13) ter Leiby in sod. (14) ugotovili, da fludarabin povzroča levkopenijo. Odzivnost na zdravljenje s fludarabinom je bila pri poprej zdravljenih bolnikih s KLL 45%, od tega so dosegli popolno remisijo bolezni pri 13% bolnikov, delno izboljšanje pa pri 32% bolnikov. Pri 55% bolnikov s KLL je bilo zdravljenje neučinkovito (15, 16).

Čeprav smo fludarabin registrirali v Sloveniji ob koncu leta 1997, v večini evropskih držav pa leto prej, smo ga začeli uporabljati pri nas že decembra leta 1993. Kljub temu, da je fludarabin učinkovitejši od klorambucila pri prvem zdravljenju KLL in se nakazuje možnost daljšega preživetja bolnikov po zdravljenju z njim, pa ga zaradi velike cene zdravljenja uporabijo v večini držav še takrat, ko zdravljenje s klorambucilom ni več učinkovito (17).

Namen našega dela je prikazati izsledke zdravljenja s fludarabinom pri bolnikih z napredovalo KLL in jih primerjati z izsledki v literaturi.

Bolniki in zdravljenje

Od decembra 1993 do decembra 1997 smo na Kliničnem oddelku za hematologijo v Ljubljani zdravili s fludarabinom 15 bolnikov z napredovalo B-KLL. KLL smo opredelili na osnovi kliničnega pregleda, celotne krvne slike, citološke ocene kostnega mozga in potrditve celičnih označevalcev B na limfocitih. Starost štirih bolnic in enajstih bolnikov je bila od 40 do 73 let (mediana 59 let). Devet bolnikov je imelo pred začetkom zdravljenja s fludarabinom klinično razvojno stopnjo B, šest bolnikov pa klinično razvojno stopnjo C. Čas od ugotovitve KLL pa do začetka zdravljenja s fludarabinom je bil od 6 do 44 mesecev (mediana 31 mesecev). Pred začetkom zdravljenja s fludarabinom so se trije bolniki zdravili s klorambucilom, devet bolnikov s klorambucilom in metilprednizolonom, dva s kombinacijo citostatikov CHOP (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon) in COP (ciklofosfamid, doksorubicin, prednizon), dvema pa smo obsevali vranico z ionizirajočimi žarki.

Fludarabin (Fludara, Schering AG) smo dajali 25 mg/m² telesne površine/dan, 5 dni v 30 minutni venski infuziji (17). Zdravljenje smo ponavljali na 28 dni, dokler so se kazalniki bolezni izboljševali. Uspešnost zdravljenja smo ocenjevali pred naslednjim krogom zdravljenja.

Popolno remisijo bolezni smo ocenili: 1. če po zdravljenju nismo več ugotovili povečanih bezgavk ali organov, 2. če je bilo v krvni sliki več kot 1,5×10⁹/L nevtrofilcev, manj kot 4×10⁹/L limfocitov, več kot 100×10⁹/L trombocitov, koncentracija hemoglobina

pa večja od 110 g/L, 3. če je bilo v kostnem mozgu manj kot 30% limfocitov.

Za delno remisijo smo ocenili, če so se povečane bezgavke ali organi zmanjšali za 50% in izboljšale zgoraj naštetih vrednosti krvne slike za več kot 50%. V primerih, ko nismo dosegli opisnega izboljšanja bolezni, smo ocenili zdravljenje kot neuspešno (18). Zdravljenje smo zaključili, če smo dosegli popolno remisijo bolezni ali če se znaki bolezni niso več zmanjševali oziroma če je bilo zdravljenje neuspešno.

Rezultati

V skupini 15 bolnikov z napredovalo KLL smo po zdravljenju s fludarabinom dosegli popolno remisijo pri dveh bolnikih (13%), delno remisijo pa pri petih (33%). Pri osmih bolnikih (54%) je bilo zdravljenje neuspešno.

V skupini sedmih bolnikov (46%), pri katerih je bilo zdravljenje s fludarabinom uspešno, so bili štirje bolniki klinično razvojne stopnje B, trije pa C. V skupini osmih bolnikov (54%), pri katerih zdravljenje ni bilo uspešno, je bilo pet bolnikov klinično razvojne stopnje B, trije pa C. Bolniki, pri katerih je bilo zdravljenje uspešno, so prejeli povprečno 4 kroge zdravljenja. Pri enem smo dosegli popolno remisijo že po prvem krogu zdravljenja, pri drugem pa šele po sedmih krogih.

Čas od zaključka zdravljenja s fludarabinom pa do poslabšanja bolezni je bil pri bolnikih 16 mesecev (mediana). Pri tistih, kjer smo dosegli popolno remisijo bolezni, je bil 22 mesecev (mediana), pri bolnikih z delno remisijo bolezni pa 13 mesecev (mediana).

Pri enem bolniku se je med zdravljenjem s fludarabinom prehodno zmanjšalo število nevtrofilcev v krvi pod 1×10⁹/L, pri dveh pa število trombocitov pod 100×10⁹/L. Pri enem bolniku se je po zaključenem zdravljenju s fludarabinom pojavila avtoimunska hemolitična anemija.

Razpravljanje

Učinkovitost fludarabina pri prej zdravljenih in nezdravljenih bolnikih s KLL so potrdile že prve klinične raziskave ob koncu 80 let (13, 15, 16).

Naši izsledki zdravljenja s fludarabinom so primerljivi z izsledki v literaturi. Medtem ko so Grever in sod. (15) ugotovili, da je bilo zdravljenje s fludarabinom uspešno pri 35% bolnikov, so Keating in sod. (16) to ugotovili pri 51% bolnikov s KLL, ki so jih pred tem že zdravili na druge načine. V obeh raziskavah je bil delež popolnih remisij 13%. Catovsky in Murphy (19) sta po zdravljenju s fludarabinom 34 prej že zdravljenih bolnikov s KLL ugotovila 18% popolnih in 41% delnih remisij. Naša skupina bolnikov je glede napredovanja bolezni in načinov poprejšnjega zdravljenja KLL primerljiva s tistimi v literaturi (15, 16). Večina naših bolnikov 12/15 (80%) je bila pred zdravljenjem s fludarabinom rezistentna le na eno vrsto zdravljenja KLL. Poleg tega je pomemben tudi delež bolnikov z najbolj napredovalo boleznijo (stopnja C), saj je pri njih odzivnost na zdravljenje manjša (16) kot pri manj napredovali bolezni (stopnja B). V naši skupini bolnikov je bilo šest bolnikov (40%) klinično razvojne stopnje C in devet bolnikov (60%) klinično razvojne stopnje B.

Po zdravljenju s fludarabinom prej zdravljenih bolnikov s KLL niso ugotovili (15, 16) pomembno podaljšane preživetja bolnikov, temveč le kasnejšo ponovitev bolezni, kot če so se zdravili (17) s kombinacijo CAP (ciklofosfamid, doksorubicin, prednizon).

Čas od zaključka zdravljenja s fludarabinom pa do poslabšanja bolezni je bil pri naših bolnikih v povprečju 16 mesecev, kar je manj, kot so ugotovili (27 mesecev) Johnson in sod. (17) vendar še znatno več, kot so ugotovili po zdravljenju s CAP (9 mesecev). Hitrejša ponovitev KLL je lahko pri naših bolnikih posledica tega, ker so prejeli v povprečju en krog zdravljenja s fludarabinom manj kot skupina bolnikov Johnsona in sod. (17).

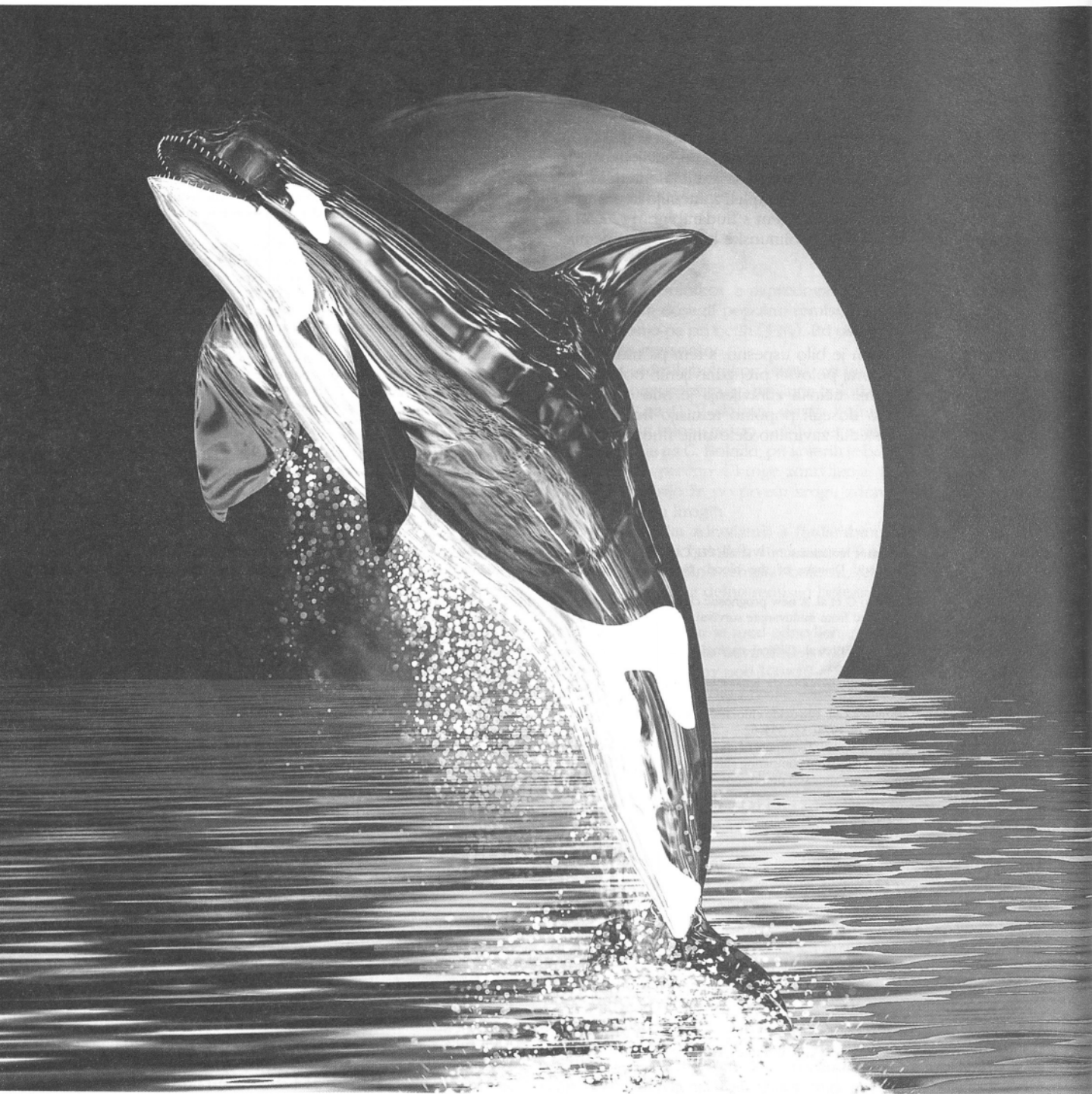
Zaviralno delovanje fludarabina na kostni mozeg se pojavi pri 19% bolnikov kot nevtropenija in pri 14% bolnikov kot trombocitopenija (17), medtem ko se anemija pojavi le pri 7% bolnikov. Tudi pri naših bolnikih se je pri enem pojavila prehodna nevtropenija, pri dveh trombocitopenija, pri enem pa po zaključnem zdravljenju avtoimunska hemolitična anemija, kar je nekoliko manj kot v literaturi (17). Okužb in drugih zapletov s prebavili in osrednjim živčevjem pri naših bolnikih nismo zasledili. Medtem ko so nekateri ugotovili, da so avtoimunski zapleti z anemijo in trombocitopenijo pogostejši med zdravljenjem s fludarabinom (20, 21), pa so drugi opisali izboljšanje avtoimunske hemolitične anemije (22).

Zaključki

Zdravljenje s fludarabinom je bilo uspešno, s tem pa tudi boljša kakovost življenja pri skoraj polovici prej zdravljenih bolnikov z napredovalo KLL. Trajanje učinka zdravljenja je bilo daljše pri tistih bolnikih, kjer smo dosegli popolno remisijo bolezni. Pri petini bolnikov smo zasledili zaviralno delovanje fludarabina na mielopoezo.

Literatura

- Li FP. Epidemiology of chronic leukemias. In: Wiernik PH, Canellos GP, Kyle RA, Schiffer CA, eds. *Neoplastic Disease of the blood*. New York: Churchill Livingstone, 1991: 7-14.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
- Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333: 1052-7.
- Knospe WH, Loeb V, Hugulex CM. Biweekly chlorambucil treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1974; 33: 555-62.
- Montserrat E, Alcalá A, Parody R et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia in advanced stages: a randomized trial comparing chlorambucil plus prednisone versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone. *Cancer* 1985; 56: 2369-75.
- Hansen MM, Andersen E, Birgens H et al. CHOP versus chlorambucil plus prednisolone in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymph* 1991; 5 Suppl: 97-100.
- Kimby E, Mellstedt H. Chlorambucil/prednisone versus Chop in symptomatic chronic lymphocytic leukemias of B-cell type. A randomized trial. *Leuk Lymph* 1991; 5 Suppl: 93-6.
- Spanish Cooperative Group PETHEMA. Treatment of chronic lymphocytic leukemia: a preliminary report of Spanish (PANTHEMA) trials. *Leuk Lymph* 1991; 5 Suppl: 89-91.
- O'Brien S, Kantarjian H, Beran M et al. Results of fludarabine and prednisone therapy in 264 patients with chronic lymphocytic leukemia with multivariate analysis-derived prognostic model for response to treatment. *Blood* 1993; 82: 1695-700.
- Juliussen G, Liliemark J. High complete remission rate from 2-chloro-2'-deoxyadenosine (Cda) in previously treated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Response predicted by rapid decrease of blood lymphocyte counts. *J Clin Oncol* 1993; 11: 679-89.
- Lee WW, Benitz A, Goodman A, Baker BR. Potential anticancer agents LX: Synthesis of the beta-anomer of 9-(d-arabinofuranosyl) adenine. *J Am Chem Soc* 1960; 82: 2648-52.
- Grever MR, Leiby JM, Kraut EH et al. A comprehensive phase I and II clinical investigation of fludarabine phosphate. *Sem Oncol* 1990; 17 Suppl: 39-48.
- Leiby JM, Snider KM, Kraut EH et al. Phase II trial of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine-5'-monophosphate in non-Hodgkin's lymphoma: Prospective comparison of response with deoxycytidine kinase activity. *Cancer Res* 1987; 47: 2719-22.
- Grever MR, Kopecky KJ, Coltman CA et al. Fludarabine monophosphate: A potentially useful agent in chronic lymphocytic leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 457-9.
- Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M et al. Fludarabine: A new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989; 74: 19-25.
- Johnson S, Smith AG, Loeffler H, Oesby E et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1996; 347: 1432-8.
- Cheson BD, Bennett JM, Rai KR et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia. Recommendations of the National Cancer Institute sponsored working group for CLL. *Am J Hematol* 1989; 29: 152-63.
- Catovsky D, Murphy RLW. Key issues in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 2146-54.
- Bastion Y, Coiffier B, Dumontet C, Espinouse D, Byron PA. Severe autoimmune hemolytic anemia in two patients treated with fludarabine for chronic lymphocytic leukemia. *Ann Ocol* 1992; 3: 171-2.
- DiRaimondo F, Giustolisi R, Cacciola E et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia patients treated with fludarabine. *Leuk Lymph* 1993; 11: 63-8.
- Dighiero G. Potential immunological action of purine nucleoside analogues. *Drugs* 1994; 47 Suppl 6: 57-62.



(imipenem in cilastatin natrij, MSD)

CONET^{®†} IV

Pred predpisovanjem, prosimo, preberite navodilo za uporabo.
Dobite ga pri naših strokovnih sodelavcih.



MERCK SHARP & DOHME IDEA INC.*
Podružnica Ljubljana
Dunajska cesta 58, 1000 Ljubljana
Tel.: 061 175 52 01, Fax: 061 175 52 49/50

†Zaščitena blagovna znamka MERCK & CO., INC., Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
*Družba povezana z MERCK & CO., INC., Whitehouse Station, N.J., U.S.A.
Avtorska pravica MERCK & CO., INC., 1996. Vse pravice pridržane.

10-98-TEN-97-SLO-186

Strokovni prispevek/Professional article

ZDRAVLJENJE BOLNIKOV Z DLAKASTO CELIČNO LEVKEMIJO S KLADRIBINOM

TREATMENT OF HAIRY CELL LEUKEMIA WITH CLADRIBINE

 Uroš Mlakar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-03-30, sprejeto 1998-04-04; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-27-9

Ključne besede: dlakasto celična levkemija; 2-klorodeoksiadenozin; zdravljenje

Key words: hairy cell leukemia; cladribine; treatment

Izvleček – Izhodišča. Z uporabo interferona alfa in novejših analogov purina (pentostatin, cladribin) za zdravljenje dlakasto celične levkemije se je prognoza bolezni znatno izboljšala. Cladribin se je najbolj uveljavil zaradi majhne toksičnosti, kratkotrajnega zdravljenja in visokega deleža dolgotrajnih remisij.

Abstract – Background. Since the introduction of interferon and newer purine analogues (pentostatin and cladribine) in the treatment of hairy cell leukaemia outcome of disease changed dramatically. Cladribine is emerging as the treatment of choice because of its favourable toxicity profile, brief duration of treatment and high percentage of long-lasting complete remissions.

Metode in rezultati. Petnajst bolnikov z dlakasto celično levkemijo smo zdravili s cladribinom (0,1 mg/kg/dan sedem dni). Zdravljenje je trajalo sedem dni. Sedem bolnikov smo poprej zdravili z interferonom alfa. Popolno remisijo bolezni smo dosegli pri 9/15 (60%) bolnikov in delni odgovor pri 6/15 (40%). Bolnike smo po zdravljenju spremljali 6 do 31 mesecev. En bolnik je umrl šest mesecev po zdravljenju zaradi karcinoma pljuč. Remisija bolezni pri drugih bolnikih še vedno traja. Hujših neželenih učinkov zdravljenja nismo opazili. Osem bolnikov je zbolelo med zdravljenjem ali kmalu po njem z zvečano telesno temperaturo. Pri vseh, razen pri enem, je zvečana telesna temperatura nastopila v obdobju nevropenije. En bolnik je zaradi poslabšanja anemije potreboval transfuzijo eritrocitov kmalu po zaključku zdravljenja.

Methods and results. Fifteen patients with hairy cell leukaemia were treated with cladribine (0.1 mg/kg/day) for seven days. Seven patients had received prior interferon therapy. Complete haematological remission was achieved in nine (60%) patients and partial remission in six (40%). The follow up period varied between 6 and 31 months. One patient died six months after cladribine treatment because of pulmonary carcinoma. Other fourteen patients are still in remission. There were no serious side effects of treatment. Eight patients had short fever during or shortly after the treatment. Seven of these had fever in the setting of neutropenia. One patient required blood product support after treatment.

Zaključki. Zdravljenje dlakastocelične levkemije s cladribinom je zelo učinkovito. Hujši neželeni učinki zdravljenja so redki. Pri bolnikih s povečanim tveganjem za resno okužbo lahko zmanjšamo to tveganje s spremembo načina zdravljenja.

Conclusions. Treatment of hairy cell leukaemia with cladribine is highly effective with minor side effects. The selected group of patients with higher risk of serious infection or myelosuppression may benefit of a different schedule of treatment.

Uvod

Dlakasto celična levkemija (DCL) je redka kronična limfoproliferativna bolezen, pri kateri so se načini zdravljenja v zadnjih 14 letih znatno izboljšali. Pred odkritjem učinkovitega sistemskega zdravljenja je bila mediana preživetja bolnikov le 53 mesecev (1). Z uvedbo interferona alfa (IFN) leta 1984 in kasneje novih analogov purina, kot sta pentostatin in cladribin, je postalo zdravljenje DCL uspešno. Vsi trije načini zdravljenja podaljšajo preživetje za več kot 10 let. Razlike so le glede trajanja indukcijskega zdravljenja, deleža doseženih popolnih remisij in trajanja remisije. Glede teh lastnosti se je zdravljenje s cladribinom izkazalo za najprimernejše.

Kladribin (2-klorodeoksiadenozin, 2-CdA) je analog deoksiadenozina, na katerega encim adenozin deaminaza ne učinkuje. Zdravilo deluje predvsem na limfocite in monocite. Deluje na celice v obdobju delitve, kot tudi na mirujoče celice s tem, da sproži apoptozo. Selektivnost je posledica velike aktivnosti encima deoksicitidin kinaze v celicah limfocitne vrste. To omogoča kopičenje fos-

foriliranega 2-CdA v toksičnih koncentracijah. Prvo poročilo o učinkovitem zdravljenju DCL s cladribinom so objavili Piro in sodelavci leta 1987 (2). Pri dveh bolnikih so s sedemdnevним zdravljenjem v obliki neprekinjene infuzije kladribina (0,1mg/kg) 7 dni dosegli popolno dolgotrajno remisijo. Kasneje so številne klinične raziskave potrdile učinkovitost takšnega zdravljenja. Zaradi prednosti, kot sta kratko zdravljenje in velik delež dolgotrajnih popolnih remisij, se cladribin bolj priporoča za zdravljenje DCL kot IFN ali pentostatin.

Namen prispevka je opisati naše izkušnje pri zdravljenju DCL z kladribinom.

Bolniki in načini zdravljenja

Od julija 1995 do julija 1997 smo na Kliničnem oddelku za hematologijo v Ljubljani zdravili s kladribinom 15 bolnikov z DCL. Pri vseh bolnikih so izsledki kliničnega pregleda in laboratorijskih preiskav ustrezali DCL. Za zdravljenje smo se odločili v primeru

znakov aktivne bolezni: hemoglobin (Hb) < 110 g/L, število nevtrofilcev (Ng) < $1 \times 10^6/L$, število trombocitov (Tr) < $100 \times 10^9/L$, ponavljajoče se okužbe in prisotnost splošnih simptomov bolezni. Podatke o bolnikih pred začetkom zdravljenja s kladribinom smo prikazali v tabeli 1. Le pri bolnikoma BA in RD smo navedli izsledke biopsije kostnega mozga izpred dveh let. Sedem bolnikov smo poprej zdravili z IFN. Pri petih bolnikih, ki so zaključili indukcijsko zdravljenje z IFN, smo ugotovili relaps bolezni leto dni (mediana 16 mesecev) po zaključku zadnjega zdravljenja. Pri bolniku LA smo ugotovili relaps med vzdrževalnim zdravljenjem z IFN. Vzdrževalno zdravljenje je trajalo šest let. Pri bolniku ŠF smo indukcijsko zdravljenje z IFN po dveh mesecih prekinili zaradi neželenih učinkov. Drugi bolniki se poprej niso zdravili zaradi DCL.

Tab. 1. Značilnosti bolnikov pred začetkom zdravljenja s Cda.

Tab. 1. Characteristics of patients before therapy with Cda.

Bolnik Patient	Spol Sex	Starost (leta) Age (years)	Predhodno zdravljenje z IFN Previous treatment with IFN
BA	m	59	
ČR	m	49	IZ (4x)*
HZ	m	57	
JM	m	40	
KD	m	73	IZ
KJ	m	67	IZ (2x)
LŠ	m	63	
LA	m	69	IZ + VZ
PG	m	51	
RD	ž (f)	47	IZ (2x)
SD	ž (f)	63	
SI	m	55	
SL	ž (f)	74	
ŠF	m	63	IZ
ŠLF	m	46	IZ

IFN – interferon; IZ – indukcijsko zdravljenje; * število IZ, VZ – vzdrževalno zdravljenje.

IZ – induction treatment; * number of inductions; VZ – maintenance treatment.

Bolnike smo zdravili s kladribinom (Leustatin, Ortho Biotech) v odmerku 0,1 mg/kg/dan sedem dni zapored. Zdravilo so bolniki prejeli v neprekinjeni infuziji (dva bolnika) ali kot podkožne injekcije (13 bolnikov). Zdravljenje smo izvajali v bolnišnici in ambulantno. Pred začetkom zdravljenja smo bolnikom napravili celotno krvno sliko in citološki ter histološki pregled kostnega mozga. Pri histološkem pregledu kostnega mozga je patolog ocenil delež infiltracije z dlakastimi celicami (DC). Uspeh zdravljenja smo ocenili tri do šest mesecev po začetku zdravljenja. Za oceno uspešnosti zdravljenja smo uporabili priporočila »2nd International Workshop on Hairy Cell Leukemia« (3):

– Popolna remisija bolezni je zmanjšanje povečanih organov (jetra, vranica bezgavke) na normalno velikost, Hb > 120 g/L, Tr > $100 \times 10^9/L$, Ng > $1,5 \times 10^6/L$ in odsotnost DC v krvi in kostnem mozgu.

– Delna remisija bolezni je zmanjšanje povečanih organov in števila DC v kostnem mozgu za najmanj 50% ter manj kot 5% DC v diferencialni beli krvni sliki.

Rezultati

Izsledke zdravljenja petnajstih bolnikov smo prikazali v tabeli 2. Popolno remisijo smo ugotovili pri devetih bolnikih (60%), delno remisijo pa pri petih bolnikih (40%). Neuspešnega zdravljenja ni bilo. Bolnika JM smo zdravili dvakrat. Po prvem zdravljenju smo dosegli delno remisijo z 20% preostalih DC v kostnem mozgu. Sedem mesecev po prvem zdravljenju smo bolnika ponovno zdravili na enak način kot prvič. Po drugem zdravljenju v kostnem mozgu ni bilo več DC, vendar smo zaradi zmanjšane števila trombocitov v krvi uspeh zdravljenja ocenili le kot delno remisijo.

Pri štirinajstih bolnikih zaenkrat nismo zasledili poslabšanja bolezni. Čas opazovanja je 8–31 mesecev. Le bolnik PG, pri katerem smo dosegli popolno remisijo bolezni, je šest mesecev po zaključku zdravljenja s kladribinom umrl zaradi adenokarcinoma pljuč.

Tab. 2. Hematološki izsledki pred in 3 do 6 mesecev po zdravljenju z kladribinom (2-Cda).

Tab. 2. Haematologic values before and after 3 to 6 months of treatment with cladribine (2-Cda).

Bolnik Patient	Pred 2-Cda Before 2-Cda					3–6 mes. po 2-Cda 3–6 mo. after 2-Cda					Uspeh zdravlj. Respon- se to treatment	Trajanje remisije Remission duration
	Hb (g/L)	Tr $10^9/L$	Ng $10^6/L$	DC %	KM %	Hb (g/L)	Tr $10^9/L$	Ng $10^6/L$	DC %	KM %		
BA	106	22	0,7	4	>30	164	105	4,2	0	0	R	22 m*
ČR	139	212	0,8	11	90	159	285	5,9	0	< 30	DR	17 m*
HZ	102	137	2,2	7	90	150	176	2	0	25	DR	27 m*
JM	81	45	0,7	8	90	151	79	3,6	0	20	DR	
2.*	151	79	3,6	0	20	142	78	3	0	0	DR	13m*
KD	123	53	1,4	16	80	146	130	2,7	0	0	R	11m*
KJ	113	54	1,1	23	80	158	112	4	0	0	R	11m*
LŠ	79	143	0,8	0	>90	144	176	3	0	5	DR	14m*
LA	95	89	0,8	0	>90	107	137	2,3	0	30	DR	9m*
PG	99	139	1,3	3	70	123	286	4,6	0	0	R	6m
RD	114	85	1	1	>90	134	164	2,5	0	<5	DR	14m*
SD	55	9	0,1	49	>90	135	111	1,6	0	0	R	8m*
SI	128	104	0,3	0	60	150	166	3,9	0	0	R	18m*
SL	95	41	0,6	67	90	136	157	4,7	0	0	R	13m*
ŠF	82	37	0,2	0	>90	158	206	5	0	0	R	31m*
ŠLF	105	38	0,8	45	80	140	152	5,5	0	0	R	11m*

Hb – hemoglobin; Tr – trombociti; Ng – nevtrofilci; DC – dlakaste celice v krvi; KM – dlakaste celice v kostnem mozgu; R – popolna remisija; DR – delna remisija; m – mesec; * remisija še traja; * drugo zdravljenje.

Hb – haemoglobin; Tr – platelets; Ng – neutrophils; DC – blood hairy cells; KM – bone marrow hairy cells; R – complete remission; DR – partial remission; m – month; * remission permanent; * second treatment.

Pri petih bolnikih med zdravljenjem in po njem ni bilo zapletov. Osem bolnikov je imelo po zdravljenju krajše obdobje zvečane telesne temperature. Pri sedmih se je vročina pojavila v obdobju poslabšanja nevtropenije. Bolnik ČR je po zdravljenju s kladribinom zbolel za akutnim bronhitisom. Bolnik RD pa je zaradi prehodnega poslabšanja anemije potreboval transfuzijo eritrocitov.

Razpravljanje

Če ocenjujemo uspešnost zdravljenja DCL s preživetjem bolnikov, ni bistvenih razlik med zdravljenjem z IFN, pentostatinom ali kladribinom. Razlike so pri trajanju indukcijskega zdravljenja, deležu popolnih remisij in trajanju remisij. Indukcijsko zdravljenje z IFN traja eno leto, popolno in delno remisijo dosežemo v 10% oziroma 55%, bolezen se ponovi v povprečju po 1–2 letih po zdravljenju (4, 5). Glede deleža popolnih remisij in njihovega trajanja je zdravljenje s pentostatinom in kladribinom uspešnejše. Popolno remisijo bolezni so dosegli v 60–80%, pri ostalih bolnikih pa delno remisijo. Neuspešno zdravljenje je bilo redko (4). Trajanje remisij je bilo dolgo. Štiri leta po zdravljenju je bilo 72% bolnikov še vedno v remisiji (6). Glavna prednost kladribina pred pentostatinom je krajši čas zdravljenja (7 dni nasproti 3–6 mesecem) in uspešno zdravljenje ponovitve bolezni po zdravljenju z IFN ali pentostatinom (7). Zdravljenje s kladribinom v obliki podkožnih injekcij je enako uspešno kot intravenska infuzija (8). Zdravljenje se zato lahko izvaja tudi ambulantno. Naši izsledki glede zdravljenja s kladribinom so podobni tistim v literaturi (9). Manj uspešen je kladribin pri zdravljenju bolnikov z različico DCL s CD25 negativnim imunološkim fenotipom (10). Pri teh sta tudi IFN in pentostatin neuspešna. Tri mesece po koncu zdravljenja so Wheaton in sod. pri bolnikih s popolno remisijo ocenjevali bioptične pripravke kostnega mozga z natančnejšimi imunokemičnimi načini. Pri 13% bolnikov so še ugotovili manjše število DC v kostnem mozgu (minimalno rezidualno levkemijo) (11). Menijo, da je to edini kazalnik, ki napoveduje kasnejšo ponovitev bolezni. Glede na dolgo remisijo bolezni še ni znano, ali je kateri od bolnikov v popolni remisiji dejansko ozdravel. Prav tako se ne ve, ali je pri bolnikih z delno remisijo bolezni koristno poskusiti doseči popol-

no remisijo s ponovitvijo zdravljenja. Pri našem bolniku smo po drugem zdravljenju s kladribinom sicer dosegli remisijo bolezni v kostnem mozgu, število trombocitov v krvi pa je ostalo znižano. Pri ponovitvi DCL po zdravljenju s kladribinom lahko ponovno zdravimo na enak način. Vendar so sledeče remisije praviloma krajše (10). Poročajo, da je pri teh bolnikih uspešno tudi zdravljenje z IFN (12).

Bolniki običajno nimajo večjih težav pri zdravljenju z kladribinom. Pogosti neželeni učinek zdravljenja je zvečana telesna temperatura ob nevtropeniji, ki se pojavi pri 1/3–1/2 bolnikov. Navadno se pojavi med zdravljenjem ali kmalu po njem in je kratkotrajna. Iz hemokultur običajno ne uspejo osamiti povzročitelja. Le pri manjšem številu bolnikov so okužbe hude in se v 3% končajo s smrtjo. Večja verjetnost okužb ali potreb po transfuzijah je pri bolnikih z večjo tumorsko maso in hujšo prizadetostjo kostnega mozga. Pomembnejša kazalnika nevarnosti okužbe po zdravljenju s kladribinom sta koncentracija hemoglobina in holesterola pred pričetkom zdravljenja. Tveganje je večje pri manjših koncentracijah (13). Da bi zmanjšali nevarnost okužb pri bolnikih s povečanim tveganjem, predlagajo:

1. poprejšnje zdravljenje z IFN (9),
2. spremembo načina zdravljenja s kladribinom (1-krat tedensko 6-krat zapored) (14) in
3. uporabo filgrastima (G-CSF) (4).

Čprav po zdravljenju s kladribinom nastopi dolgotrajno zmanjšanje števila limfocitov CD4, novejša raziskava ne opisujejo poznih zapletov z oportunističnimi okužbami ali pojavom sekundarnih novotvorb (6, 10). Zato menimo, da je ugotovitev karcinoma pljuč pri enem od naših bolnikov le slučajen pojav dveh bolezni.

Zaključki

Na osnovi naših ugotovitev in izsledkov iz literature menimo, da je zdravljenje DCL s kladribinom zelo uspešno. Resni zapleti zdravljenja so redki. Nenazadnje je to zdravljenje za bolnika sprejemljivejše, pa tudi cena zdravljenja je v primerjavi z enoletnim zdravljenjem z IFN manjša.

Literatura

1. Golomb HM, Catovsky D, Golde DW. Hairy cell leukemia; a clinical review of 71 cases. *Ann Intern Med* 1978; 89: 677–83.
2. Piro LD, Miller WE, Carrera CJ et al. Hairy-cell leukemia. *N Engl J Med (Letter)* 1987; 317: 901.
3. 2nd International workshop on hairy cell leukemia. Consensus resolution: Proposed criteria for evaluation of response to treatment in hairy cell leukemia. *Leukemia* 1987; 4: 405.
4. Gollard R, Lee TC, Piro LD, Saven A. The optimal management of hairy cell leukemia. *Drugs* 1995; 49: 921–31.
5. Bouroncle BA. Thirty-five years in the progress of hairy cell leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 1994; 14: Suppl 1: 1–12.
6. Tallman MS, Hakimian D, Rademaker AW, Zanzig C, Wollins E, Rose E. Relapse of hairy cell leukemia after 2-chlorodeoxyadenosine: long-term follow-up of Northern University experience. *Blood* 1996; 88: 1954–9.
7. Saven A, Piro LD. Complete remissions in hairy cell leukemia with 2-chlorodeoxyadenosine after failure with 2-deoxycoformycin. *Ann Intern Med* 1993; 119: 278–83.
8. Juliusson G, Haldal D, Hippe E. Subcutaneous injection of 2-chlorodeoxyadenosine for symptomatic hairy cell leukemia. *J Clin Oncol* 1995; 13: 989–95.
9. Legrand O, Vekhoff A, Marie JP, Zittoun R, Delmer A. Treatment of hairy cell leukemia (HCL) with 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA): identification of parameters predictive of adverse effects. *Br J Haematol* 1997; 99: 165–7.
10. Hoffman MA, Janson D, Rose E, Rai KR. Treatment of hairy-cell leukemia with cladribine: response, toxicity, and long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1138–42.
11. Wheaton S, Tallman MS, Hakimian D, Peterson L. Minimal residual disease may predict bone marrow relapse in patients with hairy cell leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* 1996; 87: 1556–60.
12. Seymour B, Estey EH, Keating MJ et al. Response to interferon in patients with hairy cell leukemia relapsing after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Leukemia* 1995; 9: 929–32.
13. Juliusson G, Lenkei R, Tjonnfjord G, Haldal D, Liliemark J. Neutropenic fever following cladribine therapy for symptomatic hairy-cell leukemia: predictive factors and effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Ann Oncol* 1995; 6: 371–5.
14. Lauria F, Bocchia M, Marotta G et al. Weekly administration of 2-chlorodeoxyadenosine in patients with hairy-cell leukemia: a new treatment schedule effective and safer in preventing infectious complications. *Blood* 1997; 89: 1838–9.



Roferon-A®
Interferon alfa-2a
Raztopina za injiciranje brez
humanega serumskega albumina

**Preprosto:
raztopina**

**v predhodno
napolnjeni
injekcijski
brizgi**



Vse dodatne informacije so
vam na voljo pri zastopniku



Proizvaja:
F. Hoffmann-La Roche Ltd
Basel, Švica

Zastopa:
Hoffmann-La Roche Ltd
Podružnica Ljubljana
Dalmatinova 10, 1000 Ljubljana

Strokovni prispevek/Professional article

KONCENTRACIJA ERITROPOETINA V SERUMU PRI BOLNIKI Z DISEMINIRANIM PLAZMOCITOMOM PRED ZAČETKOM ZDRAVLJENJA

PRE-TREATMENT SERUM ERYTHROPOIETIN IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Uroš Mlakar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-03-30, sprejeto 1998-04-04; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-31-4

Ključne besede: *diseminirani plazmocitom; eritropoetin; prognoza; anemija*

Izvleček – Izhodišča. Anemija je pri diseminiranem plazmocitomu pogosta. Vzrokov za njen nastanek je več. Med njimi je pomembno predvsem neustrezno izločanje eritropoetina. V raziskavi smo proučevali pomanjkanje eritropoetina pri bolnikih z anemijo in diseminiranim plazmocitomom.

Metode. Pri 80 bolnikih z diseminiranim plazmocitomom smo izmerili koncentracijo eritropoetina v serumu (Epo) pred začetkom zdravljenja. Za oceno ustreznosti nivoja Epo glede na stopnjo anemije smo za usako vrednost izračunali količnik med logaritmom opazovane in pričakovane koncentracije Epo (O/P Epo). Pričakovano vrednost smo izračunali iz regresijske enačbe, ki prikazuje odnos med koncentracijo Epo in hemoglobina (Hb) pri referenčni skupini oseb z anemijo.

Rezultati. Pomanjkanje Epo (O/P < 0,8) smo ugotovili pri 83% pri bolnikov z ledvično odpovedjo in pri 39% bolnikov brez ledvične odpovedi. Pri bolnikih brez ledvične odpovedi smo ugotovili tudi negativno korelacijo med koncentracijo Hb in log Epo ($r_p = -0,68$ $p < 0,001$). Pri bolnikih z ledvično odpovedjo ni bilo tovrstne povezave. S pomočjo količnika O/P Epo lahko ocenimo tudi prognozo diseminiranega plazmocitoma. Tega nismo ugotovili za serumsko koncentracijo Epo.

Zaključki. Koncentracija Epo je glede na stopnjo anemije neustrezna ne le pri bolnikih z ledvično odpovedjo, temveč tudi pri številnih bolnikih brez ledvične odpovedi. Količnik O/P Epo je koristen za patofiziološko oceno anemije. Ta količnik ima tudi prognostični pomen.

Uvod

Patogeneza anemije pri diseminiranem plazmocitomu (DP) je kompleksna. Odločilno vlogo pri njenem nastanku ima zmanjšanje eritropoeze. Eritropoetin (Epo) je hormon, ki deluje predvsem na v rdečo vrsto usmerjene matične celice in jih spodbuja k deljenju in dozorevanju v proeritroblaste. Na ta način poveča proizvodnjo eritrocitov (eritropoezo). Epo je glikoprotein s molekularno maso 34 kDa. Proizvajajo ga predvsem peritubularne intersticijske celice v ledvicah kot odgovor na ledvično hipoksijo. Zato je bistven člen regulacijske zanke, ki uravnava proizvodnjo eritrocitov in s tem koncentracijo hemoglobina (Hb) v krvi (1, 2). Glede na nastanek

Key words: *multiple myeloma, erythropoietin; anaemia; prognosis*

Abstract – Background. Anaemia is a common complication of multiple myeloma. Several causes have been implicated but inappropriate erythropoietin (Epo) secretion appears to be important. We evaluated the erythropoietin deficiency in anaemic patients with multiple myeloma and prognostic value of this parameter.

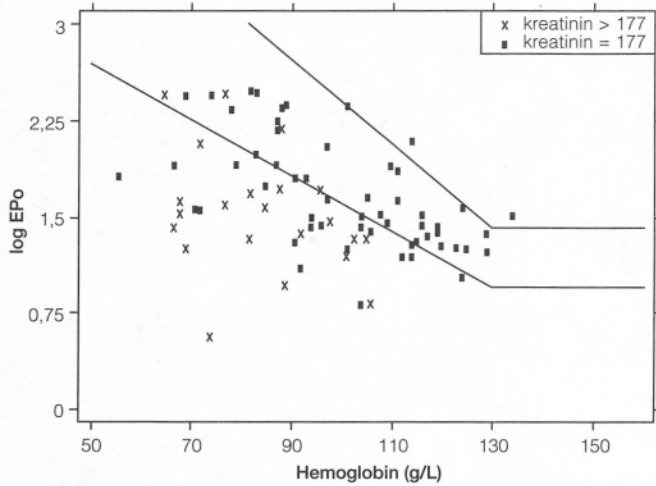
Methods. Pre-treatment serum levels were measured in 80 patients with multiple myeloma. To define Epo levels as appropriate or inappropriate for a given degree of anaemia the observed/predicted log (Epo) ratio (O/P Epo) was derived for each sample. The predicted values were calculated by use of regression formula of serum Epo versus haemoglobin (Hb) determined in reference subjects.

Results. The Epo deficiency (O/P ratio < 0,8) was present in 83% of patients with renal failure and in 39% without renal failure. Significant inverse relationship between serum Epo level and Hb concentration was shown for the patients without renal failure ($r_p = -0,68$ $p < 0,001$). This correlation was absent in group of patients with renal failure. Pre-treatment O/P Epo ratio was prognostic factor while serum Epo level had no prognostic significance.

Conclusions. Serum Epo levels are inadequate not only for patients with renal failure but also in a number of patients without renal failure. The O/P Epo ratio is useful in evaluation of pathophysiology of anaemia. The ratio has prognostic significance too.

lahko pri DP razlikujemo tri glavne vrste anemije: 1. anemijo, ki je posledica infiltracije kostnega mozga s plazmocitomskimi celicami (3); 2. anemijo, ki jo srečamo pri kroničnih vnetjih (4); 3. anemijo, ki je posledica kronične ledvične odpovedi (5). V zadnjih dveh primerih je pri nastanku anemije soudeleženo relativno ali absolutno pomanjkanje eritropoetina.

Anemija je pri DP pogosta. Že zgodaj so ugotovili, da je preživetje bolnikov z DP tem krajše, čim hujša je anemija. Zaradi velike prognostične vrednosti je stopnja anemije (koncentracija Hb) vključena v mnoge prognostične razvrstitve DP (6). Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, kakšna je prognoza bolnikov, pri katerih izločanje Epo ne ustreza stopnji anemije. Zanimala nas je tudi



Sl. 1. Odnos med koncentracijo eritropoetina in hemoglobina pri bolnikih z DP. Področje med vrisanima krivuljama ustreza območju pričakovanih vrednosti.

Fig. 1. Relationship between erythropoietin and haemoglobin levels in patients with multiple myeloma. The area between two lines represents predicted range of epo values for any given haemoglobin.

vloga neustreznega izločanja Epo pri nastanku anemije zaradi diseminiranega plazmocitoma.

Material in metode

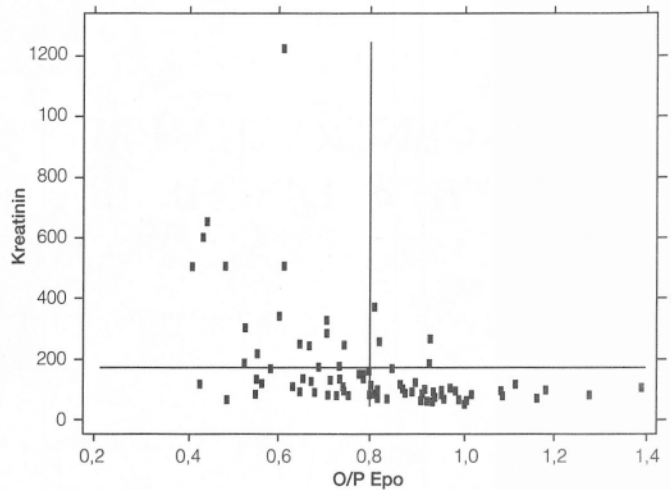
V raziskavi smo obravnavali 80 bolnikov z diseminiranim plazmocitomom, ki so se zdravili na Kliničnem oddeleku za hematologijo v Ljubljani. Bolniki so izpolnjevali diagnostične kriterije za plazmocitom, kot jih priporoča Durie, in pred tem niso bili zdravljeni (7). Bolnikov z benigno monoklonsko imunoglobulinemijo in plazmacelično levkemijo nismo obravnavali (8). Vse laboratorijske in klinične kazalnike smo ocenili pred pričetkom zdravljenja na dan vključitve v raziskavo. Poleg preiskav, potrebnih za opredelitev diagnoze in razvojne stopnje DP (9, 7), smo bolnikom določili tudi koncentracijo Epo v serumu. Kri za laboratorijske preiskave smo odvzeli dopoldne (7.30–12.00). S tem smo se izognili fiziološkim spremembam koncentracije Epo med dnevom (cirkadiani ritem) (10). Bolnike smo kasneje zdravili z melfalanom in prednisonom (11).

Koncentracijo Epo v serumu (E/L) smo izmerili z radioimunskim testom (EPO-Trac 125I RIA kit, Incstar, USA). Koncentracijo hemoglobina (Hb) (g/L), število levkocitov, nevtrofilcev ter trombocitov ($10^9/L$) v krvi smo določili s pomočjo elektronskega števca Coulter STKS. Koncentracijo sečnine (urea) (mmol/L), kreatinina ($\mu\text{mol/L}$) in celotnega kalcija v serumu smo izmerili na šestnajst kanalnem analizatorju SMAC.

S pomočjo količnika med logaritmoma opazovane in pričakovane koncentracije Epo (O/P Epo) lahko ocenimo, ali je izločanje Epo ustrezno stopnji anemije. S pričakovano koncentracijo razumemo koncentracijo Epo, ki bi jo ugotovili pri kontrolnih osebah z isto stopnjo anemije. Pri slednjih je anemija take vrste, da ni prizadeto izločanje Epo, kot npr. anemija zaradi pomanjkanja železa ali hemolitična anemija. Pričakovano koncentracijo smo izračunali iz regresijske enačbe, ki jo navaja Beguin s sod. in velja za vrednosti hematokrita pod 0,38 oziroma Hb pod 130 g/L (12). Prvotno enačbo smo priredili tako, da smo lahko namesto hematokrita za oceno stopnje anemije uporabili koncentracijo Hb.

$$\log \text{Epo} = 4,746 - (0,0273 \times \text{Hb})$$

Podatke smo vrednotili s statističnim programskim paketom BMDP (13). Medsebojno povezanost spremenljivk smo ugotavljali s testom h^2 in Spearmanovim koeficientom korelacije (r_s). Statistično



Sl. 2. Odnos med količnikom O/P Epo in koncentracijo kreatinina v serumu pri bolnikih z DP. Naupična in vodoravna črta sta vrisani pri vrednosti O/P Epo 0,8 in koncentraciji kreatinina 177 $\mu\text{mol/L}$.

Fig. 2. Relationship between O/P Epo ratio and creatinine level. Vertical and horizontal lines are at O/P Epo 0,8 and creatinine 177 $\mu\text{mol/L}$.

značilnost testov smo ocenjevali pri $p < 0,05$. Odnos med koncentracijo Epo in preživetjem smo ocenili s primerjavo krivulj preživetja (14) s pomočjo logrank testa (15).

Rezultati

Pri obravnavanih bolnikih je bila mediana koncentracije Epo v serumu 32,6 E/L, koncentracije Hb 96 g/L in koncentracije kreatinina 117 $\mu\text{mol/L}$. Med koncentracijo Hb in kreatinina smo ugotovili negativno korelacijo ($r_s = -0,37$). Opazovano koncentracijo Epo v serumu smo primerjali s pričakovano koncentracijo na grafični način (sl. 1) in s pomočjo količnika O/P Epo.

Pri zmanjšanem izločanju eritropoetina je O/P Epo $< 0,8$ (12). Zmanjšano izločanje Epo smo ugotovili pri 83% bolnikov z ledvično odpovedjo (kreatinin > 177 $\mu\text{mol/L}$), pri bolnikih brez odpovedi ledvic pa v 39% (sl. 2).

V tabeli 1 prikazujemo koncentracije Hb, kreatinina in Epo pri bolnikih z normalnim in zmanjšanim O/P Epo. Koncentraciji Hb in eritropoetina sta manjši, koncentracija kreatinina pa je večja pri bolnikih z neustreznim izločanjem eritropoetina. Opisane razlike so statistično pomembne (Mann-Whitney-ev test, $p < 0,01$).

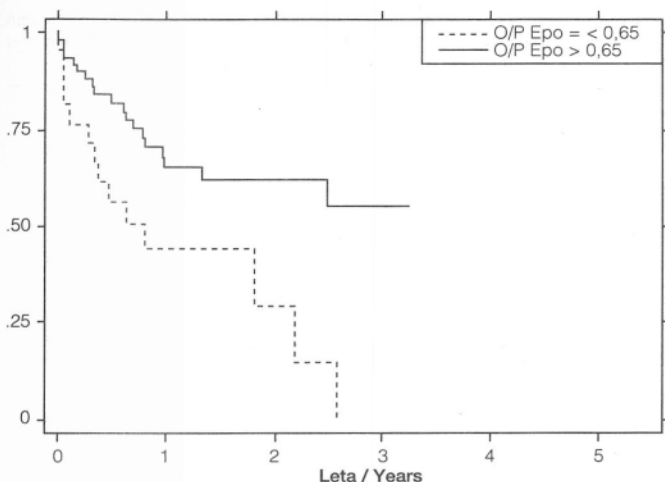
Tab. 1. Mediana koncentracij Hb, eritropoetina in kreatinina v serumu pri bolnikih z anemijo (Hb < 130 g/L) glede na ustreznost izločanja eritropoetina (O/P Epo).

Tab. 1. The mediane of serum haemoglobin, erythropoietin and creatinine in anemic patients (Hb < 130 g/L) with inappropriate (O/P Epo $\leq 0,8$) and appropriate erythropoietin secretion.

O/P Epo	Št. bolnikov No. patients	Hemoglobin Haemoglobin	Eritropoetin Erythropoietin	Kreatinin Creatinine
$\leq 0,8$	41	92 g/L	26 E/L	164 $\mu\text{mol/L}$
$> 0,8$	39	105 g/L	73 E/L	94 $\mu\text{mol/L}$

Analizirali smo tudi koncentracijo Hb in Epo glede na stopnjo razširjenosti DP. Pri bolnikih v III. stopnji DP je bila koncentracija Hb manjša in koncentracija Epo večja kot pri bolnikih z II. stopnjo. Izločanje eritropoetina pri III. stopnji je bilo kljub večji koncentraciji manj ustrezno (mediana O/P Epo = 0,74) kot v II. stopnji (mediana O/P Epo = 0,81).

Korelacijo med Hb in Epo smo ocenili ločeno v skupini bolnikov brez ledvične odpovedi in skupini bolnikov z njo. Pri bolnikih



Sl. 3. Krivulji preživetja bolnikov z diseminiranim plazmocitomom. Vpliv izsledka O/P Epo na preživetje.

Fig. 3. Life-table analysis of myeloma patients grouped according to O/P Epo results.

brez ledvične odpovedi (kreatinin < 110 $\mu\text{mol/L}$) smo ugotovili negativno korelacijo med Hb in log Epo ($r_p = -0,68$ $p < 0,001$). Pri bolnikih z ledvično odpovedjo ni bilo tovrstne povezave.

Povezave med koncentracijo eritropoetina v serumu in preživetjem nismo ugotovili. Ko smo primerjali vpliv količnika O/P Epo na preživetje, smo ugotovili, da so bolniki s količnikom O/P Epo manjšim od 0,65, živeli krajše (sl. 3).

Razpravljanje

Čprav neposredne povezave med koncentracijo eritropoetina v serumu in preživetjem bolnikov ni bilo, smo ugotovili krajše preživetje pri bolnikih z neustreznim izločanjem eritropoetina (O/P Epo < 0,65). Menimo, da je krajše preživetje posledica večjega deleža bolnikov z ledvično odpovedjo (86%) v tej skupini, v primerjavi s skupino bolnikov (34%), kjer je bil količnik O/P Epo večji od 0,65. Ledvična odpoved je namreč neodvisni prognostični dejavnik in je znanilec krajšega preživetja bolnikov z DP.

Za oceno anemije koncentracija eritropoetina v serumu nima večjega pomena, če je ne ocenjujemo v povezavi s stopnjo anemije. Pri opredelitvi anemije lahko ocenjujemo ustreznost izločanja eritropoetina grafično (sl. 1) ali s pomočjo količnika med opazovanjem in pričakovanim logaritmom koncentracije Epo (O/P Epo). Pri nastanku anemije zaradi kronične ledvične odpovedi ima osrednjo vlogo neustrezno izločanje eritropoetina (2). S tem tudi pojasnjujemo anemijo pri večini naših bolnikov z ledvično odpovedjo in tudi negativno povezavo med koncentracijo Hb ter koncentracijo kreatinina.

Mnenja o pomenu neustreznega izločanja Epo za nastanek anemije pri bolnikih z DP brez ledvične odpovedi so deljena. Nekateri navajajo, da je pri tovrstnih bolnikih izločanje eritropoetina ustrezno stopnji anemije (16–18). V naši raziskavi smo podobno kot Beguin s sod. ugotovili znaten delež bolnikov brez ledvične odpovedi z neustreznim izločanjem eritropoetina (12). Pri teh gre verjetno za vrsto anemije, ki jo ugotovimo pri bolnikih z rakom in pri nekaterih kroničnih vnetjih (5, 19). Neustrezno izločanje eritropoetina je tu verjetno posledica zaviralnega učinka nekaterih citokinov na izločanje eritropoetina (5).

Pri bolnikih brez ledvične odpovedi smo podobno kot drugi avtorji ugotovili korelacijo med logaritmom koncentracije Epo in koncentracijo Hb (12, 16). Te povezave pri bolnikih z ledvično odpovedjo ni bilo, kar si razlagamo s prizadetostjo peritubularnih celic pri odpovedi ledvic. Na osnovi naših opazovanj in podatkov iz literature lahko zaključimo, da je pri bolnikih z DP glavni vzrok za nastanek

anemije zmanjšanje eritropoeze (12). Ta je lahko posledica infiltracije kostnega mozga z plazmocitomskimi celicami ali neustreznega izločanja eritropoetina. Eritropoeza je pri infiltraciji kostnega mozga z plazmocitomskimi celicami verjetno okrnjena zaradi zmanjšanja števila krvotvornih celic in njene zavore s celicami NK (naravne ubijalke) ter nekaterimi citokini, npr. interferonom gama (20, 21). Neustrezno izločanje eritropoetina pa je lahko posledica ledvične odpovedi in zavore izločanja eritropoetina na način, značilen za anemijo pri kroničnem vnetju. Zdravljenje anemije z rekombinantnim eritropoetinom je pri večini bolnikov z DP uspešno (21, 22). Ugotovili so, da s pomočjo O/P Epo lahko napovemo, ali bo zdravljenje z rekombinantnim Epo uspešno (23). Pri vrednosti O/P Epo < 0,6 je verjetnost uspešnega zdravljenja 89%. Pri bolnikih z O/P Epo > 1,2 pa bo zdravljenje z Epo v 80% neuspešno (23).

Zaključki

Na osnovi naših izsledkov ocenjujemo: 1. Koncentracija Epo je neustrezna glede na stopnjo anemije ne le pri bolnikih z ledvično odpovedjo, temveč tudi pri številnih bolnikih brez ledvične odpovedi. 2. Količnik O/P Epo je koristen za patofiziološko oceno anemije. 3. Količnik O/P Epo ima tudi prognostični pomen.

Literatura

- Fisher JW, Nakashima J. The role of hypoxia in renal production of erythropoietin. *Cancer* 1992; 70: 928–39.
- Erslev AJ. Erythropoietin. *Leukemia Research* 1990; 14: 683–8.
- Oster W, Herrmann F, Gamm H et al. Erythropoietin for treatment of anemia of malignancy associated with bone marrow infiltration. *J Clin Oncol* 1990; 8: 956–62.
- Radtke HW, Claussner A, Erbes PM et al. Serum erythropoietin concentration in chronic renal failure: relationship to degree of anemia and excretory renal function. *Blood* 1979; 54: 877–84.
- Means RT, Kranz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992; 80: 1639–47.
- Gassmann W, Pralle H, Haferlach T et al. Staging systems for multiple myeloma: a comparison. *Br J Haematol* 1985; 59: 703–11.
- Durie BMG. Staging and kinetics of multiple myeloma. *Semin Oncol* 1986; 13: 300–9.
- Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 1974; 133: 813–8.
- Durie BGM, Salmon 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.
- Wide L, Bengtsson C, Birgegard G. Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br J Haematol* 1989; 72: 85–90.
- Alexanian R, Haut A, Khan AU et al. Treatment of multiple myeloma. *JAMA* 1969; 208: 1680–5.
- Beguin Y, Yerna M, Loo M, Weber M, Fillet G. Erythropoiesis in multiple myeloma: defective red cell production due to inappropriate erythropoietin production. *Br J Haematol* 1992; 82: 648–53.
- Dixon WJ, Brown MB, Jennrich RI ed. *BMDP Statistical Software Manual*. Berkeley: University of California Press, 1990.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Stat Assoc* 1958; 53: 457–81.
- Benedetti J, Yuen K, Young L. Life tables and survivor functions. In: Dixon WJ, Brown MB, Jennrich RI ed. *BMDP Statistical Software Manual*. Vol 2. Berkeley: University of California Press, 1990: 739–68.
- Nielsen OJ, Brandt M, Drivsholm A. The secretory erythropoietin response in patients with multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 697–703.
- Majumdar G, Westwood NB, Bell-Witter C, Muggleston D, Phillips J, Pearson TC. Serum erythropoietin and circulating BFU-E in patients with multiple myeloma and anaemia but without renal failure. *Leuk Lymphoma* 1993; 9: 173–6.
- Ariad S, Clifford D, Penfold G, MacPhail AP, Bezwoda WR. Erythropoietin response in anaemic patients with multiple myeloma and other lymphoid malignancies infiltrating the bone marrow. *Eur J Haematol* 1992; 49: 59–62.
- Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 1689–92.
- Uchida A, Yagita M, Sugiyama H, Hoshino T, Moore M. Strong natural killer (NK) cell activity in bone marrow of myeloma patients: accelerated maturation of bone marrow NK cells and interaction with other bone marrow cells. *Int J Cancer* 1984; 34: 375–81.
- Ludwig H, Fritz E, Leitgeb C et al. Erythropoietin treatment of chronic anemia of selected hematological malignancies and solid tumors. *Ann Oncol* 1993; 4: 161–7.

22. Ludwig H, Fritz E, Kotzmann H, Hocker P, Gisslinger H, Barnas U. Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma. *N Engl J Med* 1990; 322: 1693-9.
23. Osterborg A, Boogaerts MA, Cimnio R et al. Recombinant human erythropoietin in transfusion-dependent anemic patients with multiple myeloma and non Hodgkin's lymphoma - a randomized study. *Blood* 1996; 87: 2675-82.

V suplementu I so sodelovali:

- doc. dr. Dušan Andoljšek, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- prim. Jožica Anžič, dr. med., specialistka pediatrija, Pediatrična klinika, KC Ljubljana
- asist. Igor Aurer, dr. med., specialist internist, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- doc. dr. Drago Batinič, dr. med., specialist imunolog, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- prim. Majda Benedik-Dolničar, dr. med., specialistka pediatrija, Pediatrična klinika, KC Ljubljana
- Mojca Bervar, dr. med., specialistka internistka, Oddelek za bolezni srca, pljuč in ožilja, SB Celje
- prim. mag. Vinko Bogdanič, dr. med., specialist internist, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- mag. Zora Čede, dipl. biol., Laboratorij za klinično biokemijo, SB Trbovlje
- prof. dr. Peter Černelč, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- Branka Golubič-Čepulič, dr. med., specialistka transfuziologinja, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- mag. Jana Kralj, mr. ph., specialistka medicinske biokemije, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- prof. dr. Boris Labar, dr. med., specialist internist, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- doc. dr. Uroš Mlakar, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- mag. Mojca Modic, dr. med., specialistka internistka, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- mag. Mirando Mrsić, dr. med., specialist internist, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- prof. dr. Damir Nemet, dr. med., specialist internist, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- Tadej Pajič, dipl. ing. kem., Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- Bojana Pajk, dr. med., specialistka internistka, Onkološki inštitut Ljubljana
- doc. dr. Mladen Petrovečki, dr. med., specialist imunolog, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- mag. Irena Preložnik-Zupan, dr. med., specialistka internistka, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- prim. Jože Pretnar, dr. med., specialist internist, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- Ivo Radman, dr. med., specialist internist, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- prof. dr. Ciril Rozman, dr. med., specialist internist, Postgraduate School of Hematology «Farreras Valenti», University of Barcelona, Španija
- Dubravka Sertič, dr. med., specialistka internistka, Klinika za interne bolesi, KBC Zagreb
- prof. dr. Donnell E. Thomas, dr. med., specialist internist, Fred Hutchinson Cancer Research Center Seattle, University of Washington, ZDA
- Mojca Tomažič, dr. med., specializantka radiologije, Radiološki oddelek, SB Novo mesto
- Samo Zver, dr. med., specializant interne medicine, Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana
- mag. Branko Zakotnik, dr. med., specialist internist, Onkološki inštitut Ljubljana
- Darja Žontar, dipl. biol., Klinični oddelek za hematologijo, KC Ljubljana

Strokovni prispevek/Professional article

NAŠE IZKUŠNJE PRI ZDRAVLJENJU AKUTNE NELIMFOBLASTNE LEVKEMIJE ODRASLIH S PROTOKOLOM AML 10

OUR RESULTS IN ADULT PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA TREATED ACCORDING TO AML 10 PROTOCOL

Moja Modic

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1996-09-23, sprejeto 1998-03-05; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-35-8

Ključne besede: akutna nelimfoblastna levkemija; zdravljenje

Key words: acute myeloid leukemia; treatment

Izvleček—Izhodišča. Za uspešno zdravljenje akutne nelimfoblastne levkemije (ANLL) pri odraslih je potrebna intenzivna kombinacija več citostatikov. Z njimi dosežemo danes popolno remisijo bolezni v 80% bolnikov mlajših od 50 let in 3 do 5 letno preživetje v 20 do 50%. Hoteli smo oceniti zdravljenje ANLL pri odraslih po AML 10 protokolu, ki ga od leta 1994 uporabljamo na Kliničnem oddelku za hematologijo v Ljubljani.

Abstract—Background. Successful treatment of acute myeloblastic leukemia (AML) in adults requires intensive combination chemotherapy for induction of complete remission. The results of several collaborative trials for the treatment of AML indicate that complete remission can now be achieved in over 80% of patients under the age of 50. 20–50% of patients were still alive at 3–5 years. The AML 10 regiment was studied in our institute between 1994 and 1996.

Material in metode. Od januarja 1994 do junija 1996 smo zdravili 20 odraslih bolnikov z ANLL po protokolu AML 10, povprečna starost bolnikov je bila 45 let, razpon 27–55 let. Za indukcijo remisije smo uporabili citostatike citozin arabinozid, daunorubicin in tioguanin, za konsolidacijo remisije pa amsakrin, etopozid, mitozantron in citozin arabinozid. Pri 20 bolnikih smo blastnim celicam v kostnem mozgu določali celična imunološka znamenja. Pri 18 bolnikih smo določili kariogram iz kostnega mozga.

Methods. Between January 1994 and June 1996 20 adult patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia were eligible for induction chemotherapy (AML 10 regiment). Mean age was 45 years, range 27–55 years. Induction chemotherapy uniformly consisted of cytosin arabinoside, daunorubicin and thioguanin. Remission consolidation therapy consisted of amsacrine, etoposide, mitozantrone, cytosin arabinoside. The expression of myeloid surface markers at first diagnosis were studied. Cytogenetics investigation were performed on bone marrow in 18 of patients.

Rezultati in zaključki. Pri 13 bolnikih (65%) smo dosegli remisijo bolezni, ki je v povprečju trajala 11 mesecev (razpon 2 do 28 mesecev). Pri eni bolnici smo naredili alogenično presaditev kostnega mozga 7 mesecev od diagnoze bolezni v prvi remisiji. Štirje bolniki (20%) so umrli v prvih 6 tednih od začetka citostatskega zdravljenja. Najpogostejši vzroki smrti so bile okužbe in krvavitve. Protokol AML 10 zajema 4 intenzivne cikle citostatikov, pri katerih vedno dosežemo aplazijo kostnega mozga. Vendar se zaradi intenzivnega konsolidacijskega zdravljenja izognemo dolgotrajnemu vzdrževalnemu citostatskemu zdravljenju. Menim, da se s tem kvaliteta življenja bolnikov izboljša, ne glede na to, da bolniki prve mesece preživijo daljša v bolnišnici.

Results and conclusion. 65% (13) of patients achieved complete remission. The remission duration was 11 months (range 2–28). One patient underwent allogenic bone marrow transplantation (BMT). BMT was performed at a median of 7 months from diagnosis in first remission. 4 patients (20%) died within 6 weeks after start of chemotherapy. Predominantly causes of mortality proved to be infection and haemorrhage. Studies of the value of remission maintenance chemotherapy in prolonging survival have given conflicting results with some studies showing benefit and others showing no benefit. The quality of life for patients receiving no further chemotherapy may be superior.

Uvod

Akutna levkemija je neoplazma krvotvornega sistema, ko se prično razraščati levkemične celice v kostnem mozgu, od koder prehajajo v periferno kri, vranico, bezgavke in tudi v druga tkiva (koža, dlesni, centralno živčevje, prebavila, testise). Levkemične celice se kopirajo v kostnem mozgu in izpodrivajo druge normalne krvotvorne celice. Posledica tega so anemija, trombocitopenija in nevtropenija. Glede na morfološke značilnosti poznamo akutno nelimfoblastno levkemijo (ANLL) in akutno limfoblastno levkemijo (ALL) (1). Bolezni se razlikujeta glede na prognozo in

način zdravljenja. Za opredelitev tipa ANLL so potrebne določene morfološke, imunološke in citokemične značilnosti (2), prav tako pa tudi prisotnost specifičnih genetskih translokacij.

Skupina francoskih, ameriških in britanskih hematologov (3) je razdelila ANLL glede na morfološke značilnosti celic v 8 podtipov, Mo-M7. Razlikujejo se tudi po kliničnih slikah. Akutna promielocitna levkemija (M3) je pogosto povezana z motnjami v hemostazi, diseminirano intravensko koagulacijo, kot posledica sproščanja tkivnega tromboplastina iz levkeminčnih celic. Pri akutni mielomonocitni levkemiji (M4) in akutni monoblastni levkemiji (M5) dobimo ekstrapredularno infiltracijo z levkemičnimi celicami (ko-

Tab. 1. Protokol AML 10 za odrasle: Indukcija remisije.

Tab. 1. AML 10 protocol for adults: remission induction therapy.

Ciklus 1	DAT 3+10 PROTOKOL
Course 1	DAT 3+10 REGIMENT
	Daunorubicin 50 mg/m ² i. v. 1., 3. in 5. dan (day)
	Daunorubicin
	Citozinarabinozid 100mg/m ² /12 ur (hours) i.v. 1. do 10. dan (day)
	Cytarabine
	Tioguanin 100 mg/m ² /12 ur (hours) per os 1. do 10. dan (day)
	Thioguanine
Ciklus 2	DAT 3+8 PROTOKOL
Course 2	DAT 3+8 REGIMENT
	Daunorubicin 50 mg/m ² i.v. 1., 3. in 5. dan (day)
	Daunorubicin
	Citozinarabinozid 100mg/m ² /12 ur (hours) i.v. 1. do 8. dan (day)
	Cytarabine
	Tioguanin 100 mg/m ² /12 ur (hours) per os 1. do 8. dan (day)
	Thioguanine

ža, gingive, centralno živčevje). Nekateri bolniki imajo bifentipsko levkemijo, pri kateri ima levkemična celica istočasno mieloidne in limfoidne markerje (4).

Od prognostičnih faktorjev za izid bolezni je eden najpomembnejših starost (5). Starejši od 60 let imajo slabšo prognozo (6). Pri njih ne dosežemo tako pogoste remisije, bolniki težje prenašajo hudo aplazijo kostnega mozga in tudi komplikacije v tem obdobju so pogostejše. Kromosomske anomalije ob ugotovitvi so drugi pomembni neodvisni prognostični faktor. Bolniki, pri katerih najdemo t(8;21), t(15;17) in inv(16) imajo boljše prognozo od bolnikov s t(9;22). Translokacijo t(4;21) najdemo pri bifentipski levkemiji s splenomegalijo in slabo prognozo. Translokacija t(8;21) je pri mlajših bolnikih z akutno mieloblastno levkemijo z dozorevanjem (M2), splenomegalijo in kloromom (6). Pri M4 z eozinofilijo najdemo inv(16) in pogosto prizadeto centralnega živčevja, medtem ko pri običajni M4 dobimo translokacijo t(9;11). Morfološki tip bolezni po FAB klasifikaciji prav tako vpliva na prognozo bolezni. Bolniki z M3, pri katerih dosežejo remisijo, imajo večje možnosti za dolgoletno preživetje kot drugi. Slabšo prognozo imajo bolniki z eritroleukemijo (M6) in M4 od bolnikov z M1 (5). Prognostični kazalci so tudi trajanje znakov bolezni pred ugotovitvijo, število levkocitov in odstotek blastnih celic v periferni krvi ob ugotovitvi bolezni.

Zdravljenje ANLL razdelimo v dve obdobji: indukcija remisije in konsolidacija remisije. O remisiji govorimo takrat, ko je manj kot 5% blastnih celic v kostnem mozgu, odsotnost blastnih celic v periferni krvi z normalno krvno sliko in odsotnost kliničnih znakov bolezni. Remisijo bolezni dosežemo samo prek hude aplazije kostnega mozga. Bolniki, pri katerih smo dosegli remisijo, imajo še vedno rezidualne levkemične celice, zato je potrebno zdravljenje nadaljevati. Za uspešno zdravljenje ANLL pri odraslih je potrebna intenzivna kombinacija več citostatikov. Z njimi dosežemo danes popolno remisijo bolezni pri 80% bolnikov, mlajših od 50 let (7). Odstotek popolnih remisij pri bolnikih, starejših od 55 let, se hitro zmanjšuje. V skupini bolnikov s povprečno starostjo 82 let so dosegli remisijo le v 31%, povprečno preživetje je bilo 3 do 4 tedne (8). Zato pri bolnikih, starejših od 80 let, odsvetujejo intenzivno citostatsko zdravljenje.

Že pred več kot 20 leti so za indukcijo remisije ANLL pričeli uporabljati kombinacijo citostatikov citozinarabinozida in antraciklinskih antibiotikov, kar se je ohranilo še danes. Nastale so majhne modifikacije v shemah z zamenjavo doksorubicina z daunorubicinom in idarubicinom. Dodajanje tioguanina oziroma etopozida ni bistveno vplivalo na odstotek remisij, prav tako tudi čas, kdaj se odločamo za dajanje antraciklinskega citostatika v shemi (9). Mediano trajanje remisije je pri večini bolnikov od 9 mesecev do 2 leti (6).

Presaditev kostnega mozga HLA identičnega dajalca ali identičnega dvojčka je učinkovito zdravljenje akutne levkemije. Za presaditev se odločimo, ko z intenzivnim citostatičnim zdravljenjem dosežemo remisijo krvne bolezni. Večina centrov za presaditev kost-

Tab. 2. Protokol AML 10 za odrasle: konsolidacija remisije.

Tab. 2. AML 10 protocol for adults: remission consolidation therapy.

Ciklus 3	MACE
Course 3	Amsakrin 100 mg/m ² i.v. 1 do 5 dan (day)
	Amsacrine
	Citozinarabinozid 200 mg/m ² v kontinuirani infuziji 1. do 5. dan (day)
	Cytarabine
	Etopozid 100 mg/m ² i.v. 1. do 5. dan (day)
	Etoposide
Ciklus 4	MidAc
Course 4	Mitoksantron 10 mg/m ² i.v. 1. do 5. dan (day)
	Mitoxantrone
	Citozinarabinozid 1,0g/m ² /12 ur v 2-urni infuziji 1. do 3. dan (day)
	Cytarabine

nega mozga je povečala starostno mejo bolnikov do 55 let. Pri starejših bolnikih se pogosteje pojavljajo komplikacije kot so okužbe in reakcija presadka proti gostitelju (GVHD). GVHD je komplikacija alogenične presaditve kostnega mozga. Pri mladih bolnikih z ANLL je alogenična presaditev kostnega mozga zdravljenje izbora že v prvi remisiji bolezni. 3 do 5 letno preživetje dosežemo pri teh bolnikih v 30 do 70%, medtem ko z intenzivnim citostatskim zdravljenjem samo v 20 do 50% (6). Ena največjih omejitev za alogenično presaditev kostnega mozga je, da ima samo 1/3 bolnikov ustreznega dajalca. V poštev pride tudi avtologna presaditev kostnega mozga, v večjih centrih pa se odločajo za presaditev kostnega mozga nesorodnega dajalca.

Bolniki in zdravljenje

Od januarja 1994 do junija 1996 smo na Kliničnem oddelku za hematologijo v Ljubljani zdravili 20 bolnikov z novo odkrito ANLL po protokolu AML 10 za bolnike mlajše od 55 let. V skupini je bilo 5 žensk in 15 moških. Povprečna starost bolnikov je bila 45 let, razpon starosti od 27 do 55 let.

Diagnozo ANLL smo opredelili na osnovi pregleda krvnega razmaza in punktata kostnega mozga, barvanega po metodi May-Grunwald-Giemsma. Upoštevali smo tudi izsledke citokemičnih reakcij s PAS (Periodic Acid Schiff) in peroksidazo ter alfa naftil butirat esterazo. Po priporočilu skupine francoskih, ameriških in britanskih hematologov (FAB) smo razlikovali naslednje podvrste ANLL: 4 bolniki so imeli AML-M1, 7 bolnikov AML-M2, 7 bolnikov AML-M4, 1 bolnik AL bifentipsko, 1 bolnik AL nediferencirano. Pri 20 bolnikih smo blastnim celicam v kostnem mozgu določili celična imunološka znamenja: CD 13, CD 14, CD 15, CD 33, CD 34. Pri 18 bolnikih smo določili kariogram kostnega mozga v citogenetskem laboratoriju Inštituta za varovanje zdravja.

Pri zdravljenju po shemi AML 10 (7, 10) smo za indukcijo remisije uporabili daunorubicin v dozi 50 mg/m² i.v. 1., 3. in 5. dan, citozinarabinozid 100 mg/m²/12 ur i.v. 1. do 10. dan, tioguanin 100 mg/m²/12 ur per os 1. do 10. dan, shema DAT 3 + 10 (tab. 1). Nadaljevali smo zdravljenje po shemi DAT 3 + 8. Sledilo je obdobje konsolidacije remisije, v katerem so bolniki prejeli 2 kroga citostatikov (tab. 2): 1. MACE (amsakrin 100 mg/m² v 2-urni infuziji 1. do 5. dan, citozinarabinozid 200 mg/m² dnevno kontinuirana infuzija 1. do 5. dan, Etopozid 100 mg/m² v 2-urni infuziji 1. do 5. dan); 2. MidAc (mitoksantron 10 mg/m² 1. do 5. dan i.v., citozinarabinozid 1,0 g/m²/12 ur v 2-urni infuziji 1. do 3. dan).

Celotno zdravljenje ANLL po protokolu AML 10 traja približno 6 mesecev z obdobji aplazije kostnega mozga, ki jih opazamo po vseh štirih krogih citostatikov. Zdravljenje je z manjšimi presledki bolnišnično. V tem obdobju so bolniki prejeli transfuzije koncentriranih eritrocitov in trombocitov. Okužbe smo zdravili z antibiotiki in antimikotiki. Za preprečevanje gljivičnih okužb smo uporabljali ketokonazol ali flukonazol peroralno, za selektivno dekontaminacijo črevesja pa ciprofloksacin peroralno.

Popolno remisijo smo opredelili kot odsotnost kliničnih znakov bolezni pri normalni krvni sliki in normocelularni kostni mozeg z

Tab. 3. Vzroki smrti v prvih šestih tednih od pričetka kemoterapije.

Tab. 3. Deaths within 6 weeks after start of chemotherapy.

Bolnik	Starost (leta)	FAB	Dan smrti po začetku zdravljenja	Vzrok smrti
Patient	Age (years)	FAB	Time of death	Reason of death
LM	50	M4	smrt 3. dan dead by day 3	Akutna respiratorna odpoved Acute respiratory failure Sepsa Sepsis
GM	35	M2	smrt 25. dan dead by day 25	Akutna respiratorna odpoved Acute respiratory failure Pljučnica z neznanim povzročiteljem Pneumonia with unknown pathogen Diseminirana intravask. koagulacija Disseminated intravascular coagulation
KI	55	M4	smrt 9. dan dead by day 9	Akutna respiratorna odpoved Acute respiratory failure Akutna ledvična odpoved Acute renal failure Možganska krvavitev Intracranial haemorrhage Sepsa Sepsis
SI	51	M1	smrt 35. dan dead by day 35	Akutna respiratorna odpoved Acute respiratory failure Pljučnica z neznanim povzročiteljem Pneumonia with unknown pathogen Sepsa Sepsis

Tab. 4. Vzroki smrti v prvi remisiji.

Tab. 4. Deaths in first complete remission.

Bolnik	Starost (leta)	FAB	Trajanje remisije (mesece)	Vzroki smrti
Patient	Age (years)	FAB	Duration of remission (months)	Reason of death
BJ	44	M1	3,5	Pljučnica z neznanim povzročiteljem Pneumonia with unknown pathogen
BS	28	AL – ne-diferenc. AL – undiff.	4,5	Akutna respiratorna odpoved Acute respiratory failure Diseminirana intravask. koagulacija Disseminated intravascular coagulation Sepsa Sepsis

manj kot 5% blastnih celic. O delni ali nepopolni remisiji pa govorimo, če je 5 do 15% blastnih celic v kostnem mozgu.

Rezultati

Remisijo ANLL smo dosegli pri 13 bolnikih (65%). Povprečno trajanje remisije je trajalo 11 mesecev (razpon od 2 do 28 mesecev). Dva bolnika smo kasneje morali izključiti iz protokola. Enega zaradi popuščanja srca z znaki oslabelosti srčne mišice na ehokardiogramu, drugega pa zaradi tumorja v pljučih.

Do relapsa bolezni (več kot 5% blastnih celic v kostnem mozgu) je prišlo v prvi remisiji pri 4 bolnikih (20%). Pri eni bolnici z bifenotipsko AL je prišlo do relapsa po 7 mesecih od ugotovitve remisije, pri enem bolniku z AML-M2 po 6 mesecih od ugotovitve remisije, pri drugem bolniku z AML-M2 po 1 mesecu in pol od ugotovitve remisije, pri bolnici z AML-M4 po 7 mesecih od ugotovitve remisije.

Trije bolniki (15%) so bili rezistentni na citostatsko zdravljenje (nismo dosegli remisije po dveh indukcijskih krogih citostatikov). V prvih šestih tednih citostatskega zdravljenja so umrli štirje bolniki (20%). Vzroki njihove smrti so navedeni v tabeli 3. Nato sta v obdobju prve remisije umrla še dva bolnika (10%). Vzroki njihovih smrti so navedeni v tabeli 4.

Tab. 5. Celični imunološki označevalci ob ugotovitvi bolezni.

Tab. 5. Expression of myeloid surface markers at diagnosis.

Označevalac	Št. primerov	Odstotek pozitivnih celic	Razpon (%)
Marker	No. of cases	Mean of percentage of leukaemic cells stained	Range (%)
CD 13	19	40	20–76
CD 14	18	28	21–37
CD 15	15	49	19–78
CD 33	16	61	22–99
CD 34	18	56	19–78

Tab. 6. Kariogrami kostnega mozga pri bolnikih z ANLL.

Tab. 6. Cytogenetics characteristics of patients with ANLL.

Št. No.	Bolnik Patient	FAB FAB	Kariogrami kostnega mozga Cytogenetics
1	RS	AML-M2	46, XY
2	BJ	AML-M1	ni mitoz no mitosis
3	ŠA	AML-M4	46, XY
4	OL	AML-M2	ni mitoz no mitosis
5	KJ	AML-M2	45, X, -Y, t(8:21) (q 22: q 22)
6	ZM	AML-M1	46, XY
7	KJ	AML-M4	ni mitoz no mitosis
8	AŠ	AML-M4	48, XX, t(21) t(22)
9	SH	AML-M2	46, XX, del (3) (q 13 – q ter) t(5: 19) (q 14: p 13)
10	BS	AL-undiff.	ni mitoz no mitosis
11	LM	AML-M4	46, XY
12	PS	AL-bifenotipska	46, XX
13	GM	AML-M2	ni mitoz no mitosis
14	KI	AML-M4	46, XY, del (7) (q 21–q ter)
15	SI	AML-M1	ni mitoz no mitosis
16	DD	AML-M4	47, XY, +22
17	ČI	AML-M2	46, XY, t(8:21) (q 22:q22)
18	TM	AML-M1	ni mitoz no mitosis

Opredelili smo tudi mieloične imunološke označevalce na blastnih celicah kostnega mozga (CD13, CD14, CD15, CD33, CD34). Izsledki so navedeni v tabeli 5.

Pri 18 bolnikih smo odvzeli kostni mozeg za določitev kariograma. Preiskava je bila uspešna pri 11 bolnikih (61%), pri 7 bolnikih (39%) kariograma nismo mogli narediti, ker je bilo premalo mitoz. Pri 5 bolnikih (45%) je bil kariogram normalen, pri 6 bolnikih smo ugotovili kromosomske anomalije (55%). Izsledki so navedeni v tabeli 6.

Pri eni bolnici stari 27 let z AML-M1 smo naredili alogenično presaditev kostnega mozga 7 mesecev po ugotovitvi prve remisije bolezni. 7 mesecev po presaditvi kostnega mozga je prišlo do relapsa bolezni.

Razpravljanje

Pred več kot 20 leti so ugotovili, da pri zdravljenju s citozinarabinomidom in antraciklinskimi antibiotiki dosežemo remisijo ANLL v 50 do 60% odraslih bolnikov z novo odkrito boleznijo (11). Z izboljšanjem pogojev zdravljenja v obdobju aplazije kostnega mozga (transfuzije trombocitne plazme, širokospektralni bakterioidni antibiotiki, amfotericin) se je danes odstotek doseženih remisij z istimi citostatiki povečal na 75 do 80%, nekateri centri navajajo pri bolnikih, mlajših od 55 let, 84% oziroma pri mlajših od 40 let 90% (1) remisij. V naši raziskavi smo dosegli remisijo ANLL pri 65% bolnikov, mlajših od 55 let. Ugotovili pa smo večji odstotek smrtnosti (20%) v prvih 6 tednih zdravljenja, kot ga navajajo v literaturi, 10% (12). Vzrok so verjetno slabši pogoji zdravljenja, saj ne moremo zdraviti vseh bolnikov v enopostelj-

nih sobah in je zato večja možnost prenosa okužbe iz bolnika na bolnika. Da se temu čim bolj izognemo delamo sedaj vsem bolnikom pred pričetkom zdravljenja in v obdobju aplazije kostnega mozga enkrat tedensko nadzorne kužnine: bris kože, nosu, žrela, črevesa, koprokultura. S tem dobimo pregled vsaj nad bolniki, ki so nosilci nevarnih virulentnih patogenih klic, prevsem na meticilin rezistentnega stafilokoka. Povečana pogostnost gram pozitivne septikemije je verjetno posledica uporabe centralnih venskih katetrov.

Pomemben prognostični pomen imajo pri bolnikih z ANLL kariogrami kostnega mozga. V preiskovani skupini bolnikov smo dobili kromosomske anomalije v 55% uspešno opravljenih kariogramov. Pri 39% bolnikov zaradi premajhnega števila mitoz kariograma nismo mogli narediti. Kromosomske anomalije, ki smo jih dobili pri različnih tipih ANLL se skladajo s tistimi, ki jih navajajo v literaturi. Pomen mieloičnih celičnih imunoloških znamenj na prognozo bolnikov z ANLL danes ni velik. Pomagajo nam pa pri lažjemu razlikovanju mieloblastov od monoblastov skupaj z morfologijo celic in citokemičnimi reakcijami.

Protokol AML 10 zajema 4 intenzivne cikle citostatikov, pri katerih vedno dosežemo aplazijo kostnega mozga. Vendar se zaradi intenzivnega konsolidacijskega zdravljenja izognemo dolgotrajnemu vzdrževalnemu citostatskemu zdravljenju. Menimo, da se s tem kakovost življenja bolnikov izboljša, ne glede na to, da bolniki prve mesece preživijo daljčasa v bolnišnici. Zaradi majhnega števila bolnikov sedaj nismo naredili večjih statističnih analiz. Z daljšim opazovanjem in zbiranjem bolnikov pa bomo lažje ocenili uspešnost zdravljenja po protokolu AML 10.

Literatura

1. Bohinjec J. Temelji klinične hematologije. Ljubljana: Dopsna delavska univerza Univerzum, 1983: 259-77.
2. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposal for the classification of the acute leukaemias. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-8.
3. Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol* 1988; 68: 487-94.
4. Hansen CA, Abaza M, Sheldon S, Ross CW, Schnitzer B, Stoolman LM. Acute byphenotypic leukaemias. *Br J Haematol* 1993; 84: 49-60.
5. Billstrom R, Wilson PG, Mitelman F. Chromosomes, Auer rods and prognosis in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 1988; 40: 273-8.
6. Scheinberg DA, Golde DW. The Leukemias. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS eds. *Harrison's principles of internal medicine*. 12th ed. New York: Mc GrawHill, 1994: 1764-71.
7. Rees JKH, Gray RG, Hayhoe FGJ. Treatment of acute myeloid leukaemia with 1+5 DAT or 3+10 DAT induction and intensive consolidation: Early results in 9th MRC AML trial. Abstract 104 Proceedings of the 4th International Symposium of the Therapy of Acute Leukaemias. Rome, 1987.
8. Marcos DeLima, Ghadder H, Pierce S, Estey E. Treatment of newly diagnosed acute myelogenous leukaemia in patients aged 80 years and above. *Br J Haematol* 1996; 93: 451-8.
9. Archimband E, Fiere D, Treille-Ritonnet D et al. Influence of daunorubicin and cytarabine sequencing on the outcome of therapy in acute myelogenous leukemia: a randomized trial. *Cancer Treatment Reports* 1987; 71: 571-4.
10. Buchner T, Urbanitz D, Hiddemann W et al. Intensified induction and consolidation with or without maintenance chemotherapy for acute myeloid leukaemia (AML): two multicentre studies of the German AML Cooperative Groups. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1583-9.
11. Rai KR, Holland JR, Glidewell OJ et al. Treatment of AML: a study by Cancer and Leukemia Group B. *Blood* 1981; 58: 1203-12.
12. Schiffer CA, Wade JC. Supportive care: issues in the use of blood products and treatment of infection. *Semin Oncol* 1987; 14: 545-67.

Strokovni prispevek/Professional article

NAŠE IZKUŠNJE PRI ZDRAVLJENJU AKUTNE MIELOBLASTNE LEVKEMIJE S KLADRIBINOM PRI STAREJŠIH BOLNIKI

TREATMENT OF ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA WITH CLADRIBINE IN ELDERLY PATIENTS
– OUR EXPERIENCIES

Samo Zver, Jože Pretnar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center Ljubljana, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-03-24, sprejeto 1998-04-02; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-39-42

Ključne besede: *kladribin; akutna mieloblastna levkemija; starejši bolniki, zapleti*

Izvleček—Izhodišča. Nukleozidni analog kladribin je novejšo zdravilo za zdravljenje akutnih levkemij. Po navadi se uporablja v kombinaciji s citozin-arabinozidom pri zdravljenju starejših bolnikov. Prikazujemo retrogradni pregled zdravljenja starejših bolnikov z akutno mieloblastno levkemijo (AML), ki smo jih zdravili z kladribinom in nizkimi odmerki citozin-arabinozida na Kliničnem oddelku za hematologijo od 1. 1. 1996 do 1. 3. 1998.

Metode. Z kladribinom in nizkimi odmerki citozin-arabinozida smo zdravili 14 bolnikov, 9 moških in 5 žensk. Bolniki so prejeli kladribin v odmerku 0,1 mg/kg/telesne teže sedem dni in citozin-arabinozid 13 mg/m²/telesne površine štirinajst dni zapored. Mediana starost bolnikov je bila 72 let. Deset od štirinajstih bolnikov (71%) poprej ni bilo zdravljenih s citostatiki, štirje od štirinajstih bolnikov (29%) pa so bili poprej že zdravljeni. Med zdravljenjem smo beležili število neutrofilnih granulocitov, blastnih celic v periferni krvi, število doseženih remisij bolezni in zaplete zdravljenja z kladribinom.

Rezultati. Pri štirih od štirinajstih bolnikov (29%) smo dosegli popolno remisijo bolezni, pri enem bolniku (7%) pa delno remisijo AML. Skupno je bilo zdravljenje uspešno pri petih od štirinajstih bolnikov (36%). Remisijo AML smo dosegli le pri poprej nezdravljenih bolnikih. Najmanjše število neutrofilnih granulocitov smo v povprečju zasledili dvanajsti dan zdravljenja. Prve znake regeneracije kostnega mozga v krvni sliki smo v povprečju beležili 14 dan po končani kemoterapiji. Trije od štirinajstih bolnikov (21%) so med zdravljenjem umrli. Resnejših zapletov in trajnih neželenih učinkov zdravljenja z kladribinom in citozin-arabinozidom nismo opazovali.

Zaključki. Kladribin je v kombinaciji z nizkimi odmerki citozin-arabinozida dobro in uspešno zdravilo za zdravljenje AML pri starejših bolnikih, ki poprej še niso bili zdravljeni s citostatiki. Neuspešen pa je pri bolnikih z relapsom ali rezistentno obliko AML.

Key words: *cladribine; acute myeloid leukemia; elderly patients; complications*

Abstract—Background. Nucleosid analogue cladribine is a newer drug for treatment of acute leukemias. Usually is used in combination with cytosine-arabinoside in elderly patients. We present retrograde overview of elderly patients with acute myeloid leukemia (AML), who were treated with cladribine and low doses cytosine arabinoside in Ljubljana haematologic department between 1. 1. 1996 and 1. 3. 1998.

Methods. During mentioned period we have treated 14 patients with cladribine and low doses cytosine-arabinoside, with median age of 72 years. 9 patients were males and 5 females. Patients recieved cladribine in dosage 0,1 mg/kg/body weight seven days and cytosine arabinoside 13 mg/m²/body surface area for fourteen days. 10/14 patients (71%) did not recieve chemotherapy before treatment and 4/14 patients (29%) recieved at least one cycle of chemotherapy. During the treatment we documented neutrophyl granulocyte cell count, disapperance of blast cells from peripheral blood, number of achieved remissions of AML and complications considering chemotherapy with cladribine.

Results. 4/14 patients (29%) achieved complete remission and 1/14 (7%) patients achieved partial remission of AML. Only patients who did not recieved chemotherapy before cladribine achieved remission of AML. On average the lowest neutrophyl granulocyte cell count was on day 12 after beginning of chemotherapy and the first signs of bone marrow regeneration were noticed on day 14 after completion of chemotherapy. 3/14 patients (21%) died during the treatment. We did not documented serious and long lasting side effects of cladribine and low doses cytosine-arabinoside treatment.

Conclusions. Cladribine is in combination with cytosine-arabinoside good and successfull drug for treatment of AML in elderly patients, who were not recieve chemotherapy before. But it has no effect in patients with relapsed or refractory AML.

Uvod

Kladribin (2- kloro-2-deoksiadenozin) je novejšo zdravilo v hematologiji. Prva poročila v literaturi o zdravljenju s kladribinom segajo v začetek osemdesetih let (1). Sodi med novejša kemoterapevt-

ska zdravila iz vrst nukleozidnih analogov kot naprimer tudi fludarabin in deoksikoformicin. Kladribin je citotoksični purinski analog, ki je odporen proti razgradnji z encimom adenozin deaminaza. V celice vstopi s pasivnim transportom. Po znotrajceličnem privzemu encim deoksicitidin kinaza fosforilira kladribin v kladri-

bin trifosfat. Slednji je aktivna oblika zdravila, ki ga adenozin deaminaza ne more razgraditi, zato se kopiči v celicah do toksičnih koncentracij. Citotoksičnost se izraža na dveh ravneh. Inhibira sintezo DNK v celicah, ki so v obdobju delitve tako, da zavira delovanje encima ribonukleotidna reduktaza, ki reducira ribonukleotide v deoksiribonukleotide (2). V limfoblastih se med deoksiribonukleotidi najbolj zmanjša koncentracija deoksicitozin-trifosfata (dCTP), v mieloblastih pa raven deoksiadenozin-trifosfata (dATP) (2). Tudi vključitev trifosfatne oblike kladribina v podvajajočo DNK pomeni prekinitev podvajanja DNK med celično delitvijo. Na celice v obdobju delitve delujejo tudi antraciklinski citostatiki in citozin-arabinozid (Ara-C). Bolj zanimivo in za zdravljenje pomembnejše pa je delovanje kladribina na celice, ki niso v obdobju delitve in na katere antraciklini in Ara-C ne učinkujejo (3). Velik delež relapsov potrjuje, da je velik del levkemičnih celic izven obdobja delitve (izven S obdobja mitoze) in zato odporen proti indukcijskim in konsolidacijskim protokolom kemoterapije, ki vključujejo antracikline in Ara-C. Kladribin deluje na celice, ki so izven obdobja delitve tako, da se vgradi v poškodovane dele DNK in onemogoči popravilo spremenjene DNK z popravilnimi encimi, kot sta na primer polimeraza alfa in beta (4). Nepopravljena DNK sproži začetek apoptoze v levkemični celici.

Sprva so kladribin uporabljali kot protilimfocitno zdravilo. Njegova učinkovitost je dobro znana pri bolnikih z dlakasto celično levkemijo, kronično limfatično levkemijo, Waldenstroemovo makroglobulinemijo (5, 6). Limfatične celice vsebujejo večje koncentracije encima deoksicitidin kinaza kot neutrofilni granulociti, zato je raven citotoksične oblike fosforiliranega kladribina v limfocitih večja (7). Nepričakovano pa so in vitro raziskave z kladribinom potrdile, da se kladribin hitro fosforilira tudi v blastnih celicah mieloide vrste (8). Zato so kmalu sledile prve klinične raziskave z kladribinom pri bolnikih z AML (8, 9). Santana in sod. so pri otrocih z prvimi oziroma kasnejšim relapsom AML, ki so bili zdravljeni samo s kladribinom, ugotavljali popolno remisijo pri 59% bolnikov (9). Pri odraslih bolnikih z AML, predvsem pri tistih z relapsom bolezni in za zdravljenje odporno obliko AML, pa kladribin do sedaj ni bil tako učinkovit kot pri otrocih (10, 11).

Leta 1996 smo začeli zdraviti z kladribinom starejše bolnike s primarno oz. sekundarno AML ali mielodisplastičnim sindromom (MDS) tudi na Kliničnem oddelku za hematologijo (KOH) Kliničnega centra v Ljubljani. Protokol zdravljenja je poleg kladribina vključeval tudi nizke odmerke Ara-C. Predstavljamo pregled zdravljenja starejših bolnikov z AML v obdobju od 1. 1. 1996 do 1. 3. 1998.

Bolniki in načini zdravljenja

V obdobju od 1. 1. 1996 do 1. 3. 1998 smo s kladribinom in nizkimi odmerki Ara-C zdravili 14 bolnikov z AML in MDS (tab. 1). Devet bolnikov je bilo moških in pet žensk. Mediana starost bolnikov je bila 73 let, v razponu od 61 do 83 let. Mediana starost bolnikov moškega spola 67 let je bila nižja kot srednja starost bolnic 74 let. Sedem od štirinajstih bolnikov (50%) je imelo sekundarno AML. Ta se je v štirih primerih razvila iz MDS tip 5 po FAB (francosko-ameriško-angleška razvrstitev akutnih levkemij in mielodisplastičnih sindromov), pri dveh iz MDS tip 3, enega bolnika pa smo štiri leta pred nastankom sekundarne AML zdravili zaradi nizkomalignega ne-Hodgkinovega limfoma (tab. 1). 6/14 bolnikov je imelo primarno AML, eden od štirinajstih bolnikov pa je imel primarno MDS tip 3 po FAB. Pri zdravljenju bolnikov z AML in MDS je važen tudi podatek, o poprejšnjem zdravljenju s citostatiki. Kladribin in nizki odmerki Ara-C so predstavljali indukcijsko zdravljenje s kemoterapijo pri desetih od štirinajstih bolnikov (71,4%), štirje od štirinajstih bolnikov (28,6%) pa so poprej že prejeli vsaj en krog zdravljenja s citostatiki. Pri slednjih je šlo za enega bolnika iz skupine s sekundarno AML, ter za tri bolnike iz skupine s primarno AML. Nihče med štirinajstimi bolniki ni bil ob začetku zdravljenja s kladribinom v remisiji bolezni.

Tab. 1. Bolniki, ki smo jih zdravili z kladribinom in nizkimi odmerki Ara-C na KOH v obdobju od 1. 1. 1996 do 1. 3. 1998.

Tab. 1. Patients treated with cladribine and low doses Ara-C at haematologic department between 1. 1. 1996 and 1. 3. 1998.

Bolniki, starost, spol	Diagnoza	Poprejšnja kemoterapija	Remisija bolezni in trajanje
Patients, age, sex	Diagnose	Previous chemotherapy	Remission of the disease and duration
1. PM 61 let M	AML 1.relaps	da/yes	ne/no
2. KS 77 let M	s AML (NHL)	ne/no	ne/no
3. AJ 76 let M	s AML (MDS 5)	ne/no	umrl/died
4. TA 74 let F	MDS 3	ne/no	PR 3m+/CR 3m+
5. RV 68 let M	s AML (MDS 5)	ne/no	PR 7 m/CR 7m
6. GL 81 let M	AML	ne/no	umrl/died
7. FJ 67 let M	s AML (MDS 3)	da/yes	ne/no
8. KJ 65 let M	AML 1 relaps	da/yes	umrl/died
9. MHO 61 let M	s AML (MDS 5)	ne/no	ne/no
10. OA 64 let M	AML	ne/no	DR 1m/PR 1m
11. PP 83 let F	h AL 2 relaps	da/yes	ne/no
12. ML 75 let F	s AML (MDS 1)	ne/no	ne/no
13. KZ 78 let F	s AML (MDS 3)	ne/no	PR 17m+/CR 17m+
14. ŠN 73 let F	AML	ne/no	PR 5m+/CR 17m+

AML – akutna mieloidečna levkemija; s AML – sekundarna akutna mieloidečna levkemija; NHL – nehodgkinov limfom; MDS – mielodisplastični sindrom; h AL – hibridna akutna levkemija; PR – popolna remisija bolezni; DR; delna remisija bolezni; m – mesec dni; m+ – dlje kot mesec dni; M – moški; F – ženska.

AML – acute myeloid leukemia; s AML – secondary AML; NHL – nonhodgkin lymphoma; MDS – myelodysplastic syndrome; h AL – hybrid acute leukemia; CR – complete remission; PR – partial remission; m – month; m+ – longer than month; M – male; F – female

Bolniki so prejeli kladribin v odmerku 0,1 mg/kg telesne teže/dan v podkožje ali kot 24-urno neprekinjeno infuzijo v 500 ml fiziološke raztopine 1., 3., 5., 7., 9., 11. in 13. dan od začetka zdravljenja in Ara-C v odmerku 13 mg/m² tel. površine/12 ur v podkožje 1.–14. dan od začetka zdravljenja. V obdobju aplazije kostnega mozga so vsi prejeli peroralno protibakterijsko in protiglivično profilakso s ciprofloksacinom in ketokonazolom ali flukonazolom. Okužbe in sepse smo glede na povzročitelje zdravili s cefalosporini tretje generacije, vankomicinom in amfotericinom ob sumu na glivično sepso.

Za najmanjše število nevtrofilnih granulocitov (NG) smo ocenjevali dan po začetku zdravljenja s kladribinom, ko je bilo število NG v diferencialni beli krvni sliki najmanjše, ali pa prvi dan, ko so NG izginili iz periferne krvi. Za prvi znak regeneracije kostnega mozga po aplaziji smo ocenili prvi dan po končani kemoterapiji, ko so se NG ponovno pojavili v diferencialni beli krvni sliki, oziroma dan, ko je najnižje zabeležena vrednost NG v periferni krvi pričela naraščati. Pred zdravljenjem so imeli vsi bolniki različen odstotek levkemičnih blastnih celic v periferni krvi. Zato smo bili pri bolnikih pozorni tudi na izginotje blastnih celic iz periferne krvi med zdravljenjem z kladribinom.

V obdobju regeneracije kostnega mozga smo za oceno uspešnosti zdravljenja s kladribinom opravili tudi punkcijo kostnega mozga. Popolno remisijo bolezni (PR) smo dosegli, če je bilo v kostnem mozgu manj kot 5% blastnih celic, hkrati pa v diferencialni beli krvni sliki več kot 1,5×10⁹/9 NG in bolnik ni potreboval transfuzij trombocitne plazme. Če je bilo v kostnem mozgu 5–25% blastnih celic z vsaj 15% celic rdeče vrste in 25% normalnih celic bele vrste, smo zdravljenje ocenili kot delno remisijo bolezni (DR). Več kot 25% blastnih celic v kostnem mozgu smo šteli za obliko bolezni, odporno za zdravljenje s kladribinom (12, 13). Če so se v obdobju regeneracije kostnega mozga v diferencialni krvni sliki pojavile blastne celice v večjem odstotku (na primer več kot 10%) ali če je njihov odstotek naraščal, punkcije kostnega mozga nismo naredili. Takšne bolnike smo uvrstili v skupino, ki je odporna proti zdravljenju s kladribinom.

Rezultati

Pri štirih od štirinajstih bolnikov (29%) smo dosegli popolno remisijo bolezni, pri enem bolniku (7%) pa delno remisijo bolezni.

Slednji je imel v obdobju regeneracije kostnega mozga po obdobju aplazije v kostnem mozgu 11% blastnih celic. Skupno smo bili uspešni pri petih od štirinajstih bolnikov (36%). S kladribinom in nizkimi odmerki Ara-C pa nismo uspeli doseči remisije pri devetih od štirinajstih bolnikov (64%). Vsi bolniki, ki so dosegli popolno remisijo bolezni, pred tem niso bili zdravljeni s citostatiki. Zdravljenje s kladribinom je bilo prvo indukcijsko zdravljenje njihove bolezni. Tudi bolnik, pri katerem smo dosegli delno remisijo bolezni, pred kladribinom ni prejel citostatikov. Tako smo v skupini bolnikov, ki so prejeli kladribin kot indukcijsko zdravljenje, kar pri štirih od desetih (40%) dosegli popolno remisijo bolezni, pri enem od desetih (10%) pa delno remisijo. Skupno, je bil kladribin uspešen pri petih od desetih bolnikov (50%). Zdravljenje z kladribinom pa ni bilo uspešno pri nobenem od štirih bolnikov (0%), ki so pred kladribinom prejeli vsaj en krog zdravljenja s citostatiki. Najmanjše vrednosti NG smo beležili v povprečju dvanajsti dan po začetku zdravljenja s kladribinom. Pred začetkom zdravljenja so imeli le trije bolniki normalno vrednost NG v krvi. Pri kar desetih od štirinajstih bolnikov je bila začetna vrednost NG pod $1,0 \times 10^9/L$, med temi pri petih celo pod $0,5 \times 10^9/L$. V obdobju aplazije so pri trinajstih bolnikih (92,9%) levkemične blastne celice izginile iz periferne krvi. Prve znake regeneracije kostnega mozga po aplaziji smo beležili v povprečju 14 dan (6 do 25 dni) po končanem zdravljenju s citostatiki. Le trije bolniki so v obdobju aplazije prejemali rastni faktor za granulocitno celično vrsto (G-CSF). Pri teh so se znaki regeneracije kostnega mozga pojavili 11, 12 in 22 dan po končanem zdravljenju s citostatiki. Bolniki, ki niso prejeli G-CSF, so regenerirali v povprečju 13 dni po končanem zdravljenju s citostatiki.

Med stranskimi učinki zdravljenja smo pri vseh bolnikih, 14/14 (100%), opazovali zaviralno delovanje kladribina na kostni mozeg. Vsi bolniki so v obdobju aplazije kostnega mozga vsaj dvakrat prejeli transfuzijo koncentriranih trombocitov. Le dva od štirinajstih bolnikov (14%) sta bila ves čas zdravljenja s kladribinom brez povišane telesne temperature. Pri drugih smo ugotovili vsaj enkratni porast telesne temperature. Iz kužnin (bris kože, nosne in žrelne sluznice, hemokultur...) smo izolirali po Grammu negativne bakterije, več sevov proti metilcinu odpornega stafilokoka in več sevov gliv iz rodu kandida. Pri štirih od štirinajstih bolnikov (29%) smo opazovali porast vrednosti kreatinina v serumu do 303 $\mu\text{mol/L}$. Dva bolnika (14%) sta imela diarejo in močno bruhanje. Nevrotoksičnih stranskih učinkov zdravljenja, ki bi jih lahko pripisali kladribinu, nismo ugotovili.

Trije bolniki (21%) so v času zdravljenja s kladribinom umrli. Dva sta umrla v obdobju aplazije, eden pa v obdobju regeneracije kostnega mozga. Vzroki smrti so bili obojestranska pljučnica, krvavitve v osrednje živčevje ob hkratni glivični sepsi in sepsi z metilcin odpornim *Staphylococcus aureus*. Pri avtopsiji sta imela dva bolnika v kostnem mozgu rezidualne levkemične blastne celice, pri enem pa je bil kostni mozeg aplastičen, brez rezidualnih levkemičnih blastov. Vendar so pri slednjem bolniku pri avtopsiji našli nodularno razrast levkemičnih blastnih celic v vranici.

Razpravljanje

Več kot polovica vseh bolnikov z AML je starejših od 60 let, približno tretjina pa celo starejša od 70 let (14). Glede na dejstvo, da se življenjska doba ljudi daljša, lahko v prihodnje pričakujemo še večji delež AML med starejšimi bolniki. Povprečno preživetje zdravljenih in nezdravljenih starejših bolnikov z AML je približno 20 tednov po postavitvi diagnoze (14). Pogosto gre za sekundarno AML, ki se razvije iz MDS, ali pa je posledica obsevanja in zdravljenja s citostatiki poprejšnje rakave bolezni. Zdravljenje sekundarnih oblik AML je manj uspešno kot zdravljenje primarnih oblik bolezni. Ker zdravljenje starejših bolnikov spremljajo pogostejši zapleti in ker številni med njimi niso sposobni za intenzivno zdravljenje s citostatiki, je iskanje uspešnega in primernega zdravila eden pomembnejših ciljev v hematologiji. Predvsem zaradi delo-

vanja na levkemične blastne celice, ki niso v obdobju delitve, je kladribin morda eno takšnih zdravil.

Indukcijski protokoli zdravljenja AML, ki vključujejo Ara-C v kombinaciji z antraciklinom ali epipodofilotoksinom, so, neupoštevajoč starost, učinkoviti pri 70–75% bolnikov s primarno AML in pri 30–50% bolnikov z relapsom ali resistentno obliko AML (10, 14). Podatki v literaturi o učinkovitosti kladribina pri zdravljenju AML so različni. Kladribin kot monoterapija je bil pri bolnikih z relapsom oz. na zdravljenje odporno obliko AML v dveh raziskavah učinkovit pri 8,3% oz. 0% bolnikov (10, 11). Če so kladribinu dodali še Ara-C v odmerku 1 g/m^2 so bili uspešni pri 17,6% bolnikov. Giralt in sod. (12) so pri zdravljenju z kladribinom ugotavljali pri 5/7 bolnikov (71,4%), starih 55–70 let remisijo AML. V skupini so bili bolniki z relapsom ali proti zdravljenju odporno obliko bolezni. Kladribin so dobivali v odmerku $12 \text{ mg/m}^2/\text{dan}$, skupaj z Ara-C $1 \text{ g/m}^2/\text{dan}$, oboje pet dni zapored. V literaturi nismo našli člankov o uporabi kladribina in Ara-C samo pri starejših bolnikih.

Pri nas smo bili pri zdravljenju s kladribinom in nizkimi odmerki Ara-C uspešni pri petih od štirinajstih bolnikov (36%). Pri štirih bolnikih smo dosegli PR bolezni (29%), pri enem pa DR bolezni (7%). Dva bolnika sta imela primarno AML, eden primarni MDS 3, dva po sekundarno AML, ki se je razvila iz MDS (tab. 1). Pri enem bolniku je remisija trajala 7 mesecev, ostali trije pa so še vedno v remisiji bolezni, ki traja 5, 7 in 17 mesecev. Bolnica, pri kateri remisija AML traja 17 mesecev je deset mesecev prejemala vzdrževalno zdravljenje z nizkimi odmerki Ara-C. Bolnik z DR je po mesecu dni dobil polno razvit relaps AML in kmalu zatem umrl. Nihče izmed peterice bolnikov, pri katerih je bilo zdravljenje uspešno, poprej ni prejemal citostatikov. Tako smo v skupini bolnikov, kjer je bil kladribin prvo indukcijsko zdravljenje, dosegli remisijo bolezni pri petih od desetih bolnikov (50%), med njimi pri štirih (40%) PR bolezni. Tudi v literaturi so pri starejših, poprej nezdravljenih bolnikih z AML z intenzivno kemoterapijo, podobno ali celo slabše uspešni. Remisijo AML navajajo pri 30–35% bolnikov (14). Zato smo mnenja, da je kladribin v kombinaciji z nizkimi odmerki Ara-C lahko primerno in učinkovito indukcijsko zdravljenje za starejše, poprej nezdravljene bolnike z AML. Nasprotno pa ni bil kladribin neuspešen pri nobenem od štirih, poprej že zdravljenih bolnikih z AML (100%), kar je skladno s podatki v literaturi (10, 11).

Bolniki so sedem dni prejemali kladribin v odmerku $0,1 \text{ mg/kg}$ tel. teže/dan. Ker je znano, da je razpolovna doba zdravila 70–150 minut, so bolniki prejemali zdravilo v neprekinjeni 24-urni infuziji ali pa kot enakovreden enkratni dnevni podkožni odmerek (9). Vahdat in sod. (11) so uporabljali znatno večje odmerke kladribina, od 5–21 mg/m^2 telesne površine/dan (približno $0,1\text{--}0,4 \text{ mg/kg}$ telesne teže) pet dni zapored. Zaradi hude nevtoksičnosti, ki so jo opazovali kot neželen stranski učinek zdravljenja, priporočajo najvišji dovoljen odmerek 17 mg/m^2 telesne površine/dan (približno $0,3 \text{ mg/kg}$ tel. teže/dan) pet dni zapored. Pri največjih odmerkih so opazovali tudi zelo dolge aplazije kostnega mozga in več okužb.

Več raziskav je dokazalo, da nukleozidni analog fludarabin poveča koncentracijo aktivne oblike Ara-C, to je arabinozid-citozin-trifosfata (Ara-CTP) v levkemičnih blastnih celicah (15). To je posledica zavore encima ribonukleotidna reduktaza in posledičnega znižanja koncentracije deoksiribonukleotidov v celicah. Ker pa je kladribin močnejši inhibitor ribonukleotidne reduktaze kot fludarabin, je tudi močnejši modulator metabolizma Ara-C. Z raziskavami in vitro so dokazali 65% povečanje koncentracije Ara-CTP po inkubaciji blastnih celic z kladribinom (10). Podobno so tudi s študijami ex vivo pokazali 1,2–1,4-kratni porast Ara-CTP po dodatku kladribina (10). Klinične in farmakološke raziskave z Ara-C so pokazale, da je pri odmerku zdravila 1 g/m^2 tel. površine/dan danega v dnevni infuziji dosežena najvišja koncentracija Ara-CTP v blastnih celicah. Pri tem odmerku je dosežen največji privzem zdravila v celice, zato večji odmerki Ara-C nimajo pravega učinka (16). Ker so naši bolniki prejemali znatno manjše odmerke zdravi-

la, bi lahko z večjim odmerkom Ara-C morebiti lahko dosegli boljše rezultate zdravljenja, seveda z več neželenimi učinki.

Po kladribinu in nizkih odmerkih Ara-C je pri vseh bolnikih prišlo do aplazije kostnega mozga. Pri trinajstih bolnikih (93%) so blastne celice izginile iz periferne krvi. Slednje potrjuje dobro protilevkemično delovanje zdravila. Po končani kemoterapiji smo prve znake regeneracije kostnega mozga opažali v povprečju po 14 dneh. To je približno enako dolgo, kot tudi pri drugih starejših bolnikih z AML, ki prejmejo druga, podobno intenzivna zdravljenja s citostatiki. Trije bolniki so prejeli G-CSF po tem, ko smo več dni po končani kemoterapiji preverili kostni mozeg in v njem ni bilo blastnih celic. Dva bolnika sta dosegla PR, eden pa DR bolezn. Menimo, da je G-CSF varno zdravilo, če se zanj odločimo v obdobju aplazije po tem, ko izključimo prisotnost levkemičnih celic v kostnem mozgu.

Med neželenimi stranskimi učinki zdravljenja je prevladovalo viralno delovanje kladribina na kostni mozeg. V tem obdobju so prejeli transfuzije koncentriranih eritrocitov in trombocitov. Med nehematološkimi stranskimi učinki zdravljenja smo pri štirih od štirinajstih bolnikov (29%) ugotovili zmeren, povraten porast vrednosti kreatinina v serumu, pri dveh pa diarejo in bruhanje. Porast serumskega kreatinina težko pripišemo izključno kladribinu. Bolniki so hkrati bili tudi septični in prejeli antibiotike s škodljivim delovanjem na ledvice. Tudi v literaturi ni opisanih pogostih in resnih nehematoloških stranskih učinkov zdravljenja z kladribinom pri nižjih in srednje visokih odmerkih. Navajajo blag porast aktivnosti jetrnih transaminaz, zmeren povratni porast kreatinina v serumu, simptome s strani prebavil, redko sindrom tumorske lize (11). Škodljiv učinek kladribina na ledvice postane bolj izrazit pri kumulativnem odmerku 91mg/m² tel površine. Vahdat in sod. (11) so raziskovali nevrotoksične stranske učinke zdravila. Kladribin namreč prehaja membrano med krvjo in osrednjim živčevjem. Njegova koncentracija v likvorju se giblje med 12,4–38,0% serumske koncentracije dosežene v ravnotežnostnem stanju (13). Pri odmerkih kladribina 19–21mg/m² tel. površine/dan (približno 4mg/kg tel. teže/dan) pet dni zapored je pri šestih od devetih bolnikov (66%) prišlo do razvoja hude senzori-motorne nevropatije, ki se je le delno popravila. Patomorfološko je šlo za aksonsko degeneracijo in sekundarno demielinizacijo. Zato je, kot že omenjeno, najvišji dovoljeni odmerek kladribina 17mg/m² tel. površine/dan (približno 3mg/kg tel. teže/dan) pet dni zapored. Sicer so pri visokih odmerkih kladribina beležili le blage akutne stranske učinke zdravljenja, najpogosteje s strani prebavil. Zato pa so kasneje bolniki razvili dolge aplazije kostnega mozga, ki so trajale 40 do 60 dni.

Trije od štirinajstih bolnikov (21,3%) so med zdravljenjem s kladribinom in nizkimi odmerki Ara-C umrli (tab. 1). Zanimiv je primer bolnika, ki je umrl deseti dan po končani kemoterapiji zaradi stafilokokne sepse. Pri avtopsiji je bil kostni mozeg aplastičen, brez blastnih celic. Hkrati pa so našli nodularno razrast levkemičnih blastnih celic v vranici. To je nazoren primer, kako prihaja do relapsov AML kljub začetnemu uspešnemu zdravljenju s kemoterapijo.

Zaključki

Nukleozidni analog kladribin je novejšo zdravilo pri zdravljenju AML. Je prvo zdravilo za zdravljenje akutnih levkemij, ki deluje na celice v obdobju delitve (v S obdobju mitoze) in tudi na celice, ki

se ne delijo. Glede na naše dosedaj zbrane in predstavljene izkušnje pri zdravljenju bolnikov z AML in MDS, starejših od 65 let, smo mnenja, da je kladribin primerno zdravilo za bolnike, ki poprej niso bili zdravljeni s citostatiki. Spodbudno je, da smo remisijo dosegli tudi pri bolnikih s sekundarno AML. Ker smo bolnike zdravili z nižjim odmerkom Ara-C, kot je priporočeno v literaturi, bi mogoče lahko z višjim odmerkom zdravila v prihodnosti dosegali še boljše rezultate zdravljenja. Skladno s podatki iz literature pa s kladribinom nismo dosegli remisije AML pri bolnikih, ki so bili poprej že zdravljeni s citostatiki (10). Gre za bolnike z relapsom bolezn ali proti zdravljenju primarno odporno obliko bolezn, pri katerih nikoli nismo dosegli remisije. Ta skupina bolnikov ima najslabšo napoved poteka bolezn in zanj še naprej ne poznamo učinkovitega zdravljenja. Mogoče bo pri teh bolnikih učinkovito sinergistično delovanje kladribina in interferona alfa na levkemične blastne celice, ki pa je zaenkrat še v laboratorijskem obdobju preiskovanja (17).

Literatura

1. Carson DA, Wasson DB, Beutler E. Antileukemic and immunosuppressive activity of cladribine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2232–6.
2. Griffing J, Koob R, Blakley RL. Mechanism of inhibition of DNA synthesis by cladribin in human lymphoblastic cells. *Cancer Res* 1989; 49: 6923–8.
3. Beutler E, Piro LD, Saven A, Kay AC. Cladribine: a potent chemotherapeutic and immunosuppressive nucleoside. *Leuk Lymphoma* 1991; 5: 1–8.
4. Chunduru SK, Blakeley RL. Effect of cladribinetriphosphate on nucleotide incorporation rate of human DNA polymerase alpha and beta. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1991; 32: 17–23.
5. Estey EH, Kurzrock R, Kantarjian HM et al. Treatment of hairy cell leukemia with cladribine (2 CdA). *Blood* 1992; 79: 882–7.
6. Saven A, Piro LD. Cladribine: a newer purine analogue active in the treatment of lymphoid malignancies. *Ann Intern Med* 1994; 120: 784–91.
7. Arner ESJ, Eriksson S. Selective assays for thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase and their activities in extracts from human cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 712.
8. Santana VM, Mirro J, Harwood FC, Cherrie J, Schell M, Blakeley RM. A phase 1 clinical trial of 2 CdA in pediatric patients with acute leukemias. *J Clin Oncol* 1991; 9: 416–22.
9. Santana VM, Mirro J, Kearns C, Schell MJ, Crom W, Blakeley RL. Cladribine produces a high rate complete remission in relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1992; 10: 364–70.
10. Kornblau SM, Gandhi V, Andreeff HM, Beran M, Kantarjian HM, Estey E. Clinical and laboratory studies of cladribine and cytosine arabinoside for relapsed or refractory acute myeloid leukemia in adults. *Leukemia* 1996; 10: 1563–9.
11. Vahdat L, Wong ET, Wile MJ, Rosenblum M, Foley KM. Therapeutic and neurotoxic effects of cladribine in adults with acute myeloid leukemia. *Blood* 1994; 10: 3429–34.
12. Giral S, Estey E, Albitar M, Besien K, Rondon G, Anderlini P. Engraftment of allogenic hematopoietic progenitor cells with purine analog containing chemotherapy: harnessing graft versus leukemia without myeloablative therapy. *Blood* 1997; 12: 4531–6.
13. Santana VM, Hurwitz CA, Blakley RL, Crom WR, Luo X, Roberts WM. Complete hematologic remissions induced by cladribine in children with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood* 1994; 4: 1237–42.
14. Ferrara F, Annunziata M, Copia C, Magrin S, Mele G, Mirto S. Therapeutic options and treatment results for patients over 75 years of age with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1998; 83: 126–31.
15. Gandhi V, Estey E, Keating MJ, Plunkett W. Fludarabine potentiates metabolism of cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia during therapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 116–24.
16. Plunkett W, Liliemark JO, Estey E, Keating MJ. Saturation of Ara CTP accumulation during high dose Ara-C therapy. Pharmacologic rationale for intermediate dose Ara-C. *Semin Oncol* 1987; 14: Suppl 1: 159.
17. Robak T, Korycka A. The comparison of 2.CdA in combination with interferon alfa or gamma on granulocyte-macrophage progenitor cells and clonogenic blasts in vitro cultures. *Leuk Lymphoma* 1996; 21: 161–8.

Strokovni prispevek/Professional article

MIELODISPLASTIČNI SINDROM S PRIDOBLENO KORPUSKULARNO HEMOLITIČNO ANEMIJO IN S KASNEJŠIM PREHODOM V AML – PRIKAZ PRIMERA

MYELODYSPLASTIC SYNDROME WITH ACQUIRED CORPUSCULAR HAEMOLYTIC ANAEMIA AND LATER TRANSITION IN AML – CASE REPORT

Uroš Mlakar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-04-06, sprejeto 1998-04-09; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-43-5

Ključne besede: hemolitična anemija; mielodisplastični sindrom; akutna mieloblastna levkemija

Izvleček – Izhodišča. Pridobljena korpuskularna hemolitična anemija je pri mielodisplastičnem sindromu neobičajen pojav. Vzrok za hemolizo je lahko pridobljeno pomanjkanje encima piruvat kinaze ali pridobljena bolezen hemoglobina H. Poročila, ki opisujejo korpuskularno hemolitično anemijo kot predhodnico akutne mieloblastne levkemije, so zelo redka.

Prikaz bolnika. Pri 59-letnem bolniku so odkrili hemolitično anemijo. Pred tem je bil bolnik ves čas zdrav. S kasnejšimi preiskavami smo ugotovili, da gre sočasno za pridobljeno korpuskularno hemolitično anemijo in mielodisplastični sindrom. Pri iskanju vzroka za hemolizo smo izključili večino možnih vzrokov, razen pomanjkanja piruvat kinaze. Deset mesecev kasneje se je v krvi pojavilo 1–2% blastov. Njibovo število je postopoma naraščalo. S preiskavo kostnega mozga smo ugotovili akutno mieloblastno levkemijo vrste AML-M2 po FAB razvrstitvi. Kljub intenzivnemu zdravljenju s citostatiki remisije nismo dosegli in bolnik je 6 mesecev po začetku zdravljenja umrl.

Zaključki. Avtor razpravlja o možnih vzrokih za hemolitično anemijo pri mielodisplastičnem sindromu. Pri pregledu literature je našel le nekaj poročil s podobno hematološko sliko. Hemolitična anemija je v poteku mielodisplastičnega sindroma zelo redek začetek.

Uvod

Če se akutna mieloblastna levkemija (AML) razvije iz mielodisplastičnega sindroma ali kot posledica obsevanja ali zdravljenja s citostatiki, govorimo o sekundarni AML. Mielodisplastični sindromi (MDS) so bolezni, pri katerih so v ospredju znaki odpovedi kostnega mozga. Na osnovi razvrstitve, ki jo je predlagala skupina francoskih ameriških in britanskih hematologov (FAB klasifikacija), razlikujemo pet vrst MDS (1). Pogosti prehodi v AML so predvsem pri vrsti III, IV in V. Bolniki z MDS, kjer so v ospredju znaki hemolitične anemije, so zelo redki. Opisujemo bolnika s pridobljeno korpuskularno hemolitično anemijo in znaki MDS, pri katerem se je leto kasneje razvila AML. Zdravljenje s citostatiki ni bilo učinkovito.

Key words: haemolytic anaemia; myelodysplastic syndrome; acute myeloblastic leukaemia

Abstract – Background. Acquired corpuscular haemolytic anaemia may appear as an unusual manifestation of myelodysplastic syndrome. The underlying cause for red cell destruction are acquired severe pyruvate kinase deficiency or acquired haemoglobin H disease. Only very few papers describe acquired corpuscular haemolytic anaemia as an early symptom of acute leucoblastic leukaemia.

Methods, results. A 59-year-old previously healthy man was found to have haemolytic anaemia. Further studies revealed a myelodysplastic syndrome and acquired corpuscular haemolytic anaemia. The underlying cause for the red cell destruction was not found, but pyruvate kinase was not evaluated. Ten months later 1–2% of blast cells in the peripheral blood were noted which increased progressively. Subsequently a diagnosis of acute myeloblastic leukaemia M2 was made according to the FAB co-operative group criteria. Although intensive chemotherapy was performed, the patient did not achieve remission and died 6 months later.

Conclusions. The author discusses possible causes for underlying red cell defect. A review of literature reveals very few previous reports with this haematological picture. Haemolytic anaemia is an unusual manifestation of myelodysplastic syndrome.

Prikaz bolnika

59-letni bolnik je decembra 1994 poiskal pomoč pri splošnem zdravniku, ker je postal rumen. Do tedaj je bil ves čas zdrav. V sorodstvu ni bilo oseb, ki bi se zdravile zaradi krvne bolezni. Bolniku so ugotovili makrocitno anemijo in zvečano koncentracijo bilirubina v serumu ter se odločili za zdravljenje z vitaminom B₁₂. Maja 1995 so bolnika sprejeli v področno bolnišnico zaradi poslabšanja anemije. Imel je splošne simptome in znake anemije. Barva kože je bila blede rumena. Nad srcem so slišali sistolični šum. Ugotovili so makrocitno anemijo z retikulocitozo (hemoglobin (Hb) 60 g/L, povprečni volumen eritrocitov (PVE) 118 fL, število retikulocitov (Rt) $438 \times 10^9/L$). Posamezni eritrociti so bili bazofilno punktirani. V serumu so bili prisotni kazalci povečane razgradnje eritrocitov: zvečana koncentracija nekonjugiranega bilirubina (celokupni bilirubin 125 umol/L, direktni 10 umol/L) in laktat dehidrogenaze (LDH 6,9 ukat/L) ter znižana koncentracija haptoglobina (<0,1 g/L). Reakcija na hemosiderin v urinskem sedimentu je bila pozitivna.

V kostnem mozgu so ugotovili razrast celic rdeče vrste. Coombsov test je bil negativen, hladnih aglutininov pa ni bilo. Koncentracija železa v serumu je bila zvečana (Fe 54 $\mu\text{mol/L}$, TIBC 67 $\mu\text{mol/L}$). Koncentraciji folatov in vitamina B₁₂ v serumu sta bili normalni. Na osnovi zgornjih izsledkov so zaključili, da ima bolnik Coombs negativno hemolitično anemijo. Začeli so zdravljenje z glukokortikoidi (metilprednizolon 64 mg/dan). Bolnik je prejemal tudi folno kislino. Ker zdravljenje ni bilo uspešno, so bolnika zaradi nadaljnjih preiskav premestili na Klinični oddelek za hematologijo v Ljubljani.

Klinični izsledki so bili v času preemestitve enaki kot v področni bolnišnici. Prav tako ni bilo bistvenih sprememb v rdeči krvni sliki (Hb 57 g/L, PVE 120 fL, Rt 474 $\times 10^9/\text{L}$, bazofilno punktirani eritrociti 1%). V krvni sliki je bila prisotna še trombocitopenija ter nevtrofilija z blagim pomikom v levo (trombociti (Tr) 78 $\times 10^9/\text{L}$, levkociti (L) 23 $\times 10^6/\text{L}$, diferencialna krvna slika (DKS): metamielociti 3%, paličasti nevtrofilci 8%, segmentirani nevtrofilci 50%, eozinofilci 1%, bazofilci 5%, limfociti 21%, monociti 11%, normoblasti 1%). S citološko preiskavo kostnega mozga so ugotovili razrast celic rdeče vrste z znaki diseritropoeze. Količnik med celicami granulocitne vrste in eritroblasti (G/E) je bil 1/1. Število megakariocitov ni bilo povečano. Delež blastov je bil ocenjen na 14% ne-eritroidnih celic (vse jedrne celice brez eritroblastov). Z reakcijo na železo smo ugotovili 8% prstanastih sideroblastov in siderocite. Količina železa je bila v makrofagih nekoliko povečana. Življenjska doba bolnikovih eritrocitov, ki so jih označili z Cr⁵¹, je bila skrajšana ($t_{1/2}$ 14 dni, normalno 24–32 dni). Tako označeni eritrociti so se v večji meri kopičili v vranici. Kasneje smo določili še življenjsko dobo svežih heterolognih eritrocitov. Razpolovna doba teh je bila normalna, brez znakov povečane razgradnje v vranici. Vrednosti kazalcev pospešene razgradnje eritrocitov ter izsledki Coombsovega testa in določitve hemosiderina v urinskem sedimentu so bili podobni tistim iz področne bolnišnice. Aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (2,99 $\mu\text{kat}/10^{12}$ eritrocitov) in delež Hb F (8,4%) v eritrocitih sta bila povečana. Elektroforeza Hb in delež Hb A₂ sta bila normalna. Normalni so bili tudi izsledki testa ozmotske rezistence pred 24-urno inkubacijo in po njej, testa hemolize v izotonični raztopini glukoze in Hamovega testa ter testov za dokaz nestabilnih Hb (test provokacije Heinzovih teles, propranololski test in test s segregiranjem). Proti-trombocitnih protiteles ni bilo. Ocenili smo, da gre pri bolniku za korpuskularno hemolitično anemijo s sočasnimi spremembami v kostnem mozgu (povečan delež blastov, diseritropoeza), ki so značilne za mielodisplastični sindrom vrste III po FAB klasifikaciji (1). Bolnika smo zdravili s transfuzijami eritrocitov. Število levkocitov se je po opustitvi zdravljenja z glukokortikoidi normaliziralo.

Po opustitvi iz bolnišnice je bolnik občasno prejemal transfuzije eritrocitov. Naslednjih deset mesecev v krvni sliki nismo opazili novih sprememb. Poleg anemije z retikulocitozo je bila ves čas prisotna blaga trombocitopenija. DKS je ostala nespremenjena. Od aprila 1996 dalje se je postopoma začelo zmanjševati število trombocitov. Hkrati so se v DKS pojavili tudi levkemični blasti (1–2%). Julija 1996 smo bolezen ocenili ponovno. Krvna slika je bila naslednja: Hb 86 g/L, PVE 104 fL, Rt 995 $\times 10^9/\text{L}$, Tr 46 $\times 10^9/\text{L}$, L 6 $\times 10^6/\text{L}$, blasti 2%, mielociti 1%, paličasti nevtrofilci 9%, segmentirani nevtrofilci 49%, limfociti 30%, monociti 3%, eritroblasti 5%. Izsledki citološke preiskave kostnega mozga je ustrezal akutni mieloblastni levkemiji – AML-M₄ po FAB. V ospredju je bila razrast rdeče vrste (G/E 1/16) in kopičenje blastnih celic (48% ne-eritroidnih celic). S citogenetično preiskavo kostnega mozga smo ugotovili normalni kariotip brez vidnih kromosomskih sprememb. Ker bolnik ni imel večjih težav, se za zdravljenje s citostatiki ni odločil. Naslednjih enajst mesecev smo nadaljevali zdravljenje s transfuzijami eritrocitov. V krvi je postopoma naraščal delež blastov. Hkrati z zmanjševanjem učinkovite eritropoeze (padec števila retikulocitov) so znaki hemolize postajali manj izraziti. Povečevala se je trombocitopenija. Zaradi začetka zdravljenja s citostatiki smo bolnika junija 1997 sprejeli v bolnišnico. V krvni sliki je bila anemija brez retikulocitoze, trombocitopenija in kopičenje blastov (Hb 86 g/L, Rt 77 $\times 10^9/\text{L}$, Tr 10 $\times 10^9/\text{L}$, L 52 $\times 10^6/\text{L}$, blasti 54%). V kostnem mozgu so prevladovali blasti (80% vseh jedrnih celic). Glede na morfološke in imunološke značilnosti smo blaste opredelili za mieloblaste. Imunološki fenotip blastov je bil CD33⁺, cCD13⁺, mieloperoksidaza⁺, HLA DR⁺, CD14⁺, glikoforin A⁺. Tudi tokrat s citogenetično preiskavo kostnega mozga nismo ugotovili kromosomskih sprememb. Zgornji izsledki so bili skladni s polno razvito AML-M₂ po FAB. Odločili smo se za indukcijsko zdravljenje po shemi, ki jo priporočajo za starejše bolnike, tj. idarubicin 8 mg/m² iv 3 dni, etopozid 60 mg/m² iv 5 dni in ARA-C 200 mg/m² iv 7 dni (2). Zdravljenje ni bilo uspešno. Tri tedne po zaključku kemoterapije je bilo v kostnem mozgu še vedno 80% blastov. Zaradi napredovanja bolezni smo oktobra 1997 poskusili še zdravljenje z velikimi odmerki citostatikov (ARA-C 3 g/m² 12^h iv 1–4 dan in mitoksantron 12 mg/m² 3–5 dan). Po obdobju aplazije smo tudi tokrat ugotovili kopičenje blastov v kostnem mozgu. Ocenili smo, da je levkemija odporna proti zdravljenju s citostatiki in da prihaja v poštev le simptomatično zdravljenje.

Teden dni po odpustu smo bolnika ponovno sprejeli v bolnišnico zaradi septičnega stanja. Zdravljenje z antibiotiki ni bilo uspešno in bolnik je teden dni po sprejemu umrl.

Razpravljanje

Pri MDS so praviloma v ospredju znaki odpovedi kostnega mozga (anemija, trombocitopenija, nevtropenija). Če so prisotni znaki hemolize, je treba upoštevati možnost sovpadanja dveh bolezni. Sočasnost podedovane hemolitične anemije z MDS pri našem bolniku ni verjetna, saj se je hemolitična anemija pri bolniku pojavila šele v 59. letu starosti, hkrati pa tovrstne anemije pri njegovih sorodnikih ni bilo. Tudi z laboratorijskimi preiskavami smo pogostejše podedovane hemolitične anemije izključili.

V literaturi so opisani bolniki z MDS in AML s sočasno avtoimunsko hemolitično anemijo (3, 4). Coombsov test je bil v nekaterih primerih negativen. Zdravljenje z glukokortikoidi je bilo uspešno (4). Proti taki možnosti v našem primeru govori neuspešno zdravljenje z glukokortikoidi, predvsem pa normalna razpolovna doba transfundiranih heterolognih eritrocitov.

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je pridobljena hemolitična anemija, ki v redkih primerih preide v AML. To je klonška bolezen z značilno napako v membrani. Posledica napake je povečana dovzetnost za litični učinek komplementa in intravaskularna hemoliza. Če se razvije AML, izvirajo levkemični blasti iz PNH klona (5). Čeprav smo tudi pri našem bolniku ugotovili znake kronične intravaskularne hemolize (hemosiderin v urinu), ni imel drugih značilnosti za PNH (Hamov test).

Anemija je pri MDS pogosta, saj se jo ugotovi v več kot 85% (6). Praviloma je anemija posledica neučinkovite eritropoeze. V krvnem razmazu lahko ugotovimo nenormalno oblikovane eritrocite, npr. eliptocite, dakricite, sferocite in shizocite. Pojavijo se lahko bazofilno punktirani eritrociti in normoblasti. Druge nepravilnosti eritrocitov, ki jih lahko ugotovimo pri MDS, so še povečana koncentracija Hb F, zmanjšana aktivnost nekaterih encimov, povečana občutljivost na komplement in sprememba antigenov krvnih skupin (6). Le v zelo redkih primerih je napaka v eritrocitih taka, da pripelje do hemolitične anemije. Kot vzrok hemolitične anemije pri MDS ali AML zaradi pridobljene napake so do sedaj opisali

1. pridobljeno bolezen s Hb H in
2. pridobljeno hudo pomanjkanje encima piruvat kinaze.

V prvem primeru gre za pridobljen sindrom talasemije alfa (7). Zaradi zavore sinteze verig alfa se verige beta, ki so v prebitku, združijo v tetramer, imenovan Hb H. Ta je nestabilen in se obori. Nastali precipitati se pri supravitalnem barvanju prikažejo kot Heinzovi telesca. Ker pri našem bolniku ni bilo mikroцитoze niti Heinzovih teles, menimo, da ni šlo za tovrstno napako.

Pomanjkanje piruvat kinaze sodi med pogoste pridobljene napake eritrocitov pri MDS in AML. Ta napaka je prisotna v 1/3–1/2 primerov (8). Druge manj pogoste napake so pomanjkanje fosfofruktokinaze, bifosfoglicerat mutaze, adenilat kinaze in glukoza fosfat izomeraze (8). Pogosto je hkrati prisotnih več encimskih napak. Pridobljeno pomanjkanje encimov je zmerno. Aktivnost encima praviloma ni manjša od 50% normalne vrednosti, zato ne povzroča kliničnih ali hematoloških simptomov. Le v zelo redkih primerih je lahko pomanjkanje encimov take stopnje, da privede do nastanka hemolitične anemije. Naš primer je še najbolj podoben trem do sedaj objavljenim primerom s hemolitično anemijo zaradi pridobljenega hudega pomanjkanja encima piruvat kinaze in kasnejšim prehodom v AML (9–11). V opisanih primerih je bila hemolitična anemija ugotovljena približno leto dni pred preobrazbo v AML. Kromosomskih sprememb v celicah kostnega mozga niso ugotovili. V enem primeru so bili v kostnem mozgu prisotni tudi znaki diseritropoeze. Remisijo AML so dosegli le v enem primeru. Aktivnost piruvat kinaze pri našem bolniku žal nismo določili. Glede na podobnost z zgoraj omenjenimi primeri zato lahko le domnevamo, da je tudi v našem primeru morda šlo za pridobljeno pomanjkanje piruvat kinaze.

Med spremljanjem bolezni smo opazovali postopen prehod od MDS v AML-M2. V začetnem obdobju AML, ko je bila eritropoeza še kompenzatorno povečana, je citološki izsledok kostnega mozga ustrezal FAB kriterijem za AML M6 (akutna eritroleukemija). Zanj ni značilno zelo povečano število retikulocitov v krvi, ki je znak povečanja učinkovite eritropoeze. Pri razlikovanju AML-M6 od drugih vrst AML, če je slednjim pridružena hemolitična anemija, so v pomoč tudi kazalci hemolize in odsotnost nekaterih za rdečo vrsto značilnih molekul (glikoforin A) na površini blastov.

Zaključek

Pridobljena korpuskularna hemolitična anemija je pri MDS in AML redek pojav. Vzrok za njen nastanek je pridobljeno hudo pomanjkanje encima piruvat kinaze ali pridobljena bolezen s Hb H. Pri razlikovanju od eritroleukemije (AML M6) so v pomoč povečano število retikulocitov, znaki hemolize in odsotnost za rdečo vrsto značilnih molekul na površini levkemičnih blastov.

Literatura

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposed revised criteria of the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British cooperative group. *Ann Intern Med* 1985; 103: 626-9.
2. Leoni F, Giolli S, Ginliani G et al. Attenuated-dose idarubicin in acute myeloid leukemia of elderly. *Br J Haem* 1995; 90: 164-74.
3. Tamura H, Ogata K, Yokose N et al. Autoimmune hemolytic anemia in patients with de novo acute myelocytic leukemia. *Ann Hematol* 1996; 72: 45-7.
4. Tamura S, Konya H, Miyazaki E et al. Coombs negative autoimmune hemolytic anemia in patient with myelodysplastic syndrome. *Rinsho Ketsueki* 1991; 32: 132-6.
5. Shichishima T, Terasawa T, Hashimoto C et al. Discordant and heterogeneous expression of GPI-anchored membrane proteins on leukemic cells in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993; 81: 1855-62.
6. Lichtman MA, Brennan JK. Myelodysplastic disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ eds. *Williams Hematology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1995: 257-72.
7. Abbondanzo SL, Anagnou NP, Sacher RA. Myelodysplastic syndrome with acquired hemoglobin H disease. Evolution through megakaryoblastic transformation into myelofibrosis. *Am J Clin Pathol* 1988; 89: 401-6.
8. Kahn A. Abnormalities of erythrocyte enzyme in dyserythropoiesis and malignancies. *Clinics in Haematology* 1981; 10: 123-38.
9. Ieki R, Miwa S, Fujii H, Kudoh S, Kimura H, Takaku F. Patient with pyruvate kinase deficiency developed acute myelogenous leukemia. *Am J Hematol* 1990; 34: 64-8.
10. Korenberg A, Goldfarb A. Preleukemia manifested by hemolytic anemia with pyruvate-kinase deficiency. *Arch Intern Med* 1986; 146: 786-6.
11. Helmstadter V, Arnold H, Blume HG, Uhl N, Hunstein W. Acquired pyruvate kinase deficiency with hemolysis in preleukemia. *Acta Haemat* 1977; 57: 339-43.

Neupogen[®]

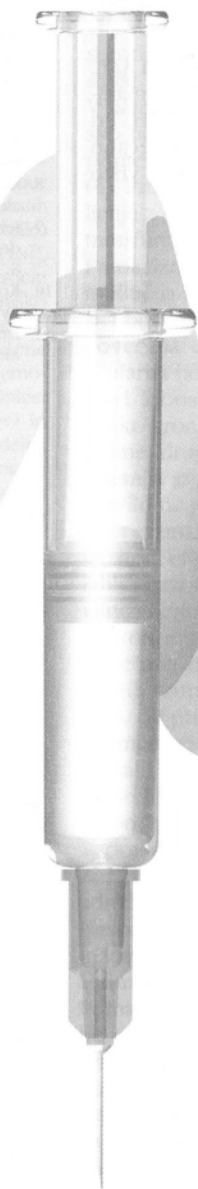
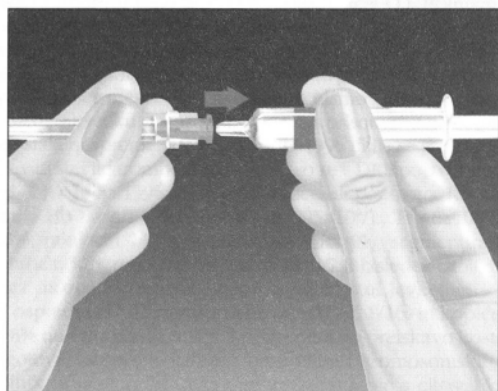
filgrastim

G-CSF

PREDHODNO NAPOLNJENE INJEKCIJSKE BRIZGE

... enkratno in preprosto

Neupogen veliko prispeva k zdravljenju raka. Pospešuje dvig števila nevtrofilcev po citotoksični kemoterapiji (1, 2) in izboljša možnosti za izvajanje celotne kemoterapije po predvidenem urniku (2-4). Zmanjša število infekcijskih zapletov in občutno izboljša kvaliteto življenja. Pri posameznikih lahko prepreči nevtropenijo in infekcije, zaradi česar se ne razvijejo niti stres niti anksiozna stanja (5).



- Enkratna oblika zdravila z vsebnostjo G-CSF
- Pripravljen v korist bolnikov in zdravstvenih delavcev
- Olajša uvajanje samozdravljenja
- Hitrejša uporaba od dajanja zdravila z običajnimi injekcijami in ampulami
- Prilagodljivost zaradi 30- in 48- milijoni I.E. odmerkov v predhodno napolnjenih injekcijskih brizgah
- Preprosta uporaba in dajanje

Literatura

1. Crawford J, Ozer H, Stoller R in sod. *New England Journal of Medicine* 1991; 325: 164-170.
2. Trillet-Lenoir V, Green J, Manegold C in sod. *European Journal of Cancer* 1993; 29A(3): 319-324.
3. Pettengell R, Gurney H, Radford J in sod. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* 1992; 11:319 (Abstract 1083).
4. Gabrilove JL, Jakubowski A, Scher H in sod. *New England Journal of Medicine* 1988; 318: 1414-1422.
5. Traynor B. Quality of life with filgrastim (r-metHuG-CSF). V: *Filgrastim (r-metHuG-CSF) in Clinical Practice*. Morstyn G, Dexter TM (eds). New York: Marcel Dekker 1994, pp 319-337-

Strokovni prispevek/Professional article

ZDRAVLJENJE ČISTE APLASTIČNE ANEMIJE PRI BOLNIKU S KRONIČNO LIMFOCITNO LEVKEMIJO

TREATMENT OF PURE RED CELL APLASTIC ANEMIA IN PATIENT WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Mojca Bervar¹, Peter Černelc²

¹ Oddelek za bolezni srca, pljuč in ožilja, Splošna bolnišnica Celje, Oblakova 5, 3000 Celje

² Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-03-24, sprejeto 1998-04-02; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-47-9

Ključne besede: zdravljenje; ciklosporin; oksimetolon; metilprednizolon; fludarabin

Izveček – Izhodišča. Čista aplastična anemija (ČAA) je redek zaplet kronične limfocitne levkemije (KLL) in je posledica protitelesnega in celičnega zaviralnega delovanja na dozorevanje usmerjene matične celice rdeče vrste. Za zdravljenje ČAA pri bolnikih s KLL najpogosteje uporabljamo učinkovine z zaviralnim delovanjem na imunski odziv, kot so glukokortikoidi, ciklosporin in protilimfocitni globulin, redkeje pa androgene steroide.

Naš primer. 68-letnemu bolniku, ki se je tri leta zdravil zaradi KLL, smo marca 1996 ugotovili ČAA. Zaradi razširjene KLL in neuspešnega zdravljenja s klorambucilom in metilprednizonom smo ga začeli zdraviti s fludarabinom. Po zdravljenju so se zmanjšale bezgavke in število limfocitov v krvi, medtem ko se anemija ni popravila. Na osnovi hude anemije, zelo zmanjšanega števila retikulocitov v krvi, odsotnosti celic rdeče vrste v kostnem mozgu in kopičenja limfocitov ob še ohranjeni granulopoezi in megakariopoezi smo menili, da gre za ČAA. Ker se po zdravljenju s glukokortikoidi anemija ni popravila, smo začeli zdravljenje s ciklosporinom (Sandimmun Neoral) 200 mg/dan. Po mesecu dni se je povečalo število retikulocitov in koncentracija Hb do 100 g/L vendar, ker nadaljnega porasta nismo zasledili, smo ciklosporin ukinitili in se odločili za zdravljenje z oksimetolonom (Anapolon) 100 mg/dan. Po enomesečnem zdravljenju se je povečalo število retikulocitov in koncentracija hemoglobina na 126 g/L, zato smo oksimetolon ukinitili.

Zaključki. Ker se ČAA najpogosteje pojavi pri razširjeni KLL, je priporočljivo sočasno zdraviti KLL in ČAA. Slednje je pri našem bolniku potrdila dolga remisija ČAA po zdravljenju s ciklosporinom in androgenimi steroidi ter KLL s fludarabinom.

Uvod

Čisto aplastično anemijo (ČAA) je prvi opisal ločeno od aplastične anemije Kaznelson leta 1922 (1). Za ČAA je značilna normokromna normocitna ali makrocitna anemija z zelo zmanjšanim številom retikulocitov v krvni sliki in odsotnost samo celic rdeče vrste v kostnem mozgu. Granulopoeza in megakariopoeza sta v kostnem mozgu ohranjeni. Pri hudi aplastični anemiji je za razliko od ČAA v krvni sliki prisotna pancitopenija zaradi prizadetosti vseh treh vrst krvnih celic.

Key words: therapy; cyclosporine; oxymetholone; methylprednisolone; fludarabine

Abstract – Background. Pure red cell aplastic anaemia is a very rare complication of chronic lymphocytic leukaemia (CLL). It is probably caused by humoral and/or T lymphocytic interference with the growth and differentiation of red cell precursors. Most patients with CLL-associated pure red cell aplastic anaemia are treated with immunosuppressive drugs, such as glucocorticoids, cyclosporine or antilymphocyte globulin, and less frequently with androgen steroids.

Case report. A 68-year-old patient with CLL developed pure red cell aplastic anaemia after 3 years of treatment with chlorambucil and methylprednisolone. Because of advanced CLL, fludarabine was instituted. Two months later, the lymph nodes became smaller and the lymphocyte count decreased, but the anaemia and reticulopenia persisted. The patient was given cyclosporine (Sandimmun-Neoral) in a dose of 200mg/day. After a month of this treatment, the reticulocyte count increased and the haemoglobin rise to 100 g/L. As no further improvement was noted over the next month, cyclosporine was substituted with oxymetholone (Anapolon) 100 mg/day. After a month, the reticulocyte count increased, the haemoglobin reached 126 g/L, and oxymetholone was withdrawn.

Conclusion. Since pure red cell aplastic anaemia mostly occurs in association with advanced CLL, simultaneous treatment of both disorders is advisable. Our patient experienced a prolonged remission of the anaemia after treatment with a combination of cyclosporine, androgen steroids and fludarabine.

V klinični sliki prevladujejo težave zaradi anemije ter bledica kože in sluznic. Glede na začetek in potek ločimo akutno in kronično obliko ter prirojeno in pridobljeno ČAA. Akutna oblika se lahko pojavi pri sferocitozi, pridobljeni hemolitični anemiji, paroksizmalni nočni hemoglobinuriji, po nekaterih virusnih okužbah, kroničnih limfoproliferativnih boleznih in ob uživanju difenilhidantoina ali rifampicina (2). Značilno zanjo je, da mine po uspešnem zdravljenju osnovne bolezni ali ukinitvi zdravila. Usmerjeno zdravljenje anemije ni potrebno.

Čista aplastična anemija pri bolnikih s kronično limfocitno levkemijo (KLL) sodi med kronične pridobljene oblike te bolezni. Poleg KLL se lahko kronična oblika pojavi tudi pri sistemskem lupusu eritematozusu, revmatoidnem artritisu, kroničnem aktivnem hepatitisu, hemolitični anemiji in timomu (3).

Nekateri avtorji menijo (4–6), da je čista aplastična anemija pri KLL povezana z nastankom protiteles proti usmerjeni matični celici rdeče vrste in eritropoetinu (4), lahko pa je tudi posledica pomnožitve limfocitov T celic zaviralov v kostnem mozgu, ki naj bi zavirale razvoj celic rdeče vrste (4).

Ker so pri napredovali KLL prizadete vse tri celične vrste, slednje pa poslabša še zdravljenje s citostatiki, čisto aplastično anemijo pogosto težje prepoznamo. Pogostnost pojavljanja ČAA pri bolnikih s KLL ni natančno znana. Po nekaterih avtorjih (7) naj bi ČAA nastala pri 6% bolnikov z razširjeno KLL.

Prikazujemo bolnika z razširjeno KLL, pri katerem smo ugotovili ČAA in smo jo najprej neuspešno zdravili z metilprednizolonom, nato pa uspešno s ciklosporinom in oksimetolonom.

Prikaz primera

Potek bolezni

68-letnega bolnika, ki so mu v krvni sliki slučajno odkrili absolutno limfocitozo, smo decembra 1993 pregledali v hematološki ordinaciji. Bolnik je bil brez težav, pri pregledu nismo ugotovili povečanih bezgavk v vratu, pazduhah in dimljah ter povečanih organov v trebuhu. V krvni sliki je bilo število limfocitov $26,8 \times 10^9/L$, koncentracija hemoglobina 146 g/L , število retikulocitov $68 \times 10^9/L$, število trombocitov $235 \times 10^9/L$. Po izsledkih citološkega in histološkega pregleda kostnega mozga je bil ta izrazito hiperceularni kostni mozeg, odsotnost maščobe, odnos celic granulocitne vrste proti celicam rdeče vrste so bili 3:1, s kopičenjem malih limfocitov (več kot 80%) in še prisotnimi celicami rdeče vrste, granulociti in megakariociti. Menili smo, da gre za KLL.

Sprva bolnik ni potreboval zdravljenja. Avgusta 1994 smo ugotovili povečanje števila limfocitov v krvi do $118 \times 10^9/L$. Zdraviti smo ga začeli s klorambucilom (Leukeran) 20 mg (10 mg/m^2 telesne površine) na dan 5 dni. Zdravljenje smo ponovili dvakrat v presledku štirih tednov. Po zdravljenju se je število limfocitov zmanjšalo na $61,1 \times 10^9/L$. Po devetih mesecih smo ugotovili poslabšanje bolezni s potenjem, utrujenostjo in povečanjem bezgavk v vratu do velikosti lešnika ter vranice, ki je segala 2 cm pod levi rebri lok. Ponovili smo dva kroga zdravljenja s klorambucilom. Zdravljenje je bilo neučinkovito. Pojavila se je anemija s koncentracijo hemoglobina 77 g/L in zmanjšanje števila retikulocitov na $5 \times 10^9/L$. Pričeli smo zdravljenje z metilprednizolonom (Medrol) 16 mg vsak drugi dan. Ker se po enomesečnem zdravljenju anemija ni popravila, število limfocitov pa se je povečalo na $168 \times 10^9/L$, smo ponovili 5-dnevno zdravljenje s klorambucilom 20 mg dnevno in metilprednizolonom 32 mg dnevno. Ker je bilo tudi to zdravljenje neučinkovito, smo bolnika marca 1996 sprejeli na Hematološko kliniko.

Preiskave

Ob sprejemu smo ugotovili: število levkocitov $71,7 \times 10^9/L$, število limfocitov $58,6 \times 10^9/L$, število nevtrofilnih granulocitov $4,4 \times 10^9/L$, število eritrocitov $2,38 \times 10^{12}/L$, število retikulocitov $5 \times 10^9/L$, koncentracija hemoglobina 74 g/L , PVE 93 fl , PHE $31,2 \text{ pg}$, število trombocitov $170 \times 10^9/L$. Pri pregledu smo ugotovili hiperceularnen kostni mozeg zaradi kopičenja pretežno malih limfocitov (98%), nekaj celic granulocitne vrste in megakariocitov. Celic rdeče vrste ni bilo. Izledek je ustrezal razširjeni KLL. S histološkim pregledom kostnega mozga smo ugotovili difuzno infiltracijo z malimi limfociti. Coombsov test je bil negativen. Izsledki biokemičnih preiskav in proteinograma so bili v normalnem območju. Z UZ trebuha smo ugotovili žolčne kamne ter zmerno zvečano vranico in bezgavke ob trebušni aorti.

Zdravljenje

Zaradi razširjene KLL s hudo anemijo in neučinkovitega zdravljenja s klorambucilom in glukokortikoidi smo bolnika začeli zdraviti s fludarabinom (Fludara) 50 mg dnevno i.v. 5 dni in transfuzijami koncentriranih eritrocitov. Povečanih bezgavk in vranice štiri tedne po končanem zdravljenju nismo več otipali. Zaradi še prisotne hude normocitne normokromne anemije in zelo zmanjšane števila retikulocitov v krvni sliki ter odsotnosti

celic rdeče vrste v kostnem mozgu smo menili, da ima bolnik poleg KLL še ČAA.

Zdraviti smo ga začeli s ciklosporinom (Sandimmun Neoral) 200 mg dnevno (3 mg/kg telesne teže). Povprečna koncentracija ciklosporina v krvi je bila 78 ug/L . Po enomesečnem zdravljenju se je koncentracija hemoglobina povečala za 20 g/L , število retikulocitov pa je bilo $50 \times 10^9/L$. Ker smo po mesecu dni ugotovili ponovno poslabšanje anemije in zmanjšanje števila retikulocitov, smo poskusili zdravljenje z oksimetolonom (Anapolon) 100 mg dnevno. Po enomesečnem zdravljenju je poraslo število retikulocitov do $83 \times 10^9/L$ in koncentracija hemoglobina do 112 g/L . Dnevni odmerki oksimetolona smo nato razpolovili, po enem mesecu pa smo ga ukiniteli. Koncentracija hemoglobina se je povečala na 120 g/L , število retikulocitov pa je bilo $61 \times 10^9/L$. Remisija ČAA traja že 15 mesecev.

Razprava

Čeprav so že v 60 letih opisali ČAA pri bolnikih s KLL in menili, da je vzrok za njihov nastanek imunski, so šele v 90. letih s poizkusi in vitro to tudi potrdili (5). V serumu bolnikov s ČAA pri KLL so ugotovili specifična protitelesa proti matični celici rdeče vrste, pri nekaterih pa tudi protitelesa proti eritropoetinu (4–6). Poleg tega so dokazali povečano število limfocitov T celic zaviralov, za katere so menili, da imajo vlogo pri nastanku ČAA (2, 3, 5, 7).

Na osnovi teh ugotovitev se je zdravljenje čiste aplastične anemije pomembno spremenilo. Sprva so uporabljali klorambucil (2, 3) in ciklofosfamid (2, 3), zaradi neučinkovitosti in onkogenih neželenih učinkov pa so ju zamenjali za ciklosporin (2), glukokortikoide (2, 3, 5–7) in protilimfocitni globulin (2, 3, 6). Zdravljenje ČAA s slednjimi učinkovinami je uspešno v 60% (8). Opisani pa so tudi primeri učinkovitega zdravljenja s plazmaferezo (2).

Način delovanja ciklosporina pri ČAA ni povsem znan. Ciklosporin zmanjša proizvodnjo citokinov, kot sta interleukin-2 in interferon gama, za katera je znano, da zavirata eritropoezo (9). Poleg tega pa ciklosporin najverjetneje zmanjša tudi spremenjen klon limfocitov T, ki sodelujejo pri nastanku ČAA (10).

Androgeni steroidi, ki smo jih uporabljali pred tem, so izgubili svoj pomen. Danes jih uporabljamo pri vzdrževanju remisije po izboljšanju ČAA ali pa če niso učinkoviti drugi načini zdravljenja. Ugoden učinek androgenih steroidov so opisali tudi v kombinaciji s protilimfocitnim globulinom in metilprednizolonom pri zdravljenju aplastične anemije (6). Pri poizkusih in vitro so ugotovili, da pospešijo rast celičnih kolonij krvotvornih celic in zmanjšajo občutljivost na komplement (6).

Pri polovici bolnikov s ČAA se bolezen po nekaj mesecih poslabša, če zdravljenje prekinemo. Zato potrebujejo vzdrževalno zdravljenje z zdravilom, ki je bilo učinkovito. V primerih, ko zdravljenje z zdravili ni bilo uspešno ali pa je bilo le delno uspešno, pa zdravimo nadomestno s transfuzijami koncentriranih eritrocitov (2, 3).

Pri razširjeni KLL s hudo anemijo ali trombocitopenijo se običajno odločimo za zdravljenje s kombinacijo glukokortikoidov in klorambucila (2). Ker so bile pri našem bolniku v ospredju težave zaradi anemije, smo najprej poizkusili zdravljenje z metilprednizolonom, nato pa s kombinacijo slednjega s klorambucila, ki je bilo prav tako neuspešno. Zaradi tega smo bolnika s KLL začeli zdraviti s fludarabinom. Štiri tedne po zdravljenju nismo več otipali povečanih bezgavk in vranice, prisotna pa je še bila huda anemija. Začeli smo zdravljenje s ciklosporinom, ki ga danes običajno uporabljamo pri zdravljenju ČAA pri bolnikih s KLL (3–7). Zdravljenje s ciklosporinom je bilo uspešno le mesec dni, nato pa se koncentracija hemoglobina ni več povečevala. Zato smo ga zamenjali z oksimetolonom. Po enomesečnem zdravljenju se je rdeča krvna slika izboljšala, težave v zvezi z anemijo pa so prenehale.

Odmerek ciklosporina (3 mg/kg telesne teže na dan) bi sicer lahko po dvomesečnem zdravljenju povečali, saj so v literaturi podatki o učinkovitih dnevni odmerkih od $1\text{--}12 \text{ mg/kg}$ (11, 12) oziroma koncentracijah ciklosporina v krvi, ki so večje od 100 ug/L (13), ali pa poskusili zdravljenje s kombinacijo ciklosporina in eritropoetina (14). Daljše dajanje večjih odmerkov ciklosporina je

povezano z neželenimi pojavi, kot so zmanjšano delovanje ledvic, povečana verjetnost oportunističnih okužb in nevarnost nastanka drugih neoplazem (10).

Menimo, da je bilo zdravljenje s fludarabinom pomembno za zmanjšanje znakov razširjene KLL, nadaljnje zdravljenje s ciklosporinom in oksimetolonom pa za razrast celic rdeče vrste.

Zaključki

Čisto aplastično anemijo, ki se pojavi kot zaplet v poteku KLL, najpogosteje zdravimo z učinkovinami, ki delujejo zaviralno na imunski odziv, kot so glukokortikoidi, ciklosporin in protilimfocitni globulin. Za zdravljenje z androgenimi steroidi se danes običajno odločimo v primerih, ko z drugimi zdravili ne dosežemo želenega učinka.

Ker se ČAA najpogosteje pojavi pri razširjeni KLL, je priporočljivo sočasno zdraviti KLL in ČAA. Slednje je potrdila dolga remisija ČAA pri našem bolniku po zdravljenju s ciklosporinom in androgenimi steroidi ter KLL s fludarabinom.

Literatura

1. Kaznelson P. Zur Entstehung der Blut Plattchen. Verh Dtsch Ges Inn Med 1922; 34: 557.
2. Erslev AJ. Pure red cell aplasia. In: Williams W, Bentler E, Erslev A J, Lichtman MA. Hematology. Fifth ed. New York: McGraw Hill, 1995: 448-53.
3. Ammus SS, Yunis AA. Acquired pure red cell aplasia. Am J Hematol 1987; 24: 311-26.
4. Hocking W, Champlin R, Mitsuyasu R. Transient response of pure red cell aplasia to anti-thymocyte globulin in a patient with T-Cell chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol 1987; 24: 285-91.
5. Kouides PA, Rowe JM. Large granular lymphocyte leukemia presenting with both amegakaryocytic thrombocytopenic purpura and pure red cell aplasia. Am J Hematol 1995; 49: 232-6.
6. Bacigalupo A, Chaple M, Hows J, Van Lint MT, Mccanns AC. Treatment of aplastic anemia with antilymphocyte globulin and methylprednisolone with or without androgens; a randomised trial from EBMT SAA working party. Brith J Haematol 1993; 83: 145-51.
7. Chikkappa G, Pasquale D, Zarrabi MH, Weiler RJ, Divakara M, Tsan MF. Cyclosporine and prednisone therapy for pure red cell aplasia in patients with chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol 1992; 41: 5-12.
8. Lacy MQ, Kurtin PJ, Tafferi A. Pure red cell aplasia: association with large granular lymphocyte leukemia and the prognostic value of cytogenetic abnormalities. Blood 1996; 87: 3000-6.
9. Kahan BD. Drug therapy-Cyclosporin. N Engl J Med 1991;79: 137-9.
10. Sivakumaran M, Bhavnani M. Cyclosporin therapy for pure red cell aplasia in patients with chronic lymphocytic leukemia. Am J Haematol 1994; 45: 192.
11. Fujii T, Yajima T, Kameda H, Mimori T, Akizuki M, Ikeda Y. Successful treatment with cyclosporin A of pure red cell aplasia associated with rheumatoid arthritis. J Rheumat 1996; 23: 1803-5.
12. Inokuchi K, Nakamura H, Tajika K, Hasegawa S. Pure red cell aplasia occurring 12 years after thymectomy: Successful treatment with cyclosporine. Am J Hematol 1996; 53: 141.
13. Canavan B, Kim HC, Kosmin M, Maffei B, Saidi P. Pure red cell aplasia (PRCA): correlation of cyclosporin A concentrations and clinical response in refractory PRCA. Blood 1993; 82 (10, Suppl 1): 463a.
14. Cesana C, Carlo-Stella C, Mangoni L et al. Response to cyclosporin A and recombinant human erythropoietin in a case of B cell chronic lymphocytic leukemia and pure red cell aplasia. Leukemia 1996; 10: 1400-1.

Za mirno potovanje skozi kemoterapijo

Navoban
tropisetron

- preprečevanje slabosti in bruhanja pri emetogeni kemoterapiji
- učinkovito zdravilo, ki ga odrasli in otroci dobro prenašajo
- vedno 1-krat na dan
- vedno 5 mg

Skrajšano navodilo za uporabo: Navoban® kapsule, Navoban® raztopina za injiciranje 2 mg in 5 mg. Serotoninski antagonist. **Oblika in sestava:** 1 trda kapsula vsebuje 5 mg tropisetronovega hidroklorida. 1 ampula po 2 ml vsebuje 2 mg tropisetronovega hidroklorida. 1 ampula po 5 ml vsebuje 5 mg tropisetronovega hidroklorida. **Indikacije:** Preprečevanje slabosti in bruhanja, ki sta posledici zdravljenja s citostatiki. Zdravljenje pooperativne slabosti in bruhanja. Preprečevanje pooperativne slabosti in bruhanja pri bolnicah, pri katerih je načrtovana ginekološka operacija v trebušni votlini. **Odmerjanje in uporaba:** Preprečevanje slabosti in bruhanja, ki sta posledici zdravljenja s citostatiki. **Odmerjanje pri otrocih:** Otroci starejši od 2 let 0,2 mg/kg telesne mase na dan. Največji dnevni odmerek ne sme preseči 5 mg. Prvi dan kot intravenska infuzija ali kot počasna intravenska injekcija. Od 2. do 6. dne naj otrok jemlje zdravilo oralno (raztopino v ampuli razredčimo s pomarančnim sokom ali koka kolo). **Odmerjanje pri odraslih:** 6-dnevna kura po 5 mg na dan. Prvi dan kot intravenska infuzija ali počasna intravenska injekcija. Od 2. do 6. dne 1 kapsula na dan. **Zdravljenje in preprečevanje pooperativne slabosti in bruhanja:** **Odmerjanje pri odraslih:** 2 mg Navobana z intravensko infuzijo ali kot počasno injekcijo. Glej celotno navodilo! **Kontraindikacije:** Preobčutljivost za tropisetron, druge antagoniste receptorjev 5-HT₃ ali katerokoli sestavino zdravila. Navobana ne smemo dajati nosečnicam; izjema je preprečevanje pooperativne slabosti in bruhanja pri kirurških posegih, katerih del je tudi terapevtska prekinitev nosečnosti. **Previdnostni ukrepi:** Bolniki z nenadzorovano hipertenzijo; bolniki s prevodnimi ali drugimi motnjami srčnega ritma; ženske, ki dojijo; bolniki, ki upravljajo s stroji ali vozili. **Medsebojno delovanje zdravil:** Rifampicin ali druga zdravila, ki inducirajo jetrne encime. Glej celotno navodilo! **Stranski učinki:** Glavobol, zaprtje, redkeje omotica, utrujenost in prebavne motnje (bolečine v trebuhu in driska), preobčutljivostne reakcije. Zelo redko kolaps, sinkopa ali zastoj srca, vendar vzročna zveza z Navobanom ni bila dokazana. **Način izdajanja:** Kapsule: uporaba samo v bolnišnicah, izjemoma se izdaja na zdravniški recept pri nadaljevanju zdravljenja na domu ob odpustu iz bolnišnice in nadaljnjem zdravljenju. Ampule: uporaba samo v bolnišnicah. **Oprema in odločba:** Zloženka s 5 kapsulami po 5 mg; številka odločbe 512/B-773/97 z dne 10. 11. 1997. Zloženka z 1 ampulo po 2 ml (2 mg/2 ml); številka odločbe 512/B-772/97 z dne 10. 11. 1997. Zloženka z 10 ampulami po 5 ml (5 mg/5 ml); številka odločbe 512/B-771/97 z dne 10. 11. 1997. **Izdovalec:** NOVARTIS PHARMA AG, Basel, Švica. **Imetnik dovoljenja za promet z zdravilom:** NOVARTIS PHARMA SERVICES INC., Podružnica v Sloveniji, Dunajska 22, 1511 Ljubljana, kjer so na voljo informacije in literatura. **Preden predpišete Navoban, prosimo preberite celotno navodilo.**

 NOVARTIS

Strokovni prispevek/Professional article

DOLOČANJE ŠTEVILA RETIKULOCITOV V KRVI S SVETLOBNIM MIKROSKOPOM IN PRETOČNIM CITOMETROM

NAJPRIMERNEJŠA KONCENTRACIJA TIAZOL ORANŽNEGA ZA PRETOČNI CITOMETER EPICS PROFILE

RETICULOCYTE COUNTING BY MICROSCOPY AND FLOW CYTOMETRY

THE MOST ACCURATE CONCENTRATION OF THIAZOLE ORANGE FOR THE EPICS PROFILE FLOW CYTOMETRY

Irena Preložnik-Zupan

Klinični oddelek za hematologijo, SPS Interne klinike Zaloška, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-03-31, sprejeto 1998-04-07; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-51-5

Ključne besede: število retikulocitov; svetlobni mikroskop; pretočni citometer; tiazol oranžno

Izvleček – Izhodišča. Število retikulocitov v krvi je klinično pomembno kot posredni kazalnik obsega nastajanja eritrocitov v kostnem mozgu. Določanje števila retikulocitov s svetlobnim mikroskopom je slabo ponovljivo in nenatančno. V zadnjem času so razvili avtomatične retikulocitne števec, ki omogočajo hitrejšo in natančnejšo štetje retikulocitov.

Metode. V nalogi smo primerjali določanje števila retikulocitov s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile (Coulter). Za štetje retikulocitov s svetlobnim mikroskopom smo vzorce krvi obarvali z briljantnim krezilnim modrilom, za določanje s pretočnim citometrom pa s tiazol oranžnim barvilom (TO). Želeli smo ugotoviti, katera koncentracija TO je najprimernejša za pretočni citometer EPICS Profile. Izbirali smo med naslednjimi koncentracijami TO: 0,2 mg/L; 0,1 mg/L; 0,07 mg/L in 0,05 mg/L.

Rezultati in zaključki. Najprimernejša koncentracija tiazol oranžnega barvila za štetje retikulocitov s pretočnim citometrom EPICS Profile je 0,1 mg/L. Izbrali smo jo na osnovi najboljše skladnosti rezultatov med svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile, najmanjših razlik med rezultati, ki smo jih analizirali s parnim t-testom in ujemanja normalnih vrednosti zdravih odraslih krvodajalcev. Stopnja povezanosti med dvema načinoma določanja retikulocitov je bila dobra. Korelacijski koeficient (r) je bil med 0,82 in 0,87. Povprečna koeficienta variacije štetja retikulocitov s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile sta bila 27,5% in 8,4%.

Uvod

Retikulociti so prehodna stopnja v razvoju celic rdeče vrste med normoblasti z jedri in zreliimi eritrociti. Pri panoptičnem barvanju so nekoliko modro rožnati (polikromazija). Pri supravitalnem barvanju se ostanki ribosomov prikažejo kot mrežica ali posamezna zrnca. Zaradi natančnosti pri ločevanju retikulocitov od zrelih eritrocitov so v zgodnjih 80-ih letih objavili definicijo retikulocitov (1, 2). Retikulociti so celice rdeče vrste brez jedra, ki imajo po

Key words: reticulocyte count; microscopy; flow cytometry; thiazole orange

Abstract – Background. The reticulocyte count is a clinically important indirect indicator of erythropoietic activity in patients. However, determination of the reticulocyte count using a light microscope has low accuracy and reproducibility rates. Recently, automated reticulocyte counters have been developed, which allow for a more rapid and accurate counting of reticulocytes.

Methods. In our study, we compared the following methods for reticulocyte count determination: the microscopic brilliant cresyl blue method and flow cytometric EPICS Profile (Coulter) method using thiazole orange (TO). The purpose of the study was following: to select the most suitable TO concentration to be used with the EPICS Profile cytometer. The following TO concentrations were used: 0.2 mg/L, 0.1 mg/L, 0.07 mg/L and 0.05 mg/L.

Results and conclusions. The most appropriate TO concentration for counting reticulocyte by the EPICS Profile is 0.1 mg/L. The concentration was selected according to the following criteria: good agreement of the results obtained by microscopy with the results yielded by the EPICS Profile cytometer, absence of statistically significant differences between the results, and agreement in the normal ranges. There was a good correlation between the methods studied. The correlation coefficient (r) ranged from 0,82 and 0,87. The mean intra-assay coefficients of variation for determination by light microscopy and EPICS Profile cytometer was 27.5% and 8.4% respectively.

barvanju z novim metilenskim modrilom ali briljantnim krezilnim modrilom dva ali več modrih zrn.

Število retikulocitov v krvi je posredni kazalnik obsega nastajanja eritrocitov (učinkovita eritropoeza) v kostnem mozgu (1, 3-7). Omogoča nam razlikovanje anemij zaradi zmanjšane proizvodnje eritrocitov od anemij zaradi zvečane razgradnje ali izgube eritrocitov, oceno uspešnosti zdravljenja anemij, oceno obnovitvene sposobnosti kostnega mozga po zaviralnem delovanju zdravil in presaditvi kostnega mozga, oceno učinkovitosti spodbujanja eritro-

poeze z eritropoetinom v primeru anemije pri kronični ledvični odpovedi, revmatoidnem artritisu, raku in po presaditvi kostnega mozga (8).

V večini laboratorijev še danes uporabljajo običajni način prikaza in štetja retikulocitov s svetlobnim mikroskopom (1, 7, 9, 10–11). Metoda je slabo zanesljiva. Koeficient variacije znaša po podatkih v literaturi med 25 in 48% (1). Glavni viri napak izhajajo iz majhnega vzorca prešteti celic, različne porazdelitve retikulocitov v razmazu, razlik med laboratorijskimi tehnikami pri štetju in morfološki identifikaciji celic.

Sodobnejša metoda za proučevanje fizikalnih in kemičnih lastnosti celic je pretočna citometrija (12, 13). V laboratoriju Hematološke klinike smo do nedavnega uporabljali za štetje retikulocitov v krvi pretočni citometer EPICS Profile (Coulter). Oceno retikulocitov s pretočnim citometrom nam omogočajo fluorescenčna barvila. Danes največ uporabljajo tiazol oranžno in auramin oranžno. Prisotnost RNK v retikulocitih omogoča njihovo ločevanje od zrelih eritrocitov. Načinov barvanja vzorcev krvi s tiazol oranžnim barvilom je več. Laboratoriji, ki imajo pretočne citometre tovarne Becton Dickinson, običajno uporabljajo tovarniško pripravljen reagent Retic-COUNT. Drugi priredijo način barvanja svojemu pretočnemu citometru (14). Pretočni citometer šteje s hitrostjo več sto celic na sekundo. Z njim preštejemo v povprečju od 30.000 do 50.000 celic v vzorcu. Zaradi tega so natančnejši in ponovljivejši rezultati zlasti pri vzorcih z majhnim številom retikulocitov (15–17).

V nalogi smo primerjali štetje retikulocitov s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile (Coulter Corporation) ter uporabo različnih koncentracij tiazol oranžnega. Želeli smo ugotoviti:

- katera koncentracija tiazol oranžnega je najprimernejša za pretočni citometer EPICS Profile,
- kakšna je korelacija med vrednostmi retikulocitov istega vzorca s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom.

Preiskovanci in načini dela

V raziskavo smo vključili 103 vzorce krvi bolnikov in zdravih krvodajalcev. Od tega je bilo 33 zdravih krvodajalcev in 70 bolnikov (36 z zvečanem in 34 z zmanjšanim številom retikulocitov v krvi).

Med preiskovanci z zvečanim številom retikulocitov v krvi so bili bolniki s hemolitično anemijo, anemijo po akutni krvavitvi, megaloblastno anemijo med zdravljenjem z B12 in pravo policitemijo po venepunkcijah.

Med preiskovanci z zmanjšanim številom retikulocitov so bili bolniki z akutno levkemijo neposredno po zdravljenju s citostatiki. Uporabili smo ostanke vzorcev venske krvi, ki so jo odvezli zaradi rutinskega pregleda krvne slike. Če smo opravili analizo retikulocitov v šestih urah po odvzemu, smo shranjevali vzorce na sobni temperaturi, sicer smo jih shranili do 24 ur v hladilniku pri temperaturi +4°C (18, 19).

Priprava vzorcev krvi za štetje s svetlobnim mikroskopom

V laboratoriju Hematološke klinike štejemo retikulocite s svetlobnim mikroskopom Olympus BH2. Za prikaz retikulocitov uporabljamo bazično supravitalno barvilo briljantno krezilno modrilo. Raztopino barvila pripravimo iz 1 g barvila in 100 ml citratne fiziološke raztopine. V epruveto nato odpipetiramo 100 µL reagenta in 100 µL venske krvi z EDTA. Vzorce inkubiramo 15–20 minut pri 37°C. Nato napravimo razmaze in jih pregledamo s svetlobnim mikroskopom, z imerzijsko (pri nas 1000-kratno) povečavo. Poiščemo predele, kjer se eritrociti ne prekrivajo in ne dotikajo ter preštejemo število retikulocitov na 1000 eritrocitov. Izsledke izrazimo z absolutnim številom retikulocitov, ki ga dobimo tako, da relativno število retikulocitov pomnožimo s številom eritrocitov v istem vzorcu.

Retikulocite v razmazih je štel izkušeni laboratorijski tehnik, ki to delo redno opravlja.

Določanje števila retikulocitov s pretočnim citometrom

Pretočni citometer smo uravnali na naslednje vrednosti: 488 nm zračno hlajeni argonski laser z močjo 15 mW, filter z delovnim območjem valovne dolžine 525 nm pred detektorjem fluorescenca in hitrostjo pretoka skozi pretočno celico 32 ml/min. Isoton II smo uporabljali kot hladilno raztopino. Celice rdeče vrste smo osamili s pomočjo ocene celic na prednjem osvetljevalcu (FS – forward scatter) proti stranskemu osvetljevalcu (LSS – side scatter [log]). Za štetje odvzame aparat 100 µl vzorca in prešteje 30.000 celic na vzorec.

Osnovno raztopino tiazol oranžnega smo pripravili iz 1 mg tiazol oranžnega barvila, ki smo ga raztopili v 1 ml absolutnega metanola. To raztopino smo hranili v temi v zamrzovalniku pri –20°C. Iz nje smo vsak dan pripravili sveže **delovne raztopine barvila**. Vsak vzorec smo obarvali s štirimi raztopinami z različno razredčitvijo tiazol oranžnega barvila: 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000, 1:20.000, ki smo jih pripravili iz osnovne raztopine tiazol oranžnega (1: 5.000 = 0,2 mg/L = $4,19 \times 10^{-7}$ mol/L, 1:10.000 = 0,1 mg/L = $2,10 \times 10^{-7}$ mol/L, 1:15.000 = 0,07 mg/L = $1,40 \times 10^{-7}$ mol/L, 1:20.000 = 0,05 mg/L = $1,05 \times 10^{-7}$ mol/L).

Za vsak vzorec krvi smo vzeli dve plastični epruveti 12×75 mm. Eno smo uporabili za vzorec z barvilom, drugo za neobarvano kontrolo. Z neobarvano kontrolo smo določili spodnji in zgornji prag fluorescence. S spodnjo nastavitvijo praga izločimo 99,9% avtofluorescence eritrocitov. Nastavitev zgornjega fluorescenčnega praga je potrebna zaradi izključitve levkocitov ali normoblastov iz območja fluorescence retikulocitov. Pri analizi obarvanega vzorca krvi je ostala lega pragov nespremenjena. Med retikulocite smo uvrstili vse celice z večjo intenzivnostjo fluorescence, kot je bila autofluorescenca eritrocitov oz. vse celice, ki so se pojavile na desni strani spodnjega praga fluorescence in levo od zgornjega praga fluorescence.

Določitev najprimernejšega časa inkubacije s tiazol oranžnim

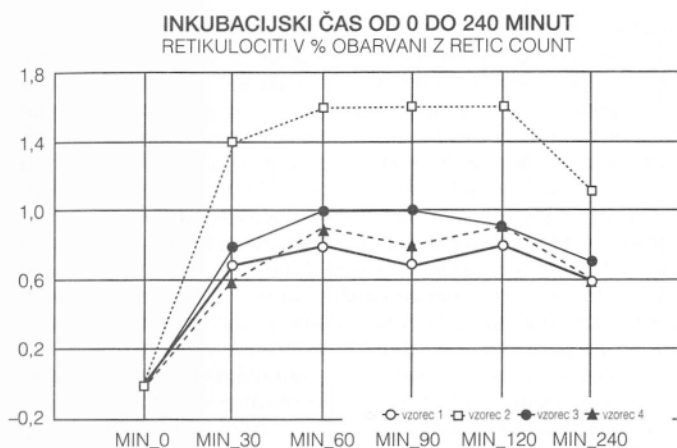
Uporabili smo 9 naključno izbranih vzorcev z različnim številom retikulocitov. Pripravili smo jih po zgoraj opisanem navodilu. Vzorce smo inkubirali v temi, na sobni temperaturi, v časovnem intervalu od 30 do 240 min. Določili smo najprimernejši čas inkubacije.

Določitev ponovljivosti oz. natančnosti načinov določanja števila retikulocitov

Določili smo ponovljivost oz. natančnost štetja retikulocitov s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom na treh različnih vzorcih (z normalnim, zvečanim in zmanjšanim številom retikulocitov). Vsakemu od treh vzorcev smo 10 krat zaporedoma določili število retikulocitov. Nato smo izračunali koeficient variacije (KV), ki je izražen v odstotkih: $KV\% = (\text{standardna deviacija/aritmetična sredina}) \times 100$.

Statistično vrednotenje podatkov

Uporabili smo statistični program Statistics for Windows (Stat-Soft™). Pred pričetkom analize smo spremenljivke z asimetrično porazdelitvijo pretvorili in s tem zmanjšali asimetrijo na sprejemljivo raven («skewness» < 2 in > –2). Prevedli smo naslednje spremenljivke: vrednosti retikulocitov v% obarvanih z briljantnim krezilnim modrilom = $\log(x - 0,2)$, vrednosti retikulocitov v% obarvanih z Retic-COUNT = $\log x$, vrednosti retikulocitov obarvanih s tiazol oranžnim v vseh različnih koncentracijah = $\log x$. Normalnost porazdelitve smo nato preverili še z Kolmogorov-Smirnovim testom. Korelacijo med rezultati smo izrazili s koeficientom korelacije po Pearsonu. Pri ugotavljanju statistično pomembnih razlik med dvema skupinama smo uporabili t-test za odvisne vzorce. Razlike med rezultati smo ocenjevali kot statistično značilne pri vrednosti $p < 0,05$.



Sl. 1. Določitev najprimernejšega časa inkubacije. Prikaz štirih vzorcev z različnim številom retikulocitov. Na vodoravni osi je prikazan čas inkubacije v minutah, na navpični osi so prikazani retikulociti v odstotkih.

Fig. 1. Determination of the optimal incubation time. There are four samples with different reticulocyte count. Vertical scale represents incubation time in minutes, horizontal scale represents reticulocyte count in percentiles.

Rezultati

Določitev najprimernejšega časa inkubacije vzorcev s tiazol oranžnim za določanje števila retikulocitov s pretočnim citometrom

Opazili smo, da se število retikulocitov v času od 30 do 60 min po obarvanju s tiazol oranžnim barvilom še zmerno zveča, po 60 minutah se ustali, po 120 minutah pa se prične počasi zmanjševati (sl. 1.). Izbrali smo inkubacijski čas 60 min.

Določitev najprimernejše koncentracije tiazol oranžnega za pretočni citometer EPICS Profile

Pri primerjavi rezultatov pretočnega citometra EPICS Profile in svetlobnega mikroskopa smo dobili koeficiente korelacije (r), ki so prikazani v tabeli 1.

Tab. 1. Koeficienti korelacije (r) med rezultati štetja retikulocitov s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom. EPICS Profile – pretočni citometer EPICS Profile; TO – tiazol oranžni; r – Pearsonov korelacijski koeficient.

Tab. 1. Correlation coefficients between the results of microscopy and flow cytometry reticulocyte counting. EPICS Profile – EPICS Profile flow cytometry.

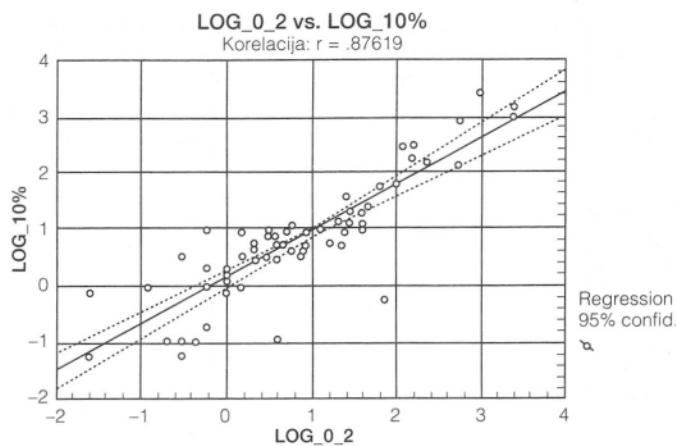
x	y	r
Mikroskop	EPICS Profile; 0,2mg/L TO	0,82
Mikroskop	EPICS Profile; 0,1mg/L TO	0,87
Mikroskop	EPICS Profile; 0,07mg/L TO	0,85
Mikroskop	EPICS Profile; 0,05mg/L TO	0,83

Ocena ponovljivosti štetja retikulocitov s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom

Povprečni koeficient variacije za štetje s svetlobnim mikroskopom znaša 27,5% (10% pri zvečanem, 23,6% pri normalnem in 49% pri zmanjšanim številu retikulocitov) in za pretočni citometer EPICS Profile 8,4% (3,3% pri zvečanem, 7,4% pri normalnem in 14,6% pri zmanjšanim številu retikulocitov v krvi).

Določitev statistične pomembnosti razlik med rezultati posameznih skupin

S t-testom za odvisne vzorce smo določili statistično pomembnost razlik med rezultati po posameznih skupinah. Vse vrednosti t so



Sl. 2. Primerjava rezultatov, ki smo jih dobili s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile pri koncentraciji tiazol oranžnega 0,1 mg/L. Koeficient korelacije (r) je bil 0,87. LOG 10% – logaritmirane vrednosti, ki smo jih dobili s pretočnim citometrom pri razredčitvi tiazol oranžnega 1:10000 oz. koncentraciji 0,1 mg/L; LOG 0–2 – log (relativnih vrednosti retikulocitov s svetlobnim mikroskopom – 0,2).

Fig. 2. Comparison of the results from microscopy and flow cytometry at thiazole orange concentration 0,1 mg/L. The coefficient of correlation (r) was 0,87. LOG 10% – log value got by flow cytometry in dilution of thiazole orange 1:10000 (conc. 0,1 mg/L); LOG 0–2 – log (relative value of reticulocytes got by microscopy – 0,2).

prikazane v tabeli 2. Vidimo, da se rezultati statistično pomembno ne razlikujejo pri primerjavi svetlobnega mikroskopa in pretočnega citometra EPICS Profile s koncentracijami TO 0,1 mg/L in 0,07 mg/L. Lahko rečemo, da so skoraj skladni. V drugih dveh primerih so razlike statistično pomembne pri $p < 0,05$.

Tab. 2. Prikaz rezultatov t-testa za odvisne vzorce med skupinami rezultatov. Log (ret BKM% – 0,2) – rezultati štetja s svetlobnim mikroskopom; Log TO – rezultati štetja s pretočnim citometrom EPICS Profile pri različnih koncentracijah TO.

Tab. 2. Results of paired t-test. Log (ret BKM% – 0,2) – results of reticulocyte counting by microscopy; Log TO – results of reticulocyte counting by EPICS Profile flow cytometry at different concentration of TO.

T-test za odvisne vzorce	
Razlike so statistično pomembne pri $p < 0,05$	
spremenljivki	vrednost t
Log (ret BKM% – 0,2) – Log TO5%	-3,3
Log (ret BKM% – 0,2) – Log TO10%	-0,4
Log (ret BKM% – 0,2) – Log TO15%	1,3
Log (ret BKM% – 0,2) – Log TO20%	3,1

Normalne vrednosti pri zdravih odraslih krvodajalcih

Iz 33 vzorcev krvi zdravih odraslih krvodajalcev smo izračunali normalne vrednosti ter območje normalnih vrednosti. Rezultate smo prikazali v tabeli 3.

Razpravljanje

Klinični pomen določanja števila retikulocitov je velik. Omogoča oceno učinkovite eritropoeze in nam je v pomoč pri opredelitvi anemij (20, 21). Spremljanje zdravljenja anemij ter obnove kostnega mozga po zaviralnem delovanju zdravil in presaditvi kostnega mozga pa zahtevajo vedno večjo stopnjo natančnosti pri oceni števila retikulocitov zlasti v območju zmanjšane števila le teh.

Tab. 3. Normalne vrednosti števila retikulocitov v relativnih in absolutnih številih. SD – standardna deviacija; EPICS Profile – pretočni citometer EPICS Profile.

Tab. 3. Normal ranges of the reticulocyte counts in relative and absolute values. SD – standard deviation; EPICS Profile – EPICS Profile flow cytometry

Število retikulocitov	%	abs. vrednosti (x 10 ⁹ /L)
Način štetja		
Mikroskop		
– srednja vrednost	1,4	64
– SD	0,45	21
– območje	0,5–2,3	22–106
EPICS Profile		
– srednja vrednost	1,5	68
– SD	0,5	27
– območje	0,5–2,5	14–122

V večini laboratorijev še vedno uporabljajo tradicionalno metodo štetja retikulocitov s svetlobnim mikroskopom. Leta 1985 je izšel predlog za standardizacijo supravitalnega barvanja retikulocitov z novim metilenskim modrilom, ki je po mnenju več avtorjev (11, 22) primernejše za prikaz retikulocitov kot briljantno krezilno modriilo. Slabosti svetlobne mikroskopije, kot so majhno število prešteti celic, velike razlike med laboratorijskimi tehnikami pri štetju retikulocitov, različna definicija retikulocitov razvojne stopnje IV po Heilmeyerju in vključki v eritrocitih, ki prispevajo k zmanjšanju natančnosti metode, pa so nas prisilile, da smo do izsledkov kritični (7, 10). Koeficient variacije, s katerim ocenjujemo ponovljivost in natančnost metode, znaša 25–30% za normalno število retikulocitov (23), pri zmanjšanju števila retikulocitov pa je ustrezno večji. To je slabost vseh t.i. »ročnih« tehnik štetja.

V 80. letih se je pričel razvoj pretočne citometrije in fluorescenčnih barvil, ki je omogočil mnogim kliničnim laboratorijem poleg drugih novosti tudi določanje števila retikulocitov z večjo natančnostjo in ponovljivostjo (12). Med fluorokromi se je za štetje retikulocitov uveljavil zlasti tiazol oranžno barvilo, ki dobro prehaja skozi celične membrane in se močno veže z nukleinskimi kislinami (21, 24). Rezultati določanja števila retikulocitov s pretočnim citometrom so bili primerljivi s svetlobnim mikroskopom (14). Najnatančnejše rezultate so v zadnjem času dobili s pretočnimi citometri R 1000 in R 3000 (TOA Medical Electronics) (25, 26).

Zaenkrat razen prikaza RNK v retikulocitih ne poznamo drugega objektivnega kriterija za ločevanje retikulocitov. Pomanjkljivosti določanja števila retikulocitov s pretočnim citometrom in uporabo fluorokromov je v tem, da nobeno barvilo ni specifično za RNK, enako dobro se veže tudi na DNK. Največji razlog za razlike med rezultati različnih metod je zato najverjetneje interferenca s drugimi celicami (27). Posebej moteči so zvečano število levkocitov (npr. mali limfociti v primeru kronične limfatične levkemije), gigantski trombociti, normociti in Howell-Jollyjeva telesa v eritrocitih (28). Zato je priporočljivo v teh primerih preveriti število retikulocitov s svetlobnim mikroskopom (29).

V zadnjem času so pri firmi Coulter razvili polavtomatsko metodo določanja števila retikulocitov. V rutinske hematološke analizatorje so vgradili pretočno celico in uporabili tehniko pretočne citometrije, ki omogoča poleg drugih vrednosti krvne slike tudi določanje števila retikulocitov. Za barvanje RNK v retikulocitih so uporabili supravitalno barvilo novo metilensko modriilo. Aparat prešteje največ 32000 celic in jih analizira v približno 30 sekundah. Morda bo ta metoda dostopnejša večjemu številu kliničnih laboratorijev. Z namenom določiti najprimernejšo koncentracijo barvila tiazol oranžno za določanje števila retikulocitov s pretočnim citometrom EPICS Profile smo v laboratoriju Hematološke klinike vzorce krvi najprej obarvali s tovarniško pripravljeno raztopino barvila tiazol oranžno Retic-COUNT in določili število retikulocitov s pretočnim citometrom EPICS Profile. Rezultate smo primerjali z rezultati štetja s svetlobnim mikroskopom. Vrednosti, ki smo jih dobili s pretočnim citometrom, so bile v povprečju polovico manjše od vrednosti, ki smo jih dobili s svetlobnim mikroskopom (mediana pri

100 vzorcih, pregledanih s svetlobnim mikroskopom, je bila 1,4%, pri istih vzorcih s pretočnim citometrom pa 0,8%). To ni bilo v skladu s podatki v literaturi, ki navaja, da so vrednosti retikulocitov s pretočnim citometrom v povprečju večje kot s svetlobnim mikroskopom (18), ker s pretočnim citometrom zajamemo tudi najbolj zrele retikulocite (razvojna stopnja IV po Heilmeyerju), ki jih laboratorijski tehnik pri štetju s svetlobnim mikroskopom lahko izpusti. Sklepali smo, da barvilo Retic-COUNT™ (Becton Dickinson) ni primerno za določanje števila retikulocitov s pretočnim citometrom EPICS Profile (Coulter). Nato smo preizkusili različne koncentracije barvila tiazol oranžno, ki smo jih pripravili iz suhe snovi tiazol oranžnega barvila in določili najprimernejšo koncentracijo za pretočni citometer EPICS Profile. Največjo skladnost rezultatov smo dosegli med svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile pri koncentraciji tiazol oranžnega barvila 0,1 mg/L (razredčitev matične raztopine tiazol oranžnega 1:10000). Koeficient korelacije, ki je merilo za stopnjo povezanosti, je bil pri tej koncentraciji največji in je znašal 0,87 (tab. 1). Rezultate smo ocenili tudi s parnim t-testom, kjer ocenjujemo razlike med obema podatkomoma v posameznem paru. Ugotovili smo, da so razlike najmanjše med rezultati svetlobnega mikroskopa in pretočnega citometra EPICS Profile pri koncentraciji tiazol oranžnega 0,1 mg/L (tab. 2). Nekoliko večje, vendar še vedno statistično nepomembne so bile razlike pri primerjavi rezultatov med svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile pri koncentraciji tiazol oranžnega barvila 0,07 mg/L (tab. 2). V drugih primerih so bile razlike med rezultati večje. Skladnost rezultatov smo potrdili tudi z določitvijo normalnih vrednosti pri 33 zdravih odraslih krvodajalcih. Normalne vrednosti so si bile najbližje pri primerjavi rezultatov štetja s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile pri koncentraciji tiazol oranžnega barvila 0,1 mg/L.

Za vsako metodo smo določili ponovljivost oziroma natančnost štetja retikulocitov, ki smo jo izrazili s koeficientom variacije. Vzeli smo tri naključne vzorce krvi, enega v normalnem, drugega v zmanjšanem in tretjega v zvečanem območju števila retikulocitov. Vsakemu smo desetkrat zapored določili število retikulocitov na vsakem aparatu. Pri štetju s svetlobnim mikroskopom smo dobili koeficient variacije 10% pri zvečanem, 23,6% pri normalnem in 49% pri zmanjšanem število retikulocitov. Povprečen koeficient variacije je bil 27,5%. Naši podatki so bili podobni tistim v literaturi (14, 23). Štetje retikulocitov s svetlobnim mikroskopom je torej še posebej neprimerno ravno v območju zmanjšane števila retikulocitov zaradi slabe ponovljivosti rezultatov.

Manjši koeficient variacije smo dobili pri določanju števila retikulocitov s pretočnim citometrom. Pri štetju s pretočnim citometrom EPICS Profile je bil povprečen koeficient variacije 8,4% (med 3,3% in 14,6%, glede na število retikulocitov). Rezultati so primerljivi s tistimi v literaturi (30), kjer navajajo koeficient variacije, manjši od 12% za različne pretočne citometre.

Normalne vrednosti retikulocitov v krvi in območje normalnih vrednosti smo določili iz 33 vzorcev krvi zdravih odraslih krvodajalcev (tab. 3). Vrednosti niso referenčne zaradi premajhnega števila vzorcev krvi zdravih odraslih prostovoljcev. Za način določanja s svetlobnim mikroskopom je bilo območje normalnih vrednosti 22–106×10⁹/L, za pretočni citometer EPICS Profile pri koncentraciji tiazol oranžnega barvila 0,1 mg/L je bilo območje 14–122×10⁹/L. Tudi v literaturi (27) navajajo večje vrednosti retikulocitov v krvi zdravih odraslih oseb pri določanju s pretočnim citometrom FACScan in barvilom Retic-COUNT. Možni vzroki so opisani zgoraj.

Na devetih naključno izbranih vzorcih krvi z različnim številom retikulocitov smo določili najprimernejši inkubacijski čas tiazol oranžnega barvila za določanje števila retikulocitov s pretočnim citometrom (sl. 1). Po obarvanju so se vrednosti retikulocitov od 30 do 60 minut še zmerno zvečevale, medtem ko so se po 120 minutah pričele zmanjševati. Ustalenie števila retikulocitov, ki ga dobimo med 60 in 120 minutami po obarvanju, nam omogoča, da z analizo vzorcev ne hitimo in kljub temu dobimo dovolj natančne

rezultate. To je dobra lastnost tiazol oranžnega barvila za razliko od nekaterih drugih fluorokromov, npr. tioflavina T, ki zahteva takojšnje odčitavanje rezultatov po končani inkubaciji, ker je po razredčitvi nestabilen (31). Za določanje retikulocitov s pretočnim citometrom smo izbrali čas 60 minut oz. začetek ustalitve števila retikulocitov. Ta inkubacijski čas največkrat uporabljajo tudi drugi (32).

Poleg inkubacijskega časa je zelo pomemben tudi čas shranjevanja neobarvanih vzorcev krvi, ki ga v naši nalogi nismo ocenjevali, temveč smo podatke povzeli iz literature (18, 19, 21). Običajno dopuščajo shranjevanje vzorcev krvi do 48 ur. Razlike v rezultatih niso statistično pomembne, če so vzorci shranjeni v hladilniku pri 4°C. Kadar pa so vzorci shranjeni pri sobni temperaturi nastanejo spremembe števila retikulocitov. Nekateri avtorji opisujejo zmereno zmanjšanje števila retikulocitov po 24 urah in ga razložijo s postopnim dozorevanjem retikulocitov in izgubo RNK. Drugi opisujejo zmeren porast števila retikulocitov po 24 urah, ki ga razložijo z večjo stabilnostjo membrane retikulocitov kot eritrocitov, ki hitreje hemolizirajo ali pa se poveča prepustnost membrane eritrocitov, ki povzroči nespecifično obarvanje eritrocitov (33).

Klinična uporabnost raziskave

Določili smo najprimernejšo koncentracijo tiazol oranžnega barvila in optimalni inkubacijski čas za štetje retikulocitov s pretočnim citometrom EPICS Profile. Pri štetju retikulocitov s svetlobnim mikroskopom priporočamo uporabo supravitalnega barvila novega metilenskega modrila. Določanje števila retikulocitov s pretočnim citometrom se najverjetneje ne bo uveljavilo v rutinskem kliničnem delu, temveč ga bo nadomestila metoda določanja števila retikulocitov s hematološkim analizatorjem.

Zaključki

Pri primerjavi določanja števila retikulocitov v krvi s svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom smo prišli do naslednjih pomembnih ugotovitev:

1. najprimernejša koncentracija tiazol oranžnega za štetje retikulocitov s pretočnim citometrom EPICS Profile je 0,1 mg/L. Izbrali smo jo na osnovi najboljše skladnosti rezultatov, ki smo jih dobili med svetlobnim mikroskopom in pretočnim citometrom EPICS Profile, najmanjših razlik med rezultati, ki smo jih ocenili s parnim t-testom in ujemanja normalnih vrednosti zdravih odraslih krvodajalcev;
2. stopnja povezanosti med vrednostmi retikulocitov istega vzorca dobljenimi s svetlobnim mikroskopom in dvema pretočnima citometroma je dobra v vseh primerih. Najboljša korelacija je med rezultati štetja s svetlobnem mikroskopom in pretočnem citometrom EPICS Profile pri koncentraciji tiazol oranžnega 0,1 mg/L.

Literatura

1. Gilmer PR, Koepke JA. The reticulocytes. An approach to definition. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 262-7.
2. National committee for clinical laboratory standards. Method for reticulocyte counting; Proposed Standard. NCCLS Document H16-P. Villanova: NCCLS, 1985: 225-31.
3. Andoljšek A. Bolezni krvi in krvotvornih organov. In: Kocijančič A, Mrevlje F. *Interna medicina*. Ljubljana: EWO, 1993: 974-1030.

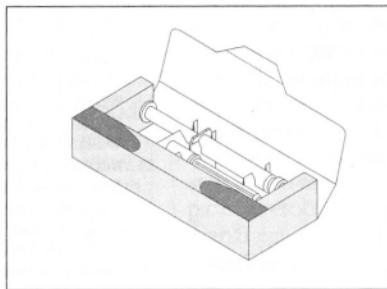
4. Bohinjec J. *Temeljni klinične hematologije*. Ljubljana: DDU Univerzum, 1983: 11-56.
5. Bunn HF. Anemia. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL eds. *Harrison's principles of internal medicine*. 13th ed. Vol 2. New York: McGraw Hill, 1994: 313-7.
6. Brian SB, Janine BG, Ernest B. Morphology of erythron. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA eds. *Hematology*. New York: McGraw Hill, 1990: 297-309.
7. Koepke JF, Koepke JA. Reticulocytes. *Clin lab haemat* 1986; 8:169-79.
8. Kanold J, Bezou MJ, Coulet M, Quainon F, Malpuech G, Travade Ph, Demeocq F. Evaluation of erythropoietic/hematopoietic reconstitution after BMT by highly fluorescent reticulocyte counts compares favorably with traditional peripheral blood counting. *Bone Marrow Transpl* 1993; 11: 313-8.
9. Erslev AJ. Reticulocyte enumeration. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Williams Hematology. New York: McGraw Hill, 1995: L28.
10. Peebles DA, Hochberg A, Clarke TD. Analysis of manual reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 713-7.
11. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*. London: Churchill Livingstone, 1984: 58-61.
12. Carter NP, Meyer EW. Introduction to the principles of flow cytometry. In: Ormerod MG. *Flow cytometry*. New York: Oxford University Press, 1990: 1-28.
13. Wood JCS. Clinical flow cytometry instrumentation. In: Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. *Clinical flow cytometry. Principles and application*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993: 71-92.
14. Nobes PR, Carter AB. Reticulocyte counting using flow cytometry. *J Clin Pathol* 1990; 43: 675-8.
15. Davis BH, Bigelow NC. Flow cytometric reticulocyte quantification using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 684-9.
16. Tarallo P, Humbert JC, Mahassen P, Fournier B, Henny J. Reticulocytes: biological variations and reference limits. *Eur J Haemat* 1994; 53: 11-5.
17. Davis BH, Bigelow NC, Koepke JA et al. Flow cytometric reticulocyte analysis. Multiinstitutional interlaboratory correlation study. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 468-77.
18. Hansson GK, Andersson M, Jarl H, Stemme S. Flow cytometric analysis of reticulocytes using an RNA-binding fluorochrome. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: 35-41.
19. Chin-Yee I, Keeney M, Lohmann RC. Flow cytometric reticulocyte analysis using thiazole orange; clinical experience and technical limitations. *Clin Lab Haemat* 1991; 13: 177-88.
20. Cavill I. The rejected reticulocyte. *Brit J Haemat* 1993; 84: 563-5.
21. Ferguson DJ, Lee SF, Gordon PA. Evaluation of reticulocyte counts by flow cytometry in a routine laboratory. *Am J Haemat* 1990; 33: 13-20.
22. Brecher G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am J Clin Pathol*. 1949; 19: 895-6.
23. Lohmann RC, Crawford LN, Wood DE. Proficiency testing in reticulocyte counting. *Clin Lab Haematol* 1994;16: 57-64.
24. Lee LG, Chen CH, Chin LA. Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* 1986; 7: 508-17.
25. Davis BH, Bigelow NC. Automated reticulocyte analysis. *Haematol/Oncol Clinics of North America* 1994; 8 (4): 617-30.
26. Hamilton JL, Pollard Y, Grant D, Patterson K, Machin SJ. Evaluation of semi-automated reticulocyte counting method using the Coulter STKS-2A blood cell counter. *Clin Lab Haem* 1995; 17: 145-9.
27. Van Houte AJ, Bartels PCM, Schoorl M, Mulder C. Methodology dependent variations in reticulocyte counts using a manual and two different flow cytometric procedures. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 859-63.
28. Van Hove L, Goossens W, van Duppen V, Verwilghen RL. Reticulocyte count using thiazole orange. A flow cytometry method. *Clin Lab Haemat* 1990; 12: 287-99.
29. National committee for clinical laboratory standards. Reticulocyte counting by flow cytometry; Proposed guideline. NCCLS document H44-P. Villanova: NCCLS, 1993: 1-25.
30. Van Petegem M, Cartuyvels R, Schouwer P, van Duppen V, Goossens W, van Hove L. Comparative evaluation of three flow cytometers for reticulocyte enumeration. *Clin Lab Haemat* 1993; 15: 103-11.
31. Metzger DK, Charache S. Flow cytometric reticulocyte counting with thioflavin T in a clinical hematology laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 540-4.
32. Technical note. Retic-COUNT™ (Becton Dickinson) kit for reticulocyte enumeration in human peripheral blood, 1993.
33. Bowen D, Bentley N, May T, Cavill I. Comparison of a modified thiazole orange technique with a fully automated analyser for reticulocyte counting. *J Clin Pathol* 1991; 44: 130-3.

Neupogen®

filgrastim G-CSF

PREDHODNO NAPOLNJENE INJEKCIJSKE BRIZGE

... enkratno in preprosto



Kratka navodila za predpisovanje NEUPOGENA (filgastrima)

Preden boste predpisali NEUPOGEN, prosimo, preberite informacijski list.

Indikacije: Skrajšanje trajanja nevtropenije in zmanjšanje pogostnosti febrilne nevtropenije po običajni kemoterapiji zaradi nemieloidne maligne bolezni; skrajšanje trajanja nevtropenije in kliničnih posledic po mieloablativni terapiji, kateri sledi presaditev kostnega mozga; dolgotrajno zdravljenje z namenom zvečanja števila nevtrofilcev in zmanjšanja incidence oz. skrajšanje trajanja infekcijsko povezanih dogodkov pri bolnikih s hudo vrojeno, ciklično ali idiopatično nevtropenijo s številom nevtrofilcev ($0,5 \times 10^9/L$), in s hudimi ter pogostnimi okužbami; pospešeno izplavljanje matičnih krvotvornih celic (PBPC) (kot samostojni postopek ali v poteku mielosupresivne kemoterapije). Infuzija s filgastrimom pospešeno izplavljenih matičnih krvotvornih celic (PBPC) (s kostnim mozgom ali brez) pospešuje okrevanje hematopoietičnega sistema, vključno z zmanjševanjem potrebe po transfuziji trombocitov po mielosupresivni kemoterapiji. **Odmerjanje in uporaba: Odrasli:** Pri citotoksični kemoterapiji: $5 \mu\text{g/kg/dan}$ s subkutano injekcijo, ali razredčeno v 5% glukozi v iv. infuzijo v 30 minutah. Prvi odmerek smemo dati čez 24 ur po kemoterapiji. Zdravljenje nadaljujemo do pričakovanega povečanja in povratka primerne števila nevtrofilcev. **Mieloablativna terapija, ki ji sledi presaditev kostnega mozga:** $10 \mu\text{g/kg/dan}$ dano kot 30-minutna ali 24-urna iv. infuzija, razredčena s 5% glukozo, ali kot 24-urna subkutana infuzija. Začnemo čez vsaj 24 ur po infuziji kostnega mozga. Ko število nevtrofilcev preseže $1,0 \times 10^9/L$ pri treh kontrolah v treh zaporednih dnevih, odmerek zmanjšamo na $5 \mu\text{g/kg/dan}$. Če število nevtrofilcev vztraja naslednje tri dni pri enakem oz. večjem številu od $1,0 \times 10^9/L$, zdravljenje prekinemo. Če se število nevtrofilcev zmanjša pod $1,0 \times 10^9/L$ med zdravljenjem, moramo odmerek povečati, kot je navedeno zgoraj. **Pospešeno izplavljanje matičnih krvotvornih celic:** Samostojno zdravljenje: $10 \mu\text{g/kg/dan}$ subkutano kot 24-urna infuzija, razredčena s 5% glukozi ali kot enkratna dnevna injekcija šest dni zapored. Planiranje levkoforeze: priporočene so skupno 3 zaporedne kolekcije 5., 6. in 7. dne. V nadaljevanju pri mieloablativni terapiji: $5 \mu\text{g/kg/dan}$ subkutano vsak dan od prvega dne po zaključni kemoterapiji, dokler se ne povrne število nevtrofilcev na $1,0 \times 10^9/L$, potem moramo ugotoviti najmanjši možni odmerek za ohranjanje te ravni. Po enem do dveh tednih zdravljenja lahko začetni odmerek glede na odgovor podvojimo ali prepolovimo; zatem odmerek prilagajamo individualno za vsakega bolnika na 1 do 2 tedna tako, da ostane povprečno število nevtrofilcev med $1,5 \times 10^9/L$ in $10 \times 10^9/L$. Pri hudih infekcijah lahko presajate tudi o hitrejšem povečanju odmerka, vendar dolgoročna varnost NEUPOGENA pri odmerkih nad $24 \mu\text{g/kg/dan}$ pri bolnikih s kronično nevtropenijo še ni bila potrjena. Zdravljenje je možno izvajati samo v sodelovanju s specializiranimi centri, izkušenimi v uporabi G-CSF in v hematologiji, z vsemi potrebnimi zmogljivostmi. Pospešeno izplavljanje in aferezo je treba izvajati v sodelovanju s centri, ki imajo izkušnje na tem področju in kjer lahko pravilno opravijo celotno nadziranje matičnih krvotvornih celic. **Starejši:** Ni posebnih priporočil o odmerjanju.

Kontraindikacije: Znana preobčutljivost za zdravilo ali njegove sestavine. Huda vrojena nevtropenija (Kostmanov sindrom) z nenormalno citogenetiko. NEUPOGENA ne smemo namensko uporabljati zato, da bi tako povečali možnosti uvedbe citotoksične kemoterapije nad ustaljenimi režimi odmerjanja. **Nosečnost:** Tveganje za človeški zarodek je neznan. Ugotovljena je povečana možnost splava pri zajcih. Uporaba pri doječih materah ni priporočljiva. **Previdnostni ukrepi:** Pri mielodisplaziji in akutni mieloblastni ali kronični mielocitni levkemiji nista dognani varnost in učinkovitost. Previdnost je potrebna pri uporabi NEUPOGENA v zdravljenju vseh premalignih mieloidnih stanj, zaradi možnosti tumorske rasti. Zdravljenje z NEUPOGENOM, če se pojavijo mielodisplastični sindromi ali levkemija. Med zdravljenjem z NEUPOGENOM v rednih presledkih preverjamo število levkocitov. Število levkocitov, večje od $100 \times 10^9/L$, so ugotovili pri manj kot 5% bolnikov, zdravljenih z večjimi ali enakimi odmerki kot $3 \mu\text{g/kg/dan}$. Zdravljenje prekinemo, če število celic preseže $50 \times 10^9/L$ po pričakovanem nadiru. Z pospešenim izplavljanjem

matičnih krvotvornih celic (PBPC) prekinemo, ko število levkocitov zraste nad $100 \times 10^9/L$. Priporočljivo je preverjanje kostne mase pri bolnikih z osteoporozo, ki se zdravijo več kot 6 mesecev. Uporaba NEUPOGENA ni priporočljiva pri bolnikih s hudo ledvično ali jetrno okvaro. Vpliv na presadke in zavrnitvene reakcije še ni raziskan. Prekurzorji nevtrofilcev so lahko zmanjšani pri bolnikih po ekstenzivni kemoterapiji ali radioterapiji, zato je lahko pri teh bolnikih odgovor nevtrofilcev na NEUPOGEN zmanjšan. Posebni previdnostni ukrepi pri hudi kronični nevtropeniji: Diagnostični testi morajo razlikovati med npr. aplastično anemijo, mielodisplazijo, mieloidno levkemijo. Natančno moramo nadzorovati trombocite v prvih nekaj tednih in presoditi o zmanjšanju odmerka ali prekinitvi zdravljenja, če je njihovo število stalno manjše od $100000/\text{mm}^3$. Zasedovati moramo pojav anemij in prehodne poraste mieloidnih progenitorskih celic. Vsakih 12 mesecev opravimo morfološke in citogenetične preiskave kostnega mozga pri bolnikih s Kostmanovim sindromom. Nadziramo volumen vranice: povečanje, ki je odzivno na zmanjšanje odmerka, opažamo v 31% bolnikov; splenektomija je potrebna pri 3% bolnikov. Izključiti moramo druge možnosti (npr. virusno infekcijo) prehodne nevtropenije. Priporočamo redne analize urina zaradi odkrivanja hematurije/proteinurije. Varnost in učinkovitost pri novorojenčkih in bolnikih z avtoimunsko nevtropenijo še nista ugotovljeni. Posebni previdnostni ukrepi pri pospešenem izplavljanju matičnih krvotvornih celic (PBPC): Pred izpostavitvijo citotoksičnim pripravkom: Pri bolnikih, ki so prestali zelo ekstenzivno mielosupresivno terapijo, včasih ni razvidna zadostno izplavljanje matičnih krvotvornih celic (PBPC) za dosego priporočene minimalne tvorbe (več ali enako številu $2,0 \times 10^6/\text{CD}34^+/\text{kg}$ celic), ali v enaki meri pospeševanja povratka trombocitov. Nekateri citotoksični pripravki izkazujejo posebno citotoksičnost do fonda krvotvornih matičnih celic in lahko škodljivo vplivajo na pospešeno izplavljanje. Ko se odločamo za transplantacijo matičnih krvotvornih celic (PBPC), je priporočljivo načrtovati postopek zgodaj v poteku zdravljenja. Število izplavljenih matičnih celic pri takih bolnikih moramo oceniti pred dajanjem visokoodmerne kemoterapije. Če je po zgornjih kriterijih tvorba celic nezadostna, moramo razmišljati o drugih oblikah zdravljenja, ki ne zahtevajo podpore matičnih celic. Ocenjevanje rezultata tvorbe matičnih krvotvornih celic (PBPC): Ko določamo število matičnih celic, pridobljenih pri bolnikih, ki so bili zdravljeni z NEUPOGENOM, moramo pozornost posvetiti metodi kvantifikacije. Trenutno pridobljeno minimalno število celic $\text{CD}34^+$ ni natanko določeno. Priporočeno minimalno pridobljeno število celic $\text{CD}34^+$, večje oz. enako $2,0 \times 10^6 \text{ CD}34^+ \text{ celic/kg}$, temelji na kustvenih rezultatih, ki zadoščajo za hematološko obnavljanje. Število celic, ki je večje od zgoraj navedenega, je povezano s hitrejšim okrevanjem; tisti, ki so manjši od zgoraj navedenega, pa govorijo za počasnejše okrevanje. **Interakcije med zdravili:** Uporaba ni priporočljiva 24 ur pred kemoterapijo niti 24 ur po njej. **Stranski učinki in neželeni reakcije:** Boletine v mišicah in kosteh, težave v sečilih (v glavnem dizurija, redko hematurija/proteinurija); reverzibilna, od odmerka odvisna, povečanja vrednosti jetrnih encimov in serumske sečne kisline; prehodni padci krvnega tlaka; občasna poročila o žilnih nepravilnostih po visokoodmerni kemoterapiji. Redka poročila o reakcijah alergične narave. Neželeni učinki pri bolnikih s hudo kronično nevtropenijo niso pogosti in se sčasoma zmanjšajo. Zasedli so: kostne/generalizirane boletine; splenomegalijo; trombocitopenijo; glavobol; drisko; anemijo; krvavitev iz nosu (pri podaljšnem dajanju); nesimptomatični dvig koncentracije serumske sečne kisline in jetrnih encimov; prehodno, zmerno hipoglikemijo; reakcije na mestu vbrizgavanja; hepatomegalijo; artralgijo; alopecijo; osteoporozo. Kožni vaskulitis po dolgotrajni uporabi.

Popolna navodila so na voljo pri zastopniku.

Proizvajala:
F. Hoffmann-La Roche Ltd
Basel, Švica



Zastopa:
Hoffmann-La Roche Ltd
Družnica Ljubljana

Strokovni prispevek/Professional article

DOLOČANJE ANTIGENOV CD62P IN CD63 S PRETOČNIM CITOMETROM ZA OCENO AKTIVIRANIH TROMBOCITOV

DETECTION OF ACTIVATED PLATELETS BY FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF ANTIGENS CD62P AND CD63

Jana Kralj

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-04-09, sprejeto 1998-04-15; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-57-9

Ključne besede: *P-selektin; receptorji GPIIb in GP IIIa; mono-klonaska protitelesa; adenoindifosfat; tromboza*

Key words: *P-selectin; GPIIb and GPIIIa receptors; monoclonal antibodies; adenosine diphosphate; thrombosis*

Izveček – Izhodišča. Aktivirane trombocite so ugotovili pri bolnikih z aterosklerozo, vensko trombozo in malignimi boleznimi. Določanje aktiviranih trombocitov je pomembno za odkrivanje tveganja za nastanek tromboze. Večina načinov za oceno trombocitne funkcije je posrednih. Nanje vplivajo številni dejavniki, ki omejujejo klinično uporabnost. Pretočni citometer nam ponuja določanje aktiviranih trombocitov z uporabo monoklonskih protiteles. Kljub številnim prednostim, pa se pretočna citometrija za določanje aktiviranih trombocitov v klinični praksi še ni uveljavila.

Abstract – Background. Platelets may become activated in a number of disorders such as atherosclerosis, venous thrombosis and cancer. Therefore, the detection of activated platelets might facilitate the identification of certain thrombotic disorders. Previous methods for assaying platelet activity have been indirect, and quantitation has been difficult, precluding their use in the clinical area. Flow cytometry is a promising new method, using monoclonal antibodies specific for a glycoprotein markers of platelet activation expressed on the membrane surface following activation.

Preiskovanci in metode. Aktivirane trombocite smo določili pri 30 zdravih preiskovancih s protitelesi za antigena CD62P in CD63 pred in po spodbuditvi z ADP, ADP in ADR, trombinom in kolagenom. Preverili smo pogoje, ki preprečijo aktivacijo trombocitov med delom in zagotovijo ponovljivost izsledkov.

Methods. Cell surface expression of granule membrane antigens P-selectin (CD62P) and lysosome antigen CD63 were examined by flow cytometry in 30 healthy donors. We studied the conditions to prevent artifactual induction of platelet activation.

Rezultati. V vzorcih krvi s paraformaldehidom smo ugotovili znatno manjši delež trombocitov z antigeni CD62P in CD63 (< 5%) kot, v vzorcih krvi s teofilinom (< 27%). Ugotovili smo, da so koncentracije ADP 10 $\mu\text{mol/L}$, ADP in ADR 20 $\mu\text{mol/L}$, 0,17 E/mL trombina in 88 $\mu\text{g/mL}$ kolagena zadostne da spodbudijo trombocite k premestitvi antigenov CD62P in CD63 na membrano, ne povzročijo pa medsebojnega zlepljanja. Določili smo referenčne vrednosti pred spodbuditvijo z izbranimi spodbujevalci in po njej.

Results. The proportion of platelets expressing antigens CD62P and CD63 in blood samples with paraformaldehyde was lower (< 5%) than in samples with theophyllin (< 27%). The concentration-effect relationship were determined for the ADP, adrenaline, thrombin and collagen induced expression of CD62P and CD63.

Zaključki. Menimo, da je za preprečevanje aktivacije trombocitov med določanjem antigenov CD62P in CD63 najbolj primerna uporaba 1% raztopine paraformaldehida. Deleži trombocitov z antigeni CD62P in CD63 se razlikujejo glede na izbrane spodbujevalce. Menimo, da je za celovito oceno aktiviranih trombocitov smiselno uporabiti več monoklonskih protiteles.

Conclusions. The results suggest that 1% solution of paraformaldehyde should be used for preventing of artifactual induction of platelet activation in blood samples. Platelets are likely to become activated by different agonist in different clinical situations. Therefore, it seems necessary to detect of activated platelets by a panel of monoclonal antibodies.

Uvod

Trombociti se v krvnem obtoku aktivirajo pri različnih boleznih. Najpogostejše so bolezni ožilja, akutni srčni infarkt, dihalna stiska pri srčnih operacijah, sladkorna bolezen, mieloproliferativne bolezni, preeklampsija in sepsa (1-7). Pri slednjih bi morda z določanjem aktiviranih trombocitov ocenili tveganje za nastanek tromboze in začeli zdravljenje za preprečitev. Kljub naglemu razvoju tehnologije, ki nam omogoča hitro in natančno oceno števila in velikost trombocitov, pa nimamo na voljo enostavnega preskusa za oceno trombocitne funkcije. Laboratorijske preiskave

za oceno trombocitne funkcije obsegajo merjenje adhezije in agregacije trombocitov ter določanje deleža aktiviranih trombocitov. Preskus agregacije trombocitov in čas krvavitve se pogosto uporabljata v klinični praksi za oceno funkcije trombocitov. Ker sta preiskavi odvisni od številnih dejavnikov, je njun diagnostični pomen omejen (8, 9). Na izid določanja beljakovin, ki se sprostijo iz aktiviranih trombocitov, kot so beta-tromboglobulin, trombocitni faktor 4 in tromboksan A_2 , v krvni plazmi ter metabolitov tromboksana A_2 , v seču, vplivajo tudi dejavniki, ki niso v zvezi z načinom določanja. Zato se ti načini niso uveljavili v diagnostiki. V zadnjih letih se je uveljavilo

določanje antigenov na celični membrani s pretočnim citometrom in monoklonskimi protitelesi. Metoda se v klinični hematologiji uporablja predvsem za določanje podvrst limfocitov in za opredelitev levkemij in malignih limfomov (10). Vse bolj pogosto jo rabijo tudi za določanje aktiviranih trombocitov.

Trombociti imajo na membrani številne glikoproteinske molekule, ki so biokemično in genetično dobro poznane. Mnogi trombocitni glikoproteini so heterodimeri z lastnostmi receptorjev, ki so pomembni pri aktivaciji, adheziji in agregaciji trombocitov. Z uporabo monoklonskih protiteles, ki so označena s fluorescenčnimi barvili, jih prikazemo. Danes je uspelo izdelati monoklonska protitelesa tudi za antigene na membrani aktiviranih trombocitov. To so protitelesa, ki se vežejo na preoblikovana aktivirana glikoproteina GPIIb in GPIIIa in na beljakovine granul in lizosomov v trombocitih. Čeprav so številni avtorji ocenjevali aktivirane trombocite s pretočnim citometrom pri različnih boleznih, še vedno ni dovolj znan klinični pomen teh preiskav (2-7, 11).

Ker na določanje aktiviranih trombocitov vplivajo številni dejavniki, je v vsakem laboratoriju potrebno določiti osnovne pogoje dela in meritve ter določiti referenčne vrednosti (19). Želeli smo preveriti pogoje, ki preprečijo aktivacijo trombocitov med delom in zagotovijo ponovljivost izsledkov in določiti referenčne vrednosti, za trombocite z antigeni CD62P in CD63 pred spodbuditvijo z ADP, ADP in adrenalinom, trombinom in kolagenom in po njej.

Preiskovanci in načini dela

Aktivirane trombocite smo ocenjevali z določanjem antigenov CD62P in CD63 pri zdravih osebah pred spodbuditvijo z ADP, ADP in ADR, trombinom in kolagenom in po njej. Uporabili smo vzorce krvi 30 zdravih oseb v starosti od 18 do 50 let. Preiskovane osebe so bili nekadilci in niso prejeli zdravil.

Uporabili smo monoklonska protitelesa CD62P, CD63, CD41 in CD42b proizvajalca Immunotech (Marseille, Francija), snovi za spodbujanje ADP, ADR in kolagen proizvajalca DiaMed (Cressier sur Morat, Švica), trombin Dade AG (Duding, Švica), paraformaldehid in teofilin proizvajalca Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Nemčija).

Kri smo odvzeli v polistirensko epruveto z raztopino natrijevega citrata (0,129 M) proizvajalca Becton Dickinson (Meylan-Cedex, Francija).

Delež aktiviranih trombocitov smo določali v krvi do 10 minut po odvzemu in po spodbuditvi z ADP, ADP in ADR, trombinom in kolagenom (22). Z določanjem antigenov CD41 in CD42b smo potrdili, da je bilo v suspenziji celic, ki smo jo preiskovali 99% trombocitov. Vse meritve smo napravili s citometrom XL-MCL tovarne Coulter Electronics GmbH. V vzorcih krvi smo s citometrom ocenili 5 000 trombocitov in ugotovili delež celic z antigeni.

Preizkusili smo učinek 1% raztopine paraformaldehida in 1% raztopine teofilina na preprečevanje aktivacije trombocitov pri delu. S primerjanjem izsledkov aktiviranih trombocitov po spodbuditvi z ADP (koncentracije 7,3, 14,6, 16,6, 33 $\mu\text{mol/L}$), trombinom (koncentracije 0,5, 1, 1,7 in 2 E/mL) in kolagenom (koncentracije 44, 88, 100 $\mu\text{g/mL}$) smo določili ustrezne koncentracije za spodbuditev trombocitov k premestitvi antigenov CD62P in CD63 na membrano. Te koncentracije smo izbrali tako, da ne povzročajo medsebojnega zlepljanja trombocitov. Statistično analizo smo napravili na računalniku IBM PC/AT. Uporabili smo program Statistica for Windows Release 4.1 Upoštevali smo vzorčne cenilke parametrov porazdelitve merjenih količin (aritmetična sredina, standardni odklon). Sklepe smo sprejemali pri manj kot 5% tveganju ($p < 0,05$).

Izsledok

Pri preskušanju učinka paraformaldehida in teofilina na preprečevanje aktivacije trombocitov med delom smo v vzorcih krvi s paraformaldehidom ugotovili znatno manjši delež trombocitov z

antigeni CD62P in CD 63 (<5%) kot v vzorcih krvi s teofilinom (<27%).

Pri določanju ustreznih koncentracij spodbujevalcev smo ugotovili, da 10 $\mu\text{mol/L}$ ADP, 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP in ADR, 0,17 E/mL trombina in 88 $\mu\text{g/mL}$ kolagena zadostujejo za spodbuditev trombocitov k premestitvi antigenov CD62P in CD63 na membrano, ne povzročijo pa medsebojnega zlepljanja trombocitov.

V tabeli 1 smo navedli srednje vrednosti deleža trombocitov z antigeni CD62P in CD63 pri 30 zdravih preiskovancih pred in po spodbuditvi z ADP, ADP in ADR, kolagenom in trombinom (tab. 1).

Tab. 1. Delež trombocitov z antigeni CD62P in CD63 pred in po spodbuditvi s ADP, ADP in adrenalinom, trombinom in kolagenom.

Tab. 1. Cell surface expression of CD62P and CD63 in unstimulated platelets and in stimulated platelets with ADP, ADP and adrenaline, thrombin, and collagen.

	Brez spodbuditve Unstimulated platelets		Po spodbuditvi Stimulated platelets		
	ADP ADP	ADP ADP	ADP in ADR ADP and ADR	Trombin Thrombin	Kolagen Collagen
CD62P (% x \pm s)	5,2 \pm 1,2	41,0 \pm 8,2	46,1 \pm 9,2	41,5 \pm 5,2	40,5 \pm 4,8
CD63 (% x \pm s)	8,1 \pm 1,4	16,2 \pm 2,3	16,5 \pm 5,6	26,0 \pm 9,6	19,2 \pm 6,2

x – povprečna vrednost / mean value

s – standardni odklon / standard deviation

ADP – adenosindifosfat / adenosine diphosphate

ADR – adrenalin / adrenaline

% – delež trombocitov z antigeni CD62P ali CD63 / indicates the percentage of human blood platelets expressing cell surface CD62P or CD63

Pri zdravih preiskovancih smo po spodbuditvi ugotovili statistično značilno večji delež trombocitov z antigenom CD62P kot antigenom CD63 ($p < 0,05$).

Razpravljanje

Aktivacijo trombocitov sproži trombin, kolagen v subendoteliju ali spodbujevalci kot sta adenosindifosfat (ADP) in adrenalin (ADR). Aktivirani trombociti se spremene iz diskoidne v sferično obliko z izrastki. Sledijo preureditve in premestitve receptorjev iz citoplazme na membrano. Na receptorje se lahko vežejo fibrinogen, von Willebrandov faktor, kolagen in trombospodin, ki sprožijo adhezijo in agregacijo trombocitov ter nastanek strdka (11-13). Močni spodbujevalci lahko povzročijo aktivacijo trombocitov v krvnem obtoku in nalaganje trombocitov na žilno steno ter nastanek tromboze.

Ugotovili so, da je v citoplazmi trombocitov več vrst zrn, ki se glede na vsebino med seboj razlikujejo. Po spodbuditvi celice se zrnca prenesejo na celično površino, preko kontraktilnega dela celičnega skeleta, kjer se vključijo v zgradbo celične membrane ali pa izločijo iz celice. Ugotovili so, da se iz membrane zrnca alfa vključijo v membrano trombocita glikoprotein P-selektin (GMP-140, PADGEM, CD 62P), ki ima vlogo mediatorja med aktiviranimi trombociti in celicami endotelija ter granulociti in monociti. Izdelali so več monoklonskih protiteles za odkrivanje P selektina (16, 17). Ugotovili so tudi, da se po spodbuditvi iz membrane lizosomov prenese na membrano trombocitov protein 53-kDa (CD63). Avtorji so menili, da bi z določanjem antigenov CD62P in CD63 na membrani trombocitov lahko ocenili delež aktiviranih trombocitov (18).

S pretočnim citometrom ugotovimo lahko že majhne spremembe aktivacije trombocitov. Mnenja, ali je določanje aktiviranih trombocitov s pretočnim citometrom ustrezno za oceno trombocitne funkcije, so še vedno deljena. Predvsem je pomembno določiti pogoje, ki preprečujejo aktivacijo trombocitov med določanjem. Sprva so ocenjevali delež aktiviranih trombocitov po osamitvi trombocitov, danes ocenjujejo v krvi, ker že postopki osamitve

celice lahko spodbudijo aktivacijo trombocitov. Nekateri avtorji zato priporočajo fiksirat celice s paraformaldehidom ali pa uporabo snovi, s katerimi zavremo presnovne procese v celici (4, 19). V naši raziskavi smo preizkusili učinek paraformaldehida in teofilina na preprečevanje aktivacije trombocitov med delom. Ugotovili smo značilno manjši delež trombocitov z antigeni CD62P in CD63 (< 5%) v vzorcih krvi s paraformaldehidom kot v vzorcih krvi s teofilinom (< 27%). Menimo, da je za preprečevanje aktivacije trombocitov med določanjem antigenov CD62P in CD63 primerna uporaba 1% raztopine paraformaldehida.

Za določanje aktiviranih trombocitov po spodbuditi so trombocite po odvzemu krvi spodbudili s spodbujevalci, kot so ADP, ADR, trombin in kolagen. Po spodbuditi so aktivacijske antigene določili na membrani trombocitov. Na ta način so ugotavljali zvečan delež aktiviranih trombocitov pri bolnikih z rakavimi boleznimi in pri zdravih oseb. Enake spremembe so opisali tudi pri mieloproliferativnih boleznih (18, 20). Za razliko od drugih smo ugotovili, da so ustrezne večje koncentracije ADP in trombina za spodbuditev trombocitov k premestitvi antigenov CD62P in CD63 na membrano (21).

Da imajo trombociti po spodbuditi na membrani antigene CD62P in CD63, smo potrdili tudi z našo raziskavo (18–20). Antigen CD62P smo ugotovili po spodbuditi z ADP pri 41,0%, z ADP in ADR pri 46,1%, s trombinom pri 41,5% in s kolagenom pri 40,5% trombocitov. Antigen CD63 smo ugotovili po spodbuditi z ADP pri 16,2%, z ADP in ADR pri 16,5%, s trombinom pri 26,0%, in s kolagenom pri 19,2% trombocitov.

V literaturi nismo zasledili dela, ki bi obravnavalo razmerje med antigeni CD62P in CD63 na membrani trombocita po spodbuditi. V naši raziskavi smo z različnimi načini spodbujevanja ugotovili, značilno večji delež trombocitov z antigenom CD62P kot z antigenom CD63.

Potrdili smo tudi ugotovitve drugih, da se trombociti zdravih oseb različno odzivajo na izbrane spodbujevalce (20, 21). Delež trombocitov z antigeni CD62P je bil po spodbuditi z ADP in ADR statistično značilno večji kot po spodbuditi z drugimi uporabljenimi spodbujevalci. Statistično značilno večji delež trombocitov z antigeni CD63 pa smo ugotovili po spodbuditi s trombinom. Menimo, da je za določanje aktiviranih trombocitov nujno uporabiti več monoklonskih protiteles, ki odkrivajo različne antigene. Predpostavljamo, da na ta način lahko ocenimo aktivirane trombocite pri različnih boleznih, kjer so vzroki in poti spodbujevanja zelo različni.

Zaključki

Za preprečevanje aktivacije trombocitov med določanjem antigenov CD62P in CD63 je najbolj primerna uporaba 1% raztopine paraformaldehida. Ugotovili smo, da je za uporabljena monoklonska protitelesa potrebno vedno določiti najprimernejše koncentracije spodbujevalcev za premestitev antigenov CD62P in CD63 na membrano.

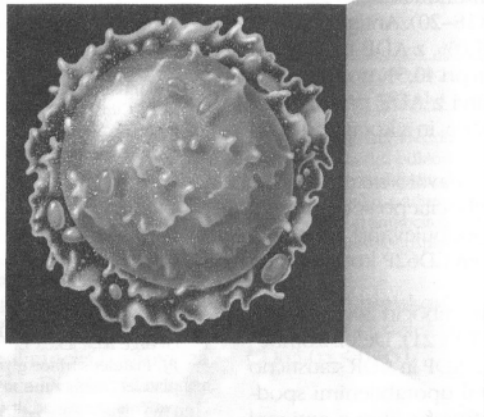
Pri zdravih preiskovancih smo po spodbuditi trombocitov z ADP, ADP in ADR, trombinom in kolagenom ugotovili značilno večji delež trombocitov z antigenom CD62P kot antigenom CD63.

Literatura

- Flores NA, Sheridan DJ. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 295–5.
- Ejim OS, Powling MJ, Dandona P, Kernoff PB, Goodall AH. A flow cytometric analysis of fibronectin binding to platelets from patients with peripheral vascular disease. *Thromb Res* 1990; 58: 519–602.
- Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996; 93: 229–37.
- Tschope D, Schultheiss HP, Kolarov P, Schwippert B, Dannehl K, Nieuwenhaus HK, Kehrel B, Strauer B, Gries FA. Platelet membrane markers are predictive for increased risk of acute ischaemic events after PTCA. *Circulation* 1993; 88: 37–42.
- Tschope D, Driesch E, Schwippert B, Nieuwenhaus HK, Gries FA. Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by nearnormoglycemia. *Diabetes* 1995; 44: 890–4.
- Wehmeier A, Tschope D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhaus HK, Schneider W. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. *Thrombosis Res* 1991; 61: 271–8.
- Janes SL, Kyle PM, Redman C, Goodall AH. Flow cytometric detection of activated platelets in pregnant women prior to the development of pre-eclampsia. *Thromb Haemostasis* 1994; 74: 1059–63.
- Rodgers RPC, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 1991; 61: 1–7.
- George JN, Shattil SJ. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med* 1991; 324: 27–31.
- Žontar D, Černelc P. Uporaba pretočne citometrije v klinični hematologiji. 1993; 9: 361–424.
- Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leukocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 843–51.
- Janes SL, Wilson DJ, Chronos N, Goolall AH. Evaluation of whole blood flow cytometric detection of platelet bound fibrinogen on normal subjects and patients with activated platelets. *Thromb Haemostasis* 1993; 70: 659–66.
- Hourdille P, Galnick HR, Heilmann E, Derion A, Ferrer AM, Vezon G, Nurden AT. Von Willebrand factor bound to glycoprotein Ib is cleared from the platelet surface after platelet activation by thrombin. *Blood* 1992; 79: 2011–21.
- Kehrel B. Platelet receptors for collagens. *Platelets* 1995; 6: 11–6.
- Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemostasis* 1995; 21: 146–51.
- George NJ, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986; 40: 348–8.
- Sedlmayer P, Grobhaupt B, Muntean W. Flow cytometric detection of intracellular platelet antigens. *Cytometry* 1996; 23: 284–9.
- Golanski J, Pietrucha T, Baj Z, Greger J, Watala C. A novel approach to inhibit anticoagulant induced spontaneous activation of blood platelets. *Thromb Res* 1997; 85: 127–32.
- Kannan K, Divers SG, Lurie AA, Chervenik R, Fukuda M, Holcombe RF. Cell surface expression of lysosome-associated membrane protein-2 and CD63 as markers of in vivo platelet activation in malignancy. *Eur J Haematol* 1995; 55: 145–51.
- Michelson D. Flow Cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925–36.
- Wehmeier A, Tschope D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhuis J. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1991; 61: 271–8.
- Rinder CS, Student LA, Banon JL, Rinder HM, Smith BR. Aspirin does not inhibit adenosin diphosphate-induced platelet alpha granule release. *Blood* 1993; 82: 505–12.
- Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307–12.

Fludara[®]

(fludarabinfosfat)



Najaktivnejše zdravilo druge izbire za monoterapijo bolnikov s kronično limfocitno levkemijo (KLL) celic B

**Učinkovita kot monoterapija predhodno
zdravljenih bolnikov**

**Učinkovita v napredovalih stopnjah
bolezni pri bolnikih, ki se ne odzovejo
na kombinirano zdravljenje**

**Učinkovitejša kot kombinirano
zdravljenje s CAP pri predhodno
zdravljenih bolnikih**

Bolniki jo dobro prenašajo

Uporabljati jo je mogoče ambulantno

Strokovni prispevek/Professional article

DOLOČANJE PROTITELES PROTI TROMBOCITOM PRI KRONIČNI IDIOPATIČNI TROMBOCITOPENIČNI PURPURI S PRETOČNIM CITOMETROM

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS OF PLATELET ANTIBODIES IN CHRONIC IDIOPATHIC
THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Darja Žontar, Peter Černelč

Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-04-06, sprejeto 1998-04-08; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-61-3

Ključne besede: trombocitna protitelesa; razred IgG; razred IgM; pretočna citometrija; kronična idiopatična trombocitopenična purpura

Key words: platelet antibodies; class IgG; class IgM; flow cytometry; chronic idiopathic thrombocytopenic purpura

Izvleček – Izhodišča. Za potrditev avtoimunskih trombocitopenij določamo protitelesa proti trombocitom, ki so lahko vezana na trombocite ali pa prosta v plazmi. Določamo protitelesa razredov IgG in IgM.

Abstract – Background. To confirm the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia we test antibodies against platelets, which are bind on platelets (direct assay) or are free in plasma (indirect assay). Class IgG and IgM platelet antibodies can be determined.

Preiskovanci in načini. S pretočnim citometrom smo določali protitelesa IgG in IgM proti trombocitom na površini trombocitov in prosta v plazmi pri 56 bolnikih z idiopatično trombocitopenično purpuro (ITP).

Results. Flow cytometry was used to detect platelet antibodies in 56 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Platelet associated antibodies (direct assay) were positive in 30/56 (54%) patients with 19/56 (34%) positive for IgG and 25/56 (45%) for IgM. Circulating antibodies (indirect assay) were positive in 35/56 (62%) patients with 27/56 (48%) for IgG and 26/56 (46%) for IgM. 15/56 (27%) patients were positive for platelet associated antibodies IgG and IgM. 18/56 (32%) patients were positive for circulating antibodies IgG and IgM. 24/56 (43%) patients were positive for both, circulating and platelet associated antibodies. Bone marrow examination was made in 37/56 patients. An increased numbers of megakaryocytes were found in 31/37 (88%) patients.

Rezultati. Pri 56 bolnikih z značilnostmi ITP smo s pretočnim citometrom ugotovili protitelesa na trombocitih ali v plazmi pri 42/56 (75%) bolnikih. Protitelesa, vezana na membrano trombocitov, smo ugotovili pri 30/56 (54%) bolnikih, od tega protitelesa razreda IgG pri 19/56 (34%) bolnikih, protitelesa razreda IgM pa pri 25/56 (45%) bolnikih. Protitelesa proti trombocitom v plazmi smo ugotovili pri 35/56 (62%) bolnikih, od tega protitelesa razreda IgG pri 27/56 (48%) bolnikih, protitelesa razreda IgM pa pri 26/56 (46%) bolnikih. Pri 15/56 (27%) bolnikih z značilnostmi ITP smo s pretočnim citometrom ugotovili istočasno protitelesa razredov IgG in IgM, vezana na membrano, medtem ko smo pri 18/56 (32%) bolnikih ugotovili istočasno protitelesa razredov IgG in IgM v plazmi. Pri 24/56 (43%) bolnikih smo ugotovili istočasno protitelesa proti trombocitom na membrani in v plazmi. Punkcijo kostnega mozga smo napravili pri 37/56 (66%) bolnikih. Pri 31/37 (88%) bolnikih je bilo število megakariocitov v kostnem mozgu zvečano, kar je značilnost imunskih trombocitopenij. Pri drugih bolnikih sta bila izsledki citološkega pregleda kostnega mozga in število megakariocitov normalna.

Conclusions. In patients with idiopathic thrombocytopenic purpura increased values of antibodies were found by both methods.

Zaključki. Določanje protiteles proti trombocitom je preiskava za potrditev ITP. Kljub temu, da pri večini bolnikov z ITP ugotavljamo prisotnost protiteles proti trombocitom, pa ostaja citološki pregled kostnega mozga in potrditev zvečanega števila megakariocitov zanesljivejši in cenejši način potrditve ITP.

Uvod

Na membranah trombocitov je pri človeku več skupin antigenov, proti katerim lahko nastanejo specifična protitelesa. Najpogostejše skupine antigenov so: ABO, HLA razred I, glikoprotein IIb/IIIa (receptor za fibrinogen), glikoprotein Ib (receptor za FVIII-von Willebrandov faktor) in številni drugi za trombocite specifični antigeni, ki so pri več kot 90% ljudi (1–3).

Do povečanega razpada trombocitov lahko pride zaradi nastanka aloprotiteles (po več transfuzijah trombocitov) ali avtoprotiteles (idiopatična trombocitopenična purpura, bakterijske in virusne okužbe, sistemski lupus eritematozus, limfoproliferativne bolezni in po nekaterih zdravilih). Protitelesa se lahko vežejo z Fc delom na Fc receptorje trombocitov (imunski kompleksi). Z Fab delom se lahko vežejo na adsorbirani antigen trombocita ali na specifične antigene trombocitov (avtoimunski kompleksi) pri čemer ostane Fc del prost za vezavo kompleksa ali vezavo na makrofage. Okvarjene trombocite z vezanimi protitelesi fagocitirajo makrofagi v vranici in jetrih (4).

Najpogosteje se pojavljajo protitelesa proti trombocitom razredov IgG in/ali IgM.

Kronična idiopatična trombocitopenična purpura (ITP) je avtoimunska bolezen, ki je posledica nastanka protiteles proti lastnim trombocitnim glikoproteinom Ib in IIb/IIIa. Bolezen se pogosto začne nenadoma s krvavitvami v kožo in sluznice zaradi trombocitopenije in ima kronični potek.

Za ugotavljanje protiteles proti trombocitom zadnja leta večinoma uporabljajo pretočni citometer (3–5). Podatkov o tovrstnih raziskavah v literaturi ni veliko, izsledki pa se med seboj razlikujejo. Ker preiskava ni standardizirana so izsledki preiskav slabo primerljivi med različnimi laboratoriji. Medtem ko s fluorescenčnim mikroskopom določamo trombocitna protitelesa kvalitativno, lahko s pretočnim citometrom določamo protitelesa tudi semikvantitativno, predvsem pa natančneje in hitreje.

Določanje trombocitnih protiteles je preiskava za potrditev ITP. Poleg uveljavljenega načina določanja protiteles na površini trombocitov s pretočnim citometrom smo želeli ugotoviti še delež prostih protiteles proti trombocitom v plazmi, predvsem pri bolnikih s kronično idiopatično trombocitopenijo, pa tudi pri odraslih zdravih osebah.

Bolniki in načini dela

Preiskovane osebe

Protitelesa proti trombocitom smo določali v Enoti za diagnostiko Kliničnega oddelka za hematologijo v Ljubljani od januarja 1995 do marca 1998 pri 34 bolnicah in 22 bolnikih z idiopatično trombocitopenijo v starosti od 20 do 80 let. Diagnostični kriteriji za ITP so bili: 1) trombocitopenija, 2) povečano ali normalno število megakariocitov v kostnem mozgu, 3) odsotnost povečane vranice in znakov drugih bolezni. Število trombocitov v krvi je bilo od 1 do $136 \times 10^9/L$.

Priprava suspenzije trombocitov

10 ml venske krvi z EDTA (etilendiamino-tetraacetat) centrifugiramo tri minute pri 1700 g in 22° C. Plazmo s trombociti odstranimo in prenesemo v 10 ml plastično epruveto. Ponovno centrifugiramo deset minut pri 800 g in 22° C. Po centrifugiranju plazmo odstranimo, trombociti pa ostanejo na dnu epruvete. Trombocite trikrat izperemo in razredčimo s PBS-EDTA (puferirana fiziološka raztopina z etildiamino-tetraacetatom), nato pa uravnamo na 50.000/ul.

Neposredni način določanja protiteles proti trombocitom

200 µl suspenzije trombocitov preiskovanca dodamo 20 µl protihumanih protiteles IgG (IgG-Fab) konjugiranih s fluoresceinom in

v drugo epruveto 20 µl protihumanih protiteles IgM (IgM-Fab) konjugiranih s fluoresceinom. Rahlo premešamo in inkubiramo v temi 30 minut. Po inkubaciji trombocite trikrat izperemo s PBS-EDTA. Vsak vzorec razredčimo s 200 µl PBS-EDTA, rahlo premešamo in vrednotimo s pretočnim citometrom (EPICS XL2-MCL).

Posredni način določanja protiteles proti trombocitom

200 µl suspenzije trombocitov iz poola zdravih darovalcev krvne skupine 0 pipetiramo v označene epruvete. Dodamo 100 µl bolnikovega seruma in inkubiramo 30 minut pri 37°C. Trikrat izperemo s PBS-EDTA in dodamo po 20 µl protihumanih protiteles IgG (Fab)-FITC in IgM (Fab)-FITC. Inkubiramo 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Nato trombocite trikrat izperemo s PBS-EDTA. Vsak vzorec razredčimo s 200 µl PBS-EDTA in vrednotimo s pretočnim citometrom.

Priprava negativne kontrole

200 µl suspenzije trombocitov iz poola zdravih darovalcev dodamo 100 µl seruma, ki ne vsebuje protiteles proti trombocitom. Inkubiramo 30 minut pri 37°C. Trikrat izperemo trombocite s PBS-EDTA, dodamo protihumana protitelesa IgG (Fab)-FITC ali IgM (Fab)-FITC in ponovno inkubiramo 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji ponovno trikrat izperemo s PBS-EDTA, vzorec razredčimo s 200 µl PBS-EDTA in vrednotimo fluorescenco s pretočnim citometrom.

Priprava pozitivne kontrole

200 µl suspenzije trombocitov iz poola zdravih darovalcev dodamo 100 µl seruma bolnika, pri katerem smo poprej dokazali prisotnost protiteles proti trombocitom. Inkubiramo 30 minut pri 37°C. Trikrat izperemo s PBS-EDTA in dodamo protihumana protitelesa IgG (Fab)-FITC ali IgM (Fab)-FITC in ponovno inkubiramo 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji ponovno trikrat izperemo s PBS-EDTA, vzorec razredčimo s 200 µl PBS-EDTA in vrednotimo fluorescenco s pretočnim citometrom.

Referenčne vrednosti Kliničnega oddelka za hematologijo so za protitelesa, vezana na membrano trombocitov razreda IgG, do največ 12,2% pozitivnih trombocitov ($8,6 \pm 3,6\%$), protitelesa razreda IgM do največ 7,2% pozitivnih trombocitov ($3,8 \pm 3,4\%$). Za protitelesa proti trombocitom v plazmi zdravih oseb so ugotovljene vrednosti za IgG do največ 12,9% pozitivnih trombocitov ($9,2 \pm 3,7\%$), za IgM pa do največ 8,9% pozitivnih trombocitov ($5,4 \pm 3,5\%$).

Rezultati

Med 56 bolniki z značilnostmi ITP smo s pretočnim citometrom ugotovili protitelesa na trombocitih ali v plazmi pri 42/56 (75%). Protitelesa, vezana na membrano trombocitov, smo ugotovili pri 30/56 (54%) bolnikih, od tega protitelesa razreda IgG pri 19/56 (34%) bolnikih, protitelesa razreda IgM pa pri 25/56 (45%) bolnikih. Protitelesa proti trombocitom v plazmi smo ugotovili pri 35/56 (62%) bolnikih, od tega protitelesa razreda IgG pri 27/56 (48%) bolnikih, protitelesa razreda IgM pa pri 26/56 (46%) bolnikih.

Pri 15/56 (27%) bolnikih z značilnostmi ITP smo s pretočnim citometrom ugotovili istočasno protitelesa razredov IgG in IgM, vezana na membrano, medtem ko smo pri 18/56 (32%) bolnikih ugotovili istočasno protitelesa razredov IgG in IgM v plazmi. Pri 24/56 (43%) bolnikih smo ugotovili istočasno protitelesa proti trombocitom na membrani in v plazmi.

Punkcijo kostnega mozga smo napravili pri 37/56 (66%) bolnikih. Pri 31/37 (88%) je bilo število megakariocitov v kostnem mozgu zvečano. Pri drugih bolnikih sta bila izsledki citološkega pregleda kostnega mozga in število megakariocitov normalna.

Tab. 1. *Protitelesa proti trombocitom pri bolnikih z idiopatično trombocitopenično purpuro.*

Tab. 1. *Platelet antibodies in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.*

Bolniki Patients	KM BM	Tr.x10 ⁹ /L Pltx10 ⁹ /L	Protitelesa na površini trombocitov Platelet associated antibodies		Protitelesa v plazmi Circulating antibodies	
			IgG %	IgM %	IgG %	IgM %
1. ZZ		102	11,1	8,8*	11,1	4,2
2. KD	zv	125	25,0*	22,0*	8,7	2,1
3. ŠM	zv	55	4,7	39,0*	14,6*	68,3*
4. BA		12	12,0*	18,0*	19,5*	11,5*
5. KE		104	13,8*	7,2*	16,3*	6,2
6. VA		18	18,9*	10,4*	44,9*	1,6
7. SA		11	42,9*	3,1	30,1*	3,4
8. VA		116	18,2*	11,0*	14,0*	3,2
9. KS	zv	16	29,0*	9,6*	19,0*	14,0*
10. ŠP		105	1,0	0	4,0	0
11. LJ	zv	97	3,0	2,0	10,3	2,4
12. KŠ		134	2,8	2,0	15,2*	1,6
13. RJ		44	2,8	2,1	21,6*	4,0
14. ČJ	zv	115	17,3*	2,0	6,6	0,7
15. BM	zv	107	14,2*	9,8*	12,2	7,1
16. SS	zv	130	6,3	11,2*	11,9	2,5
17. SF	zv	107	37,4*	0,4	19,1*	8,2
18. BP	n	57	2,2	0,3	3,4	1,8
19. BA		136	1,2	0,2	6,3	0,4
20. OD		114	1,9	2,0	10,3	8,4
21. AP	n	70	8,9	5,2	10,9	6,0
22. VJ		124	32,0*	45,8*	13,7*	23,8*
23. MA		6	4,0	2,8	2,9	1,7
24. SD	n	76	3,6	7,1	9,4	4,4
25. DF		78	14,9*	47,6*	19,8*	38,6*
26. EO		2	32,1*	0,8	15,7*	4,7
27. SM		76	9,4	4,2	16,2*	15,6*
28. FT		30	5,4	75,3*	10,2	37,8*
29. ŽL	zv	101	0,8	0,4	6,4	1,9
30. MŽ	n	98	23,2*	27,0*	19,0*	24,9*
31. TT	zv	74	0	49,0*	14,8*	16,7*
32. DK	zv	64	0	8,4	2,4	23,9*
33. JM	zv	124	1,1	2,5	4,2	7,3
34. JL	zv	67	0,6	2,0	0	0
35. MŽ	zv	64	0	0,8	4,7	58,0*
36. ČM	zv	102	5,8	0,4	5,2	2,2
37. MP		33	11,4	15,1*	22,1*	24,8*
38. TB	n	53	1,9	2,2	2,4	4,5
39. VP	zv	11	3,4	6,4	2,0	4,0
40. PV	zv	6	0	3,0	78,0*	9,4*
41. ŠF	zv	14	0,7	3,3	6,0	4,7
42. MN	n	85	2,0	4,0	10,6	16,4*
43. HM	zv	1	8,2	7,6*	32,0*	25,0*
44. SS	zv	36	65,0*	72,0*	59,2*	55,8*
45. FD	zv	1	0,5	14,0*	84,0*	15,0*
46. FZ	zv	12	28,1*	16,2*	36,9*	24,0*
47. IC	zv	35	4,6	8,6*	16,4*	12,0*
48. SR	zv	3	14,7*	9,6*	30,0*	18,9*
49. AP	zv	61	8,4	12,0*	11,6	16,3*
50. ML	zv	88	1,4	18,2*	11,8	45,3*
51. VT	zv	25	0	0	14,3*	29,5
52. IK	zv	1	1,0	9,6*	1,0	10,2*
53. RL	zv	1	0,6	3,4	2,0	12,6*
54. JS	zv	10	34,0*	23,0*	18,4*	14,9*
55. LS	zv	68	8,9	20,9*	10,4	17,0*
56. RM	zv	90	12,4*	35,1*	8,9	6,3

KM – kostni mozeg

BM – bone marrow

zv – zvečano število megakariocitov v kostnem mozgu
– increased numbers of megakaryocytes in bone marrow

n – normalno število megakariocitov v kostnem mozgu
– normal megakaryocyte count

* – zvečan odstotek protiteles proti trombocitom
– increased values of platelet antibodies

Tr – število trombocitov v krvi

Plt – platelet count

Razpravljanje

Pri določanju protiteles proti trombocitom je v literaturi opisanih več načinov, ki so zelo različno občutljivi in specifični. V primerjavi s članki avtorjev, ki so za določanje protiteles proti trombocitom uporabljali pretočni citometer, so rezultati naših raziskav različno primerljivi. Finley (4) je pri skupini 20 bolnikov z ITP ugotovil protitelesa na membrani trombocitov pri 90% bolnikov, prosta protitelesa proti trombocitom pa le pri 20% bolnikov. Pri naših bolnikih smo ugotovili pogosteje prosta protitelesa kot vezana na trombocite. V skupini 56 bolnikov z ITP smo dokazali protitelesa proti trombocitom na posredni ali neposredni način pri 75% bolnikov, kar je podobno, kot so ugotovili Bellucci in sodelavci (8). Prisotnost protiteles proti trombocitom pri bolnikih z ITP so ugotovili pri 70–80% bolnikov. Vzrok za razlike med rezultati je tudi uporaba različnih načinov določanja. Z razliko od drugih avtorjev (3, 4, 8) smo pri določanju protiteles proti trombocitom uporabili le Fab del molekule imunoglobulina, kar zagotavlja le specifično vezavo. Zato so še vedno v glavnem primerljivi med seboj le izsledki, ugotovljeni v istem laboratoriju.

Način določanja s pretočnim citometrom, ki se vse pogosteje uporablja, je predvsem natančnejši in hitrejši od drugih načinov, predvsem pa nam omogoča določiti protitelesa na trombocitih tudi pri bolnikih s hudo trombocitopenijo in zelo zmanjšanim številom trombocitov v krvi. Pri določanju protiteles proti trombocitom moramo upoštevati, da se protitelesa proti trombocitom pri nekaterih boleznih pojavljajo ciklično (6) in da lahko izginejo že nekaj ur po zdravljenju z glukokortikoidi (7).

Določanje protiteles proti trombocitom je v pomoč pri razločevanju imunskih trombocitopenij od neimunskih, ki so posledica zmanjšane nastajanja ali zvečanega porabljanja trombocitov. Kljub temu, da so pri večini bolnikov z ITP prisotna protitelesa proti trombocitom, pa ostajata citološki pregled kostnega mozga in ocena števila megakariocitov osnovna preiskava za potrditev ITP.

Literatura

1. Finley PR, Fletcher C. Laboratory tests in immune thrombocytopenia. *J Med Technol* 1984; 1: 709–15.
2. He R, Reid D, Jones CE, Shulman NR. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1994; 83: 1024–32.
3. Marti GE, Magruder L, Schuette WE, Galnick HR. Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. *Cytometry* 1988; 9: 448–55.
4. Finley PR, Fletcher C, Williams JR. Flow cytometry analysis of platelet antibodies. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1988; 2: 249–55.
5. Kokava T, Nomura S, Yanabu M, Yasunaga K. Detection of platelet antigen for antiplatelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura by flow cytometry, antigen-capture ELISA, and immunoblotting: a comparative study. *Eur J Haematol* 1993; 50: 74–80.
6. Yanabu M, Nomura S, Fukuroi T et al. Periodic production of antiplatelet autoantibody direct against GPIIIa in Cyclic Thrombocytopenia. *Acta Haematol* 1993; 89: 155–59.
7. Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. Clinical flow cytometry. In: Ault KA. Flow cytometric analysis of platelets. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993; 387–403.
8. Bellucci S, Han ZC, Caen JP. Studies in vitro megakaryocytopoiesi in adult immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Eur J Haematol* 1991; 47: 86–90.

Kaj je LCAS?

LCAS - The Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study je prva angiografska raziskava narejena s fluvastatinom, ki je pokazala, da je za bolnike z blago do zmerno povečano koncentracijo holesterola in koronarno srčno boleznijo koristno, če se zdravijo s hipolipemikom. Ugotovili so, da zdravljenje s fluvastatinom pomembno upočasni napredovanje aterosklerotičnih sprememb na koronarnih arterijah.¹

"Do sedaj so bila mnenja strokovnjakov o agresivnem zdravljenju bolnikov z blago do zmerno povečano koncentracijo holesterola deljena. Vendar je tudi blago ali zmerno povečana koncentracija holesterola previsoka za bolnika, pri katerem se razvije koronarna srčna bolezen."

*Prof. dr. Antonio M. Gotto,
Cornell University, New York*

Fluvastatin je registriran v Sloveniji pod imenom LESCOL® in je razvrščen na pozitivno listo.
Na voljo je 28 kapsul po 20 mg in 40 mg.

LESCOL®

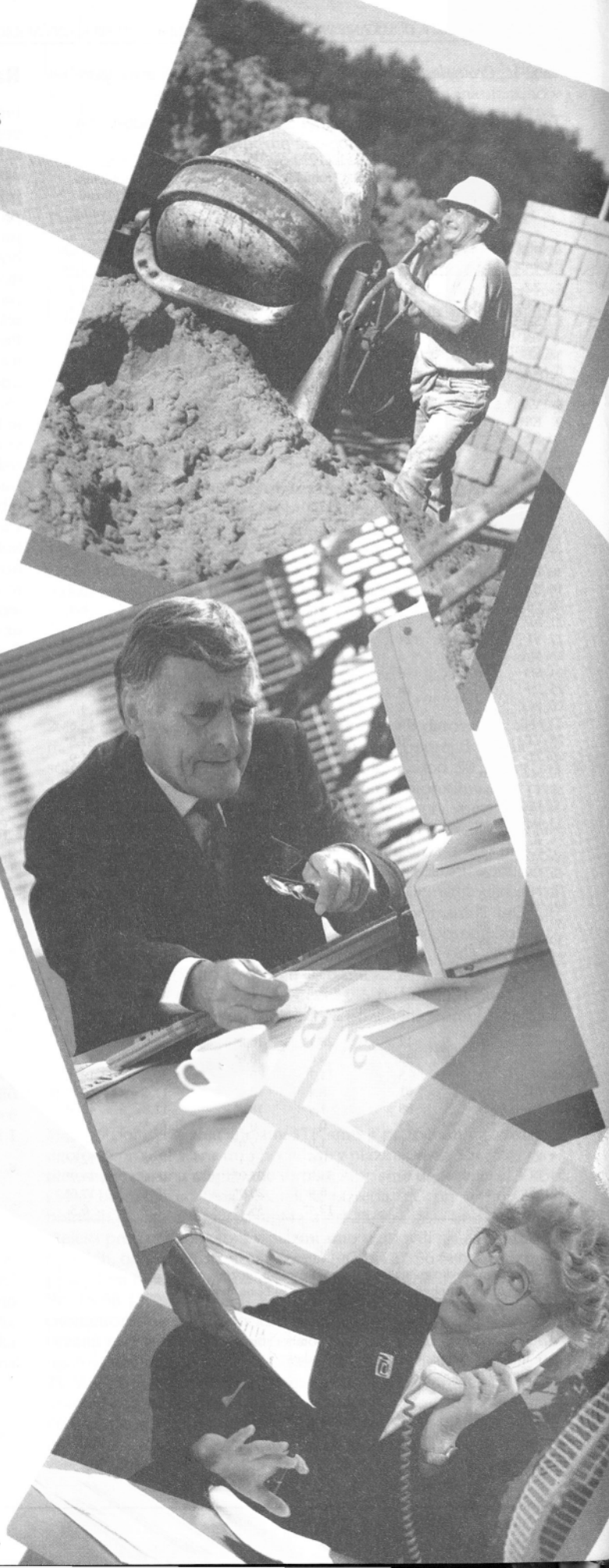
FLUVASTATIN

nadzorovano uravnavanje holesterola

1. Herd JA et al. Effects of Fluvastatin on Coronary Atherosclerosis in Patients With Mild to Moderate Cholesterol Elevations (Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study /LCAS). American Journal of Cardiology 1997; Vol. 80. No. 3: 278 - 286

 **NOVARTIS**

Informacije in literatura so na voljo pri Novartis Pharma Services Inc., Podružnica v Sloveniji, Dunajska 22, 1511 Ljubljana.



Strokovni prispevek/Professional article

ODNOS MED KONCENTRACIJO HEPARINA V PLAZMI IN MOTNJO V KOAGULACIJI: ZDRAVLJENJE S HEPARINOM MED HEMODIALIZO

RELATION BETWEEN PLASMA HEPARIN CONCENTRATION AND CLOTTING DISTURBANCE
DURING HEPARIN HEMODIALYSIS

Zora Čede¹, Dušan Andoljšek²

¹ Laboratorij za klinično biokemijo, Splošna bolnišnica Trbovlje, Rudarska 7, 1420 Trbovlje

² Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-04-03, sprejeto 1998-04-06; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-65-8

Gljučne besede: aktivirani parcialni trombotoplastinski čas; antitrombinski učinek heparina; hemodializa s heparinom

Izveček – Izhodišča. Ni znano, kateri od testov daje najboljšo informacijo o antikoagulacijskem učinku heparina. Zelo uporabljan je aktivirani parcialni trombotoplastinski čas (aPTČ). Hoteli smo ugotoviti, kakšen je odnos med koncentracijo heparina v plazmi in motnjo v koagulaciji, ocenjeno prek aPTČ. Za model smo imeli stacionarno stanje kronične ledvične odpovedi in heparinsko hemodializo (HD).

Bolniki in metode. HD so začeli s heparinom v bolusu (povprečno 30 i.e./kg telesne teže) in nadaljevali z infuzijo (povprečno 16,1 i.e./kg telesne teže/uro). Določili smo aPTČ, koncentracijo heparina in aktivnost antitrombina III (AT III) v poteku 22 epizod HD pri enajstih bolnikih s kronično ledvično odpovedjo. Za aPTČ smo rabili Pathromtin (Bebringwerke AG, Marburg, Nemčija). Koncentracijo heparina smo določili fotometrično s kromogenim substratom Berichrom Heparin (Bebringwerke AG) in s pomočjo umeritvene krivulje za različnimi koncentracijami heparina, aktivnost antitrombina III (AT III) s pomočjo Antitrombin III Reagent (Bebringwerke AG). Statistično pomembne so bile razlike, kjer je $p < 0,05$.

Rezultati. Koncentracija heparina v plazmi se ustali po 120. minuti po začetku zdravljenja, ko je doseženo stacionarno stanje. Zatem se koncentracija heparina ne spreminja pomembno. V začetku je učinek heparina, merjen prek aPTČ, nepredvidljiv. Po 120. minuti po začetku pa je bolj predvidljiv: za dodanih 0,10 i.e./ml heparina se aPTČ podaljša v povprečju za 21,5 s.

Zaključek. APTČ ni posebno primeren test za oceno antikoagulacijskega (antitrombinskega) učinka heparina v začetku zdravljenja, dokler ni doseženo stacionarno stanje. Šele potem aPTČ lahko rabimo za prilagajanje odmerka heparina za zdravljenje.

Uvod

Znano je, da lahko uporabljamo heparin za preprečevanje tromboze. Pri hemodializi z njim preprečimo strjevanje krvi v sistemu (1). Zaplet zdravljenja s heparinom so lahko krvavitve (2). Farmakološki učinek heparina spremljamo z enim od testov *ex vivo*, ki odrazijo antitrombinski učinek heparina. Še največ podat-

Key words: activated partial thrombotoplastin time; heparin antithrombin activity; heparin hemodialysis

Abstract – Background. There are several assays of heparin pharmacological effect but it is unknown which assay yields the best information with regard to anticoagulant effect. The commonly used is activated partial thrombotoplastin time (APTT). We used it to study patients with chronic renal insufficiency on hemodialysis with heparin and the relation between heparin concentration and its antithrombin effect.

Patients and methods. Hemodialysis (HD) was started with unfractionated heparin in bolus (mean 30 i.u./kg b.w.) and then followed by infusion (mean 16,1 i.u./kg b.w./hour). APTT, plasma heparin concentration and antithrombin activity (AT III) was measured in 22 episodes of heparin HD in 11 patients with chronic renal insufficiency. Pathromtin (Bebringwerke AG, Germany) was used for measurement of APTT, Antithrombin III Reagent (Bebringwerke AG, Germany) for antithrombin III activity, and Berichrom Heparin (Bebringwerke AG, Germany) for plasma heparin concentration. The latter was assessed photometrically, using chromogenic substrate and heparin dilution curve.

Results. Plasma heparin concentration becomes stable at 120. minutes of HD when steady state seems to be reached. After that there were no significant changes in plasma heparin concentration. Heparin antithrombin activity measured by APTT was unpredictable up to 120. minutes of HD. After that the heparin effect was more predictable: 0.10 i.u./ml prolongs APTT for approx. 21.5 s.

Conclusions. APTT does not seem to be a very suitable test for measuring the anticoagulant (antithrombin) effect of heparin until steady state is achieved. It is only from that time on that the APTT results can be used for adjusting heparin dosage.

kov in kliničnih izkušenj je za aktivirani parcialni trombotoplastinski čas (aPTČ) (3).

Želeli smo ugotoviti odnos med koncentracijo heparina v plazmi in njegovim antitrombinskim učinkom, merjenim prek aPTČ. Za raziskavo smo izbrali bolnike s kronično ledvično odpovedjo, ki so jih zdravili s kronično periodično hemodializo. Domnevali smo, da je farmakokinetika heparina v teh pogojih bolj enostavna kot pri zdravih.

Bolniki in metode

Preiskovance so zdravili s kronično periodično hemodializo v oddelku za dializo Splošne bolnišnice Trbovlje. Med enajstimi bolniki je bilo 5 moških in 6 žensk, starih 41–76 let (povprečna starost 57,3 let, mediana 58 let). V času raziskave je zdravljenje z dializo trajalo 24–172 mesecev. Niso dobivali zdravil in tudi niso imeli boleznih, ki bi vplivala na hemostazo.

V kontrolni skupini je bilo 32 oseb, 17 moških in 15 žensk, starih 31–61 let (povprečno 40,6 let, mediana 40 let), ki so bili povsem zdravi in seveda niso dobili heparina in nobenih zdravil.

Vse preiskovance smo seznanili z namenom raziskave in so nanjo pristali.

Hemodializni postopek je bil izpeljan vselej na enak način. Uporabili so kapilarni dializator s hemofansko membrano (0,9m², 6,5 µm), s polnilno prostornino 47 ml (Cobe Centrysystem Dialyzer 400 HG, Lakewood, Colorado, ZDA), PVC cevje in bikarbonatno raztopino (Lekodel K-1-G, Lekodel A-1, Lek, Ljubljana, Slovenija). Pred začetkom so dializator izprali z dvema litroma fiziološke raztopine brez heparina. Pretok dializne raztopine je bil 500 ml/min. Uporabili so monitor Gambro AK-100 (Gambro, Lund, Švedska) in vzdrževali stalen pretok krvi 300 ml/min. Bolniki so imeli arteriovenske fistule.

Začetni odmerek heparina v obliki natrijeve soli (Heparin Krka, Novo mesto, Slovenija), povprečno 30 i.e. (13,4–46,3) i.e./kg telesne teže, so dobili v bolusu, zatem pa v kontinuirani infuziji povprečno 16,1 (6,7–23,2) i.e./kg telesne teže/uro. Z infuzijo heparina so prenehali eno uro pred koncem dialize.

Pri vseh enajstih bolnikih smo napravili meritve med redno 4 urno dializo, dvakrat v razmaku 4 tednov. 4,5 ml krvi smo ujeli v epruveto (Becton Dickinson Vacutainer System Eur, Francija) z natrijevim citratom na odvzemnem mestu pred dializno črpalko v 60., 120., 180., 240. minuti.

Plazmo smo ločili od ostale krvi s centrifugiranjem (1500g, 10 minut). Aktivirani parcialni tromboplastinski čas (aPTČ) in aktivnost antitrombina III (AT III) smo določili takoj, koncentracijo heparina v plazmi pa naenkrat, ko smo zbrali polovico vseh vzorcev plazme, tj. v četrtem in osmem tednu raziskave. Vzorce plazme za določanje koncentracije heparina smo hranili pri –20°C. Za določanje aPTČ smo rabili reagent Pathromtin (Behringwerke AG, Marburg, Nemčija) in koagulometer Fibrintimer (isti proizvajalec). Upoštevali smo navodila proizvajalca. Območje normalnih vrednosti za aPTČ je 34,9 ± 5,7 (x ± 2SD).

Koncentracijo heparina v plazmi smo določili fotometrično s kromogenim substratom, z metodo dveh točk. Uporabili smo reagent Berichrom Heparin (Behringwerke AG, Marburg, Nemčija) in upoštevali navodila proizvajalca.

Koncentracijo heparina smo odčitali z umeritvene krivulje: heparin (Krka, Novo mesto, Slovenija) smo dodali plazmi tako, da je bila končna koncentracija 0,00–1,00 i.e./ml.

Koncentracija heparina v vzorcu je bila obratno sorazmerna povečanju absorbanca (1).

Območje normalnih vrednosti za koncentracijo heparina v plazmi je 0,00 ± 0,02 i.e./ml (x ± 2SD).

Aktivnost AT III v plazmi smo določili z Antithrombin Reagent (Behringwerke AG, Marburg, Nemčija) in z uporabo koagulometra Fibrintimer (isti proizvajalec), upoštevali smo navodila proizvajalca.

Območje normalnih vrednosti za AT III v plazmi je 96 ± 6% (x ± 2SD).

Pri analiznih postopkih za aPTČ, AT III in koncentracijo heparina smo uporabili testno kontrolno plazmo za normalno in patološko območje (Behringwerke AG, Marburg, Nemčija).

Statistično oceno podatkov smo napravili s pomočjo statističnega programa Statistica (Statsoft). Uporabili smo parametrične teste. Test razlik aritmetičnih sredin smo napravili z analizo variance, koeficient linearne korelacije smo izračunali po Pearsonu.

Izračunali smo tudi regresijsko premico. Za statistično pomembne smo šteli razlike, kjer je p < 0,05.

Rezultati

Aktivirani parcialni tromboplastinski čas (aPTČ) med hemodializo (tab. 1)

Tab. 1. Aktivirani parcialni tromboplastinski čas (aPTČ) (s) med hemodializo.

Tab. 1. Activated partial thromboplastin time (aPTT) (s) during hemodialysis.

aPTČ PTTK (s)	N	x	SD	SE
pred before HD	22	34,6	3,0	0,6
60 min.	22	230,5	254,7	54,3
120 min.	22	111,6	46,6	9,9
180 min.	22	109,9	42,3	9,05
po after HD	22	101,7	63,4	13,5

N – število meritev / number of tests

HD – hemodializa / hemodialysis

Pred hemodializo se vrednosti aPTČ bolnikov kot pri zdravih osebah (kontrolne skupine), pomembno pa so se razlikovale vrednosti pred potekom hemodialize in po njem.

V 60. minuti hemodialize je bil aPTČ najbolj podaljšan, podaljšanje je bilo glede na predializno vrednost 6,6-krat (x = 6,6, SD 7,2). Prav tako je bila tudi največji variacijski razmak (999 s – 41,5 s = 957,5 s).

V 120. in 180. minuti dialize je bil aPTČ manj podaljšan, zvečanje je bilo glede na predializne vrednosti za 3,3-krat (x = 3,2, SD 1,2 oz. 1,1).

Po hemodializi je bil aPTČ še vedno podaljšan, zvečanje je bilo glede na predializne vrednosti za 2,9-krat (x = 2,9, SD 1,6).

Koncentracija heparina med hemodializo (tab. 2)

Tab. 2. Koncentracija heparina v plazmi (i.e./ml) med hemodializo.

Tab. 2. Plasma heparin concentration (i.u./ml) during hemodialysis.

Heparin	N	x	SD	SE
pred before HD	22	0,01	0,02	0,00
60 min.	22	0,50	0,23	0,05
120 min.	22	0,44	0,17	0,04
180 min.	22	0,45	0,18	0,04
po after HD	22	0,45	0,19	0,04

N – število meritev / number of tests

HD – hemodializa / hemodialysis

Pred hemodializo so bile vrednosti heparina v plazmi kot pri zdravih osebah (kontrolne skupine), med zdravljenjem s heparinom pa so se vrednosti seveda pomembno razlikovale.

V 60. minuti hemodialize je bila koncentracija heparina v plazmi največja, prav tako pa tudi razlike med najmanjšo (0,06 i.e./ml) in največjo (0,95 i.e./ml) izmerjeno koncentracijo.

V 120. in 180. minuti je bila koncentracija heparina v plazmi pomembno manjša kot v 60. minuti. Tudi razpršenost vrednosti je bila manjša in vse izmerjene koncentracije heparina so bile manjše kot 0,8 i.e./ml.

Po hemodializi je bila koncentracija heparina v plazmi še vedno enako zvečana kot v 180. minuti.

Aktivnost antitrombina III (AT III) med hemodializo (tab. 3)

Predializne vrednosti aktivnosti AT III (x = 84,3%, SD 6,4%) bolnikov so bile v primerjavi z zdravimi (x = 95,6%, SD = 3,1%) pomembno manjše (p < 0,05).

Aktivnost antitrombina III se sicer med dializo ni pomembno spreminjala.

Tab. 3. *Aktivnost antitrombina III (AT III) v plazmi (%) med hemodializo.*

Tab. 3. *Plasma antitrombin III (AT III) (%) during hemodialysis.*

AT III	N	x	SD	SE
pred before HD	22	84,3	6,4	1,9
60.min.	22	83,9	15,5	4,7
120 min.	22	85,8	10,1	3,1
180 min.	22	88,5	7,5	2,3
po after HD	22	88,4	8,2	2,5

N – število meritev / number of tests

HD – hemodializa / hemodialysis

Odnos med aktiviranim parcialnim tromboplastinskim časom (aPTČ) in koncentracijo heparina v plazmi (tab. 4)

Tab. 4. *Odnos med aktiviranim parcialnim tromboplastinskim časom (aPTČ) in koncentracijo heparina med hemodializo.*

Tab. 4. *Correlation between activated partial thromboplastin time (aPTT) and plasma heparin concentration during hemodialysis.*

	r	SE	$y = \beta_0 + \beta_1 x$
pred before HD	-0,02	3,05	
60 min.	0,47	230,05	$y = 522,34x - 30,903$
120 min.	0,77	30,64	$y = 214,45x + 16,701$
180 min.	0,79	26,49	$y = 184,24x + 25,869$
po after HD	0,78	40,26	$y = 265,28x - 17,219$

r – koeficient korelacije (Pearson) / correlation coefficient (Pearson)

SE – standardna napaka / standard error

regresijska premica $y = aPTČ$ (s), $x =$ heparin (i.e./ml)

regression line $y = aPPT$ (s), $x =$ heparin (i.u./ml)

V 60. minuti hemodialize je povezanost med vrednostmi aPTČ in koncentracijami heparina v plazmi majhna, zatem pa se zvečuje. V 120. minuti hemodialize je povezanost razmeroma velika. V tem časovnem prerezu s povečanjem koncentracije heparina za 0,10 i.e/ml povzročimo v povprečju za 21,5 s daljši aPTČ. V 180. in 240. minuti (ob koncu) hemodialize je povezanost med obema spremenljivkama podobna.

Razpravljanje

V raziskavi smo zajeli 11 bolnikov oziroma 22 epizod 4-urne kronične hemodialize. Pri vseh bolnikih je zdravljenje trajalo že nekaj časa (24–172 mesecev), da lahko stanje bolnikov štejem za stacionarno.

Kontrolna skupina zdravih oseb je nekaj mlajša od bolnikov. Zdrave starostnike je za raziskavo težko najti. Znano je, da se aktivnost AT III z leti ne spreminja, na izid aPTČ pa vplivajo predvsem pogoji izvedbe testa.

V začetku so bolniki dobili heparin v bolusu in zatem v trajni infuziji. Odmerek zdravila so določili že ob poprejšnjih hemodializah, da ni prišlo do koagulacije krvi v sistemu. Heparin je bilo edino zdravilo, ki je vplivalo na hemostazo.

Aktivirani parcialni tromboplastinski čas (aPTČ) je najbolj pogosto uporabljana metoda za merjenje učinka heparina na koagulacijo krvi. Čas testa je tem daljši, čim večji je antitrombinski učinek heparina oziroma motnja v koagulaciji. Na izid testa lahko vplivajo številni dejavniki, npr. pomanjkanje enega ali več koagulacijskih faktorjev, prisotnost njihovih inhibitorjev, manjša koncentracija fibrinogena, trombocitni faktor 4 (5–7). Znano je, da vpliva na aPTČ uporabljeni laboratorijski reagent in drugi pogoji izvedbe testa, npr. različne koagulometre (8). Zaradi tega so podatki enega laboratorija z drugim težko primerljivi. Zaenkrat ni mednarodnega standarda za aPTČ kot je npr. za protrombinski čas. Zelo malo je bilo poskusov standardizacije testa (9, 10).

Proizvajalec reagenta, ki smo ga uporabili, priporoča, da napravimo test v dveh urah po odvzemu krvi. Ugotovili smo, da so se izidi

aPTČ heparinizirane plazme pomembno razlikovali, če smo napravili test takoj ali eno uro po odvzemu krvi. Pri aPTČ neheparinizirane plazme ni bilo takih razlik. To opazovanje nismo našli opisano. aPTČ smo določili takoj po odvzemu krvi.

Farmakološki učinek heparina lahko merimo na različne načine, npr. prek aPTČ, aktiviranega časa koagulacije, merjenja učinka na aktivirani faktor X in na trombin. Ni znano, kateri od laboratorijskih preskusov daje boljšo informacijo o ravni in antikoagulacijskem učinku heparina (3). Razen tega je heparin mešanica različnih molekul z različnimi farmakokinetičnimi lastnostmi (3).

Za merjenje koncentracije heparina smo uporabili metodo po Tieniu in sod. z uporabo kromogenega substrata (4). Z njo določimo koncentracijo heparina posredno prek inaktivacije aktiviranega faktorja X in s pomočjo umeritvene krivulje.

Antitrombin III smo določili prek aktivnosti encima in ne prek koncentracije beljakovine.

Raziskali smo odnos med učinkom heparina na koagulacijo in njegovo koncentracijo pri bolnikih med kronično periodično hemodializo, kjer so uporabili heparin. Bolnike smo preiskovali v stacionarnem stanju bolezn.

Domnevamo lahko, da pri teh bolnikih ni odstranjevanja heparina prek ledvic (16, 17).

Ugotovili smo, da se raven heparina v plazmi ustali 120 minut po odmerku heparina v bolusu in sočasnem začetku infuzije. 60 minut po začetku zdravljenja je koncentracija heparina pri posameznem bolniku zelo različna. Nismo je korigirali glede na začetni odmerek heparina (i.e./kg telesne teže). Vsekakor pa v tem časovnem preseku ni povezanosti med ravni heparina in njegovim učinkom, če ga merimo prek aPTČ. Domnevamo lahko, da je to posledica velike koncentracije heparina in razporeditve v obtoku in obenem vzpostavljanja ravnovesja v mehanizmu odstranjevanja heparina. Zmanjšanje učinka heparina na koagulacijo je prek dveh mehanizmov. Heparin se veže na proteine v plazmi, na endotelijske celice in monocite, izloča pa se prek ledvic (11–13). Hitro se zmanjšuje antitrombinski učinek heparina (inhibicija trombina), verjetno zaradi vezave večjih verig heparina na endotelijske celice in monocite. Z endocitozo in depolimerizacijo heparina nastajajo manjše verige z ohranjeno sposobnostjo za inhibicijo aktiviranega F X. Zato se po enkratnem dajanju nefrakcioniranega heparina sčasoma zvečuje odnos inhibicija F X : inhibicija trombina (14). Čas aPTČ se skrajšuje.

Po terapevtskih odmerkih heparina je antikoagulacijski (antitrombinski) učinek heparina nelinearen zaradi kombinacije mehanizmov odstranjevanja: saturacija, t.j. vezava na proteine in celice, je hitra, izločanje skozi ledvici je počasno. Zato z naraščanjem odmerka heparina ugotovimo neproporcionalnost antikoagulacijskega učinka in tudi njegovega trajanja (3, 15).

Po 120. minuti zdravljenja s heparinom se njegova raven ni pomembno spreminjala in v tem času je odnos med koncentracijo in učinkom heparina predvidljiv. Domnevamo lahko, da je v času stacionarnega stanja učinek heparina, merjen prek aPTČ, predvidljiv.

Aktivnost AT III se med hemodializo ni pomembno spreminjala, da bi s tem vplivala na izid aPTČ.

aPTČ je razmeroma neprimeren test za oceno antikoagulacijskega (antitrombinskega) učinka v začetnem obdobju zdravljenja s heparinom, dokler ni doseženo stacionarno stanje. Šele takrat vrednosti aPTČ lahko rabimo za prilagajanje terapevtskega odmerka heparina.

Literatura

- Keeler F, Seemann J, Preuschoff L, Offermann G. Risk factors for system clotting in heparin free hemodialysis. *Nephrol Dial Transpl* 1991; 5: 802–7.
- Schwartz RD. Haemorrhage during high-risk hemodialysis using controlled heparinisation. *Nephron* 1981; 28: 65–9.
- Fiore L, Deykin D. Anticoagulant therapy. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps Th J eds. *Williams Hematology*. 5th ed. New York: McGraw Hill, 1995: 1562–7.

4. Teien AN, Lie M, Abildgaard U. Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated factor X. *Thromb Res* 1976; 8: 413-6.
5. Hougie C. Partial thromboplastin time and activated thromboplastin time tests. In: Williams WJ, Beutler E, Ersler A, Lichtman M eds. *Hematology* 4th ed. New York: McGraw Hill, 1990: 1290-4.
6. Glynn MFX. Heparin monitoring and thrombosis. *Am J clin Path* 1979; 71: 377-400.
7. Levine SP, Sorenesen RR, Harris MA, Kniefiem LK. The effect of platelet factor 4 on assay of plasma heparin. *Br J Haemat* 1984; 57: 585-96.
8. Barrowcliffe TW, Gray E. Studies of phospholipid reagents in coagulation. II. Factors influencing their sensitivity to heparin. *Thromb Haemostas* 1981; 46 (2): 634.
9. Koepke JA. Partial thromboplastin time test - proposed performance guidelines. ICSH panel on the PTT. *Thromb Haemostas* 1986; 55: 143-4.
10. Ray M, Carroll P, Smith I, Hawson G. An attempt to standardise APTT reagents used to monitor heparin therapy. *Blood Coag Fibr* 1992; 3: 743-8.
11. Hiebert LM, Jacques CB. The observation of the heparin on endothelium after injection. *Thromb Res* 1976; 8: 195-204.
12. Friedman Y, Arsenis C. Studies on the heparin sulphamidase activity from rat spleen: intracellular distribution and characterization of the enzyme. *Biochem J* 1974; 139: 699-708.
13. Follea G, Laville M, Pozet N, Dechavanne M. Pharmacokinetic studies of standard heparin and low molecular heparin in patients with chronic renal failure. *Haemostas* 1986; 16: 147-51.
14. Barzu T, van Rijn JLML, Petitou M et al. Heparin degradation in the endothelial cells. *Thromb Res* 1987; 47: 601-9.
15. Ambrosioni E, Stocchi E. Pharmacokinetics of heparin and low molecular weight heparins. *Haemostas* 1990; 20 (1): 94-7.
16. Horry B, Cludet MH, Magnette J et al. Pharmacokinetics of very low molecular weight heparin in chronic renal failure. *Thromb Res* 1991; 63: 311-7.
17. Cadroy Y, Pourrat J, Baladre MF et al. Delayed elimination of enoxaparin in patients with chronic renal insufficiency. *Thromb Res* 1991; 63: 385-90.

Pregledni prispevek/Review article

KRONIČNA MIELOIČNA LEVKEMIJA IN MOLEKULARNO GENETIČNI NAČINI UGOTAVLJANJA BOLEZNI

CHRONIC MYELOID LEUKAEMIA AND RESPONDENT MOLECULAR DIAGNOSTIC METHODS

Tadej Pajič^{1,2}, Peter Černelč¹

¹ Hematološka klinika, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

² Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

Prispelo 1998-04-07, sprejeto 1998-04-16; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: I-69-72

Ključne besede: kronična mieloična levkemija; kromosom Philadelphia; molekularno genetične metode; hibridizacija po Southern; reverzno transkripcijska – verižna reakcija polimerizacije

Izvleček – Kronična mieloična levkemija (KML) je klonska mieloproliferativna bolezen, ki nastane z neoplastično preobrazbo matičnih krvotvornih celic. Kromosom Philadelphia je prva opisana kromosomska nepravilnost, ki so jo leta 1960 ugotovili pri KML. Ta skrajšani kromosom 22 nastane z recipročno translokacijo med končnim segmentom 34 dolgega kraka (q) kromosoma 9 in segmentom q11, kromosoma 22 (t(9;22) (q34;q11)). Prelomno mesto je na kromosomu 9 znotraj proto-onkogene ABL, na kromosomu 22 pa znotraj gena BCR. Posledica translokacije t(9;22) (q34;q11) je tvorba hibridnega gena BCR-ABL na Ph kromosomu in gena ABL-BCR na 9q+ kromosomu. Hibridni gen BCR-ABL označuje bimerični protein z molekularno maso 210 kd (p210BCR/ABL), ki ga povezujejo z nekontrolirano proliferacijo levkemičnih celic pri KML. Vloga gena ABL-BCR pri KML ostaja nejasna. Za veliko večino bolnikov s KML je kromosom Philadelphia specifični označevalec neoplastičnega klona, ki ga ugotavljamo z različnimi metodami. Ob standardnih citogenetičnih metodah se pri ugotavljanju bolezni in spremljanju minimalnega preostalega klona levkemičnih celic po zdravljenju uporabljajo tudi zelo občutljive in specifične molekularno genetične metode kot sta hibridizacija po Southern in reverzno transkripcijska verižna reakcija polimerizacije. Z metodo hibridizacije po Southern je mogoče ugotoviti več kot 95% kromosom Ph pozitivnih in tudi velik del kromosom Ph negativnih bolnikov s KML. Reverzno transkripcijska verižna reakcija polimerizacije je izmed vseh najbolj občutljivejša metoda in je najprimernejša za spremljanje bolnikov s KML v popolni citogenetični remisiji po zdravljenju.

Key words: chronic myeloid leukaemia; Philadelphia chromosome; molecular diagnostic methods; Southern blotting; reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR)

Abstract – Chronic myeloid leukaemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder resulting from the neoplastic transformation of the primitive hemopoietic stem cell. The Philadelphia chromosome (Ph chromosome) was the first described consistent chromosome aberration identified in CML in 1960. This shortness chromosome 22 is a product of a reciprocal translocation involving the long arm (q) of chromosome 9, band 34, and band q11 of chromosome 22, t(9;22) (q34;q11). Molecular analysis has localized the breakpoint on chromosome 9 to proto-oncogene ABL, and the breakpoint on chromosome 22 to BCR gene. The t(9;22) (q34;q11) results in the formation of two hybrid genes, BCR-ABL on the Ph chromosome and ABL-BCR on 9q+. The hybrid BCR-ABL gene encodes a chimeric protein with a molecular weight of 210 kd (p210BCR/ABL) which is associated with the uncontrolled proliferation of the leukaemic cells in the CML. The role of the ABL-BCR fusion gene remains unknown. For the great majority of patients with CML, the Ph chromosome is a specific marker of the malignant clone that can be detected by different methods. The standard cytogenetic and also sensitive and specific molecular methods like Southern blotting and reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) can be used in the diagnosis and follow-up of the minimal residual disease in the CML patients. Using Southern blotting, a rearrangement is detectable in more than 95% of Ph-positive cases and also in a significant proportion of Ph-negative cases. RT-PCR is by far the most sensitive assay and is most appropriate for monitoring patients who are in complete cytogenetic remission.

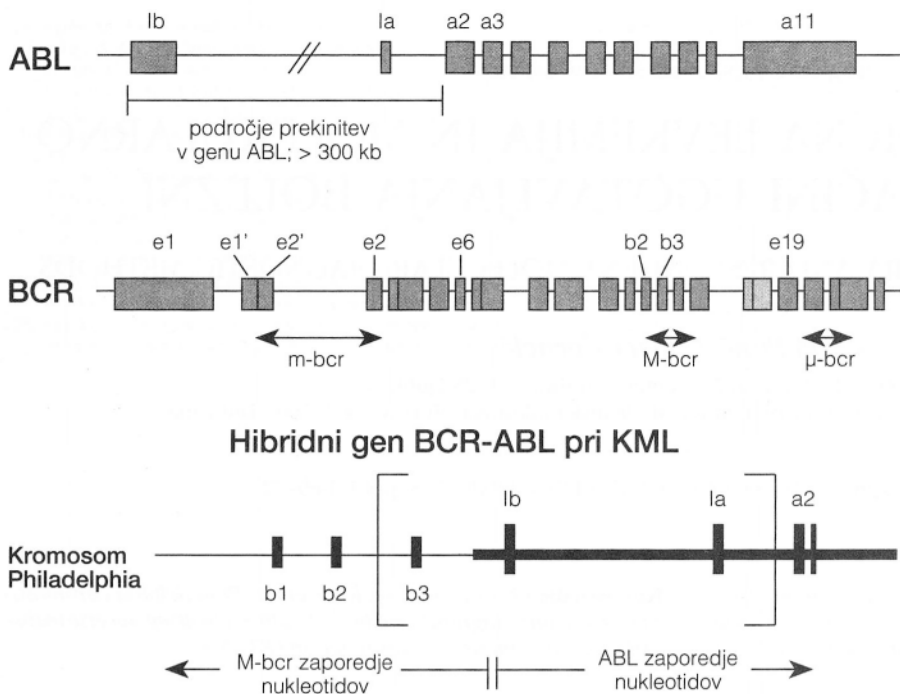
Uvod

Kronična mieloična levkemija (KML) je klonska mieloproliferativna bolezen, ki nastane s trajno preobrazbo matičnih krvotvornih celic. Ta prizadene mieloične, monocitne, eritroidne, megakariocitne, celično vrsto B in včasih tudi celično vrsto T. Zanj je značilna strukturna kromosomska nepravilnost, recipročna translokacija (1, 2), ki vodi do nastanka t.i. kromosoma Philadelphia (t(9;22)(q34;q11)). Kromosom Philadelphia (kromosom Ph) je značilen za 90% do 95% bolnikov s KML, 2–5% otrok z akutno limfoblastno levkemijo (ALL), 10–20% odraslih bolnikov z ALL, medtem ko se pri bolnikih z akutno mieloblastno levkemijo (AML) in malignimi limfomi redko pojavi (3). Etiologija KML ni znana. Lah-

ko nastane po obsevanju z ionizirajočimi žarki. Preživeli v atomski nesreči v Hirošimi in Nagasakiju so imeli znatno večjo pogostnost za KML (2). Bolezen poteka v dveh ali treh obdobjih. Začetno kronično obdobje navadno vodi preko vmesnega oziroma pospešenega poteka bolezni do blastne preobrazbe. Bolezen se lahko izjemoma pojavi z blastno preobrazbo že ob ugotovitvi bolezni (1).

Molekularne spremembe pri KML

Kromosom Philadelphia je prva opisana kromosomska nepravilnost, ki so jo leta 1960 ugotovili pri KML (4). Sprva so mislili, da



Sl. 1. Prikaz prekinitev v genu ABL in BCR pri recipročni translokaciji $t(9;22)(q34;q11)$ in kromosoma Philadelphia pri KML. Okvirji prikazujejo eksone, povezovalne črte pa introne. Z vodoravnimi dvoglavimi puščicami so prikazana večja (major-bcr; M-bcr), manjša (minor-bcr; m-bcr) in mikro (micro-bcr; μ-bcr) prekinitvena področja (breakpoint cluster region) v genu BCR.

Fig 1. Schematic representation of the ABL and the BCR genes with breakpoint locations in reciprocal translocation $t(9;22)(q34;q11)$ and the Philadelphia chromosome associated with CML. Exons are represented by boxes and introns by connecting horizontal lines. Major (M-bcr), minor (m-bcr) and mikro (micro-bcr; μ-bcr) breakpoint cluster regions in BCR gene are illustrated by double-headed horizontal arrows.

gre za delecijo kromosomov, vendar so leta 1973 z izboljšanimi načini proganja ugotovili (5), da skrajšani kromosom 22 nastane kot posledica recipročne translokacije med dolgim krakom (q) kromosoma 9, v predelu končnega segmenta 34, in segmentom q11, kromosoma 22 ($t(9;22)(q34;q11)$). Prelomno mesto se na kromosomu 9 nahaja znotraj proto-onkogene ABL, na kromosomu 22 pa znotraj BCR gena. Nukleotidno zaporedje obeh genov je znano (7). Posledica translokacije ni samo tvorba hibridnega gena BCR-ABL na kromosomu Ph ampak tudi hibridni gen ABL-BCR na kromosomu 9q+, ki so ga ugotovili pri približno dveh tretjinah bolnikov s KML. Vloga tega transkripcijsko aktivnega gena pri KML ostaja nejasna (3). Velikost proteina, ki ga označuje hibridni gen BCR-ABL preko himerične prenašalne RNA (messenger RNA; mRNA), se spreminja zaradi različnih prelomnih mest znotraj gena BCR na kromosomu 22, ki vsebuje 23 eksonov. Do danes so ugotovili tri področja prelomnih mest (breakpoint cluster region; bcr) na genu BCR: večje (major-bcr; M-bcr), manjše (minor-bcr; m-bcr) in mikro (micro-bcr; μ-bcr), ki se zelo redko pojavi (6). Pri KML se velika večina prelomov pojavi znotraj večjega področja (M-bcr). To področje je dolgo 5,8-kilobaznih parov (kb) in vsebuje pet eksonov, označenih z 12 do 16. Vendar jih danes največkrat označujemo na star način z b1 do b5. Cepitev nastane (8) znotraj intronskega zaporedja med eksoni b3 in b4 ali med b2 in b3 BCR gena (sl. 1).

Gen ABL vsebuje dva alternativna prva eksone 1b in 1a ter 10 dodatnih eksonov (sl. 1). Prelom lahko nastane znotraj več kot 300 kb dolgega področja od 5' konca do eksone 2 v genu (9). Nastaneta lahko različna hibridna gena (sl. 1), ki združujeta ekson a2 gena ABL z eksonom b2 (b2a2) ali eksonom b3 (b3a2) gena BCR (10). Čeprav nastala hibridna gena lahko vključujeta eksone

ABL 1a in 1b, pa iz njih prepisana mRNA vsebuje le stičišče eksonov b2a2 ali b3a2. Hibridni molekuli BCR-ABL mRNA označujeta himerični protein, molekularne mase 210 kD ($p210^{BCR/ABL}$). Ta protein ima večjo tirozin kinazno aktivnost kot protein, ki ga označuje normalni gen ABL. Molekularna masa slednjega je 145 kD (2). Za himerični protein $p210^{BCR/ABL}$ se predvideva, da ima onkogeno aktivnost. Menijo, da je odgovoren za nekontrolirano proliferacijo levkemičnih celic, kar so potrdili s preizkusi *in vitro* in *in vivo* pri miših (11–13).

Manjše prelomno področje (m-bcr) je sodeloženo pri nastanku kromosoma Ph pri dveh tretjinah bolnikov s kromosom Ph pozitivno ALL in le redko pri KML. Cepitveno mesto se nahaja znotraj intronskega zaporedja med dvema alternativnima eksonoma e2' in e2 (sl. 1). Nastane hibridni gen BCR-ABL, brez dveh eksonov e1' in e2', ki se prepiše v 7,5-kb velik transkript BCR-ABL, ki vsebuje stičišče eksone e1a2. Pri translaciji nastane 190 ali 185 kD velik protein BCR-ABL ($p190^{BCR/ABL}$), ki se redko pojavlja primarno pri KML (3, 14). Ta protein ima približno petkrat večjo tirozin kinazno aktivnost kot $p210^{BCR/ABL}$ in ga zato pogosteje povezujejo z akutno kot s kronično mieloično levkemijo (15). Protein $p230^{BCR/ABL}$ se zelo redko pojavlja pri Ph pozitivnih levkemijah in je posledica prekinitev v mikro področju gena BCR. Tako kot prejšnja proteina ima tudi ta tirozin kinazno aktivnost (16).

Opisani so bili še redki primeri KML, pri katerih je bilo prekinitveno mesto v genu BCR zunaj običajnih treh področij ali pa je

šlo za nenavadne prekinitev znotraj gena ABL. Slednje je privedlo do transkriptov BCR-ABL s stičiščem med eksoni b2a3 ali b3a3. Opaženi so bili tudi nepravilno združeni transkripti, ki so vsebovali spremenljivo dolžino vgrajenega intronskega zaporedja (3). Ph-negativna KML obsega primere, pri katerih se lahko z molekularnimi metodami ugotovi značilen gen BCR-ABL. Drugi bolniki so BCR-ABL negativni in imajo običajno drugačno obliko bolezni (3).

Dodatne kromosomske nepravilnosti so značilne za pospešeni potek bolezni. Najpogostejši so pojavi dodatnega kromosoma Ph, trisomija 8 in izokromosom 17q. Te spremembe pa niso tako stalne kot je primarna translokacija $t(9;22)$ (2). Kljub novim znanjem pa vzroki za napredovanje bolezni ostajajo neznani (6).

Molekularno genetične metode za ugotavljanje in spremljanje KML

Za velik del bolnikov s KML je kromosom Ph specifični označevalec malignega kлона. Običajna metoda za ugotavljanje bolezni in za ugotavljanje kakovosti remisije bolnikov po zdravljenju je citogenetična analiza metafaz v celicah kostnega mozga (17). Hibridizacija po Southernu analizira genomsko DNA in določi, če je gen BCR preurejen. Reakcijo, pri kateri iz specifične mRNA z nasprotnim prepisovanjem dobimo komplementarno DNA (complementary DNA; cDNA) in naprej DNA z verižno reakcijo polimerizacije, imenujemo angleško reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR). S to reakcijo lahko določimo prisotnost ali odsotnost transkripta BCR-ABL. S hibridizacijo Western analiziramo lizirane celice in določamo prisotnost ali odsotnost proteina

BCR-ABL. Pri fluorescenčno *in situ* hibridizaciji (FISH) pa z uporabo barvno označenih delcev DNA za BCR in ABL nukleotidna zaporedja gena ugotavljamo hibridni gen BCR-ABL na interfaznih in/ali metafaznih kromosomih v celicah (18).

Ugotavljanje minimalnega preostalega kлона levkemičnih celic

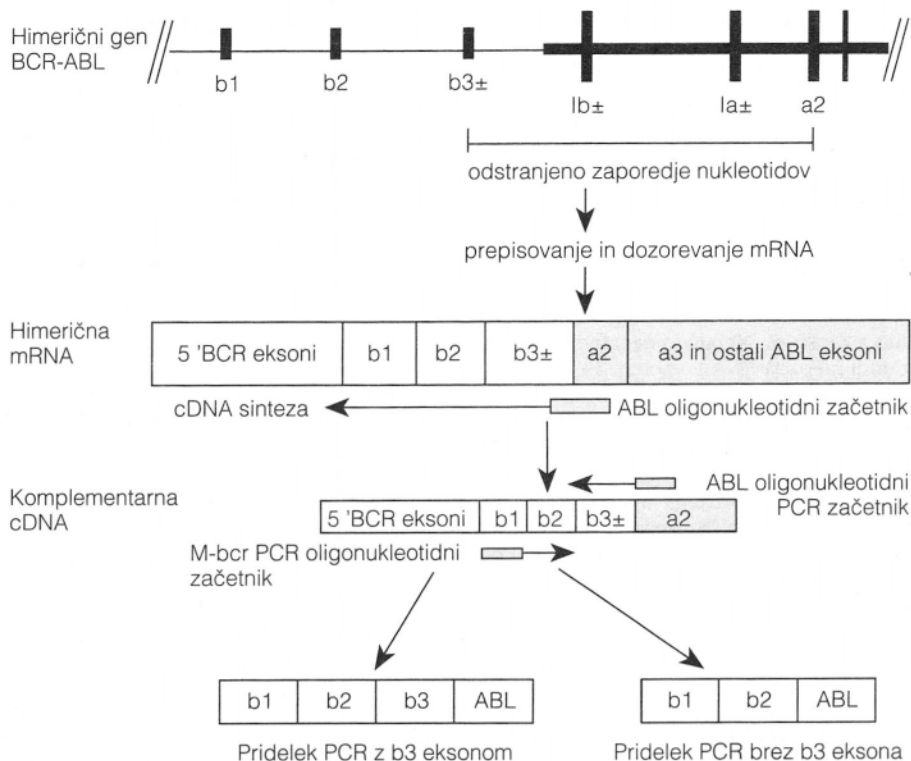
V zadnjem času potekajo številne raziskave za ugotavljanje minimalnega preostalega kлона levkemičnih celic (minimal residual disease) pri bolnikih s KML po zdravljenju (19, 20). Ob ugotovitvi bolezni ali pri ponovitvi imajo bolniki s KML navadno več kot 10^{12} malignih celic. V remisiji pa je od 0 pa do največ 10^{10} levkemičnih celic (citogenetika, hibridizacija po Southernu, hibridizacija Western). RT-PCR je do zdaj najbolj občutljiva metoda, ker lahko zazna eno samo maligno, pozitivno celico BCR-ABL med 10^5 do 10^6 normalnimi celicami. Vendar lahko tudi pri BCR-ABL RT-PCR negativnih bolnikih preostanek malignih celic, ki jih metoda ni zaznala, povzroči povrnitev bolezni. Pomen ugotavljanja minimalnega preostalega kлона levkemičnih celic je omogočiti ustrežnejšo oceno uspeha zdravljenja, oceniti verjetnost ponovitve bolezni in izbrati najprimernejši način zdravljenja. Pri KML to lahko pomeni odločitev o presaditvi kostnega mozga (18).

Hibridizacija po Southernu

Ta analiza temelji na ugotovitvi, da se cepitveno mesto znotraj gena BCR navadno pojavi v zelo omejenem predelu, tj. 5,8 kb velikem glavnem področju (M-bcr) gena BCR (sl. 1). Genomsko DNA cepimo z do tremi restrikcijskimi encimi. Nato jo ločimo na agaroznem gelu in prenesemo na trdno podlago. Sledi hibridizacija z enim ali dvema kratkima označenima delcema DNA (DNA sondama) iz M-bcr področja (18, 21). Z avtoradiografijo prikažemo madež, ki ustreza nespremenjenemu alelu BCR. Pri bolnikih s KML sta lahko prisotna eden ali dva dodatna madeža. Ta ustrezata preureditvi BCR-ABL na kromosomu Ph in/ali recipročni preureditvi na 9q+ kromosomu. Na ta način je mogoče zajeti več kot 95% Ph pozitivnih bolnikov in tudi znatni del Ph-negativnih bolnikov s KML (18, 22). V redkih primerih je ta analiza negativna zaradi cepitvenega mesta zunaj omenjenega področja ali mutacije prizadetega alela BCR (18). Z denzitometričnim merjenjem avtoradiografskega signala lahko ocenimo delež celic s preureditvijo BCR. To naredimo tako, da izračunamo količnik, ki je opredeljen kot 2-krat preurejen signal deljen s seštevkom preurejenega in normalnega signala. Molekularne spremembe po zdravljenju na osnovi razmerja BCR se znatno razlikujejo od opredeljenih citogenetičnih (19, 23). Na osnovi izkustvenih povezav med citogenetičnimi spremembami in zdravljenjem lahko predvidimo uspeh zdravljenja (19). Za analize se uporablja periferna venska kri, saj je spremenjen klon celic v periferni krvi in kostnem mozgu (18).

Verižna reakcija pomnoževanja DNA

Verižna reakcija polimerizacije omogoča hitro in specifično pomnoževanje določenega segmenta genske DNA *in vitro* s po-



Sl. 2. Določanje himerične BCR-ABL mRNA s pomočjo reverzno transkripcijske – verižne reakcije polimerizacije. Okvirji na himeričnem genu BCR-ABL prikazujejo eksone. Ekson b3± označuje njegovo spremenljivo prisotnost v himeričnem genu in transkriptu mRNA.

Fig 2. Detection of the BCR-ABL chimeric mRNA by the RT-PCR. Boxes on the chimeric BCR-ABL gene denote exons. Exon b3± denotes the variable presence of this exon in the chimeric gene and mRNA transcript.

močjo termostabilne polimeraze DNA in ustreznih oligonukleotidnih začetnikov. Nukleotidno zaporedje le-teh se prilega na 5' konec vsake od verig tarčne DNA, med katerima je del DNA, ki se pomnožuje.

Pri KML so cepitvena mesta za t(9,22), še posebej znotraj gena ABL, široko razpršena, zato ne omogočajo uporabiti preposto analizo PCR na osnovi genske DNA. Za ugotavljanje se uporablja himerična specifična mRNA, značilna za KML. Ta se najprej prepiše v komplementarno DNA z uporabo naključnih ali specifičnih oligonukleotidov ABL in encimov, ki omogočajo tak prepis. Komplementarna DNA je osnova za verižno reakcijo polimerizacije s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov (sl. 2), ki se prilegajo v M-bcr (ekson 1 ali 2) in področju ABL (ekson 2 ali 3) (21).

Z agarozno ali poliakrilamidno gelsko elektroforezo določimo velikost pomnožene DNA iz himeričnega gena. Pri veliki večini bolnikov s KML sta možna dva različno velika pridelka verižne reakcije polimerizacije (b3a2, b2a2), ki se razlikujeta za 75 bp. Ta dolžina predstavlja M-bcr ekson 3 (sl. 2). Redko sta pri istem bolniku prisotna oba (21). S ponovnim pomnoževanjem v prvi reakciji dobljene DNA s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov, ki se prilegajo znotraj prej pomnoženega dela DNA, se poveča občutljivost reakcije. Ta metoda se imenuje 'nested PCR' in je posebej primerna za spremljanje bolezni bolnikov v remisiji bolezni (19). Občutljivost in specifičnost te reakcije se lahko še naprej poveča z različnimi hibridizacijskimi metodami kot je npr. metoda po Southernu ali kolorimetrična metoda (DNA Enzyme Immunoassay, DEIA), ki temelji na uporabi monoklonskih protiteles, ki specifično reagirajo z dvojno vijačno DNA, tj. hibridizirano DNA (24). Za diagnostične vzorce je bila predlagana tudi t.i. večkratna verižna reakcija polimerizacije (multiplex PCR). Pri tej se sočasno določa več vrst transkriptov BCR-ABL in transkript BCR kot interna kon-

trola v eni sami reakciji (25). Ta metoda omogoča detekcijo tipičnih transkriptov BCR-ABL kot so b2a2 in b3a2, neznačilnih združitev kot npr. transkriptov brez eksona ABL 2 (b2a3 in b3a3) ali transkriptov, ki jih dobimo izven področja M-bcr, tj. e1a2 ali e6a2 (25, 26).

Izsledki preiskav v krvi in kostnem mozgu bolnika so podobni, tako da se za diagnostiko običajno uporablja periferna kri bolnikov (18). Metoda je hitra in daje rezultate že v 24 do 48 urah. Ima pa tudi nekatere pomankljivosti. Zaradi velike občutljivosti metode je večja nevarnost napačnih pozitivnih rezultatov. Zaradi tega je potrebno preprečiti kontaminacijo novih vzorcev z DNA iz prejšnjih reakcij in izvesti negativne in pozitivne kontrole istočasno z vzorcem. Napačno negativni rezultati se lahko pojavijo tudi zaradi razpada RNA v vzorcu. Ta možnost se izključi s pomnoževanjem kontrolnega zaporedja mRNA, ki nastane iz ABL ali nespremenjenega gena BCR. Neznačilna prelomna mesta tudi lahko vodijo do pojavnega napačno negativnih rezultatov (21).

Verižna reakcija polimerizacije je visoko občutljiva preiskava za ugotavljanje preostalega malignega kлона levkemičnih celic po presaditvi kostnega mozga in po terapiji z interferonom- α . Izsledki raziskav potrjujejo, da je bila večina bolnikov s KML prvih šest mesecev po presaditvi kostnega mozga PCR pozitivna, kar zmanjšuje prognozični pomen preiskave. Pozitivni izsledek PCR po več kot 6 mesecih po transplantaciji je lahko povezan z zvečano nevarnostjo ponovitve bolezni. Bolniki, z negativnim PCR rezultatom več kot eno leto po presaditvi kostnega mozga, imajo manjše tveganje za povrnitev bolezni. S to kvalitativno preiskavo pa ne moremo predvideti ponovitve bolezni pri posameznem bolniku. Znani so primeri, ki so ostali v klinični in citogenetični remisiji eno do dve leti po presaditvi kostnega mozga kljub pozitivnim rezultatom PCR (18, 19). Zato je bila razvita zahtevna kvantitativna metoda verižne reakcije polimerizacije za določanje ostanka transkriptov BCR-ABL, t.i. kompetitivna metoda PCR (competitive PCR). Standardiziran rezultat se izrazi kot razmerje BCR-ABL proti normalnemu transkriptu ABL (notranji standard) v odstotkih (19). Raziskave so potrdile, da se rezultati kvantitativnega PCR dobro ujemajo s citogenetičnim ugotavljanjem Ph kromosoma (27). Pri bolnikih po presaditvi kostnega mozga je naraščanje BCR-ABL mRNA najavilo ponovitev bolezni (28, 29). Po zdravljenju z IFN- α lahko dosežemo morfološko in citogenetično remisijo, vendar s PCR metodo prikažemo ostanek ali samo trenutno izgubo himerične mRNA (18, 19, 30). Bolnikom, katerim se znatno spreminja razmerje BCR-ABL/ABL ali BCR, je potrebno narediti citogenetične preiskave. S citogenetičnimi preiskavami lahko ugotovijo dodatne kromosomske nepravilnosti, ki so znak razraščanja malignega kлона celic že pred pojavom kliničnih znakov (19).

Zaključek

Odzivnost na zdravljenje KML je pomemben prognozični kazalec pri oceni napovedi poteka bolezni ter izbiri najustreznejšega načina zdravljenja. Še vedno ostaja vprašanje, kako najbolje spremljati odgovor bolnikov na zdravljenje. Molekularna določitev translokacije t(9;22) in poznavanje strukture hibridnih genov BCR-ABL sta omogočila ugotavljanje in spremljanje bolezni z molekularno genetičnimi metodami, kot je hibridizacija po Southernu, reverzno transkripcijska – verižna reakcija polimerizacije (RT-PCR), fluorescenčna hibridizacija *in situ* (FISH) in hibridizacija Western. Vse so pomembne dopolnilne preiskave, s katerimi lahko znatno izboljšamo oceno uspeha zdravljenja pri bolnikih s KML.

Literatura

- Rowley JD, Aster JC, Sklar J. The clinical applications of new DNA diagnostic technology on the management of cancer patients. *JAMA* 1993; 270: 2331–7.
- Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian H. Chronic myelogenous leukemia: a review. *The Am J Med* 1996; 100: 555–70.
- Melo JV. BCR-ABL gene variants. *Baillière's Clinical Haematology* 1997; 10: 203–22.
- Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132: 1497–7.
- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290–3.
- Groffen J, Heisterkamp N. The chimeric BCR-ABL gen. *Baillière's Clinical Haematology* 1997; 10: 187–201.
- Chissoe SJ, Bodenteich A, Wang Y-F et al. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 1995; 27: 67–82.
- Groffen J, Hermans A, Grosveld G et al. Molecular analysis of chromosome breakpoints. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 1989; 36: 281–300.
- Melo JV, Gordon DE, Cross NC and Goldman JM. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1993; 88: 158–65.
- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 1988; 319: 990–8.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{BCR/ABL} gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824–30.
- Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 1990; 344: 251–3.
- Gordon MY, Goldman JM. Cellular and molecular mechanisms in chronic myeloid leukaemia: biology and treatment. *Br J Haematol* 1996; 95: 10–20.
- Muller AJ, Young JC, Pendergast A-M et al. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1785–92.
- Clarkson B, and Strife A. Linkage of proliferative and maturational abnormalities in chronic myelogenous leukemia and relevance to treatment. *Leukemia* 1993; 7: 1683–721.
- Wada H, Mizutani S, Nishimura J et al. Establishment and molecular characterization of a novel leukemic cell line with Philadelphia chromosome expressing p230 BCR/ABL fusion protein. *Cancer Research* 1995; 55: 3192–6.
- Lion T, Bartram CR, Talpaz M et al. Debate round table. Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia: methodological approaches and clinical aspects. *Leukemia* 1996; 10: 896–906.
- Cross NCP. Assessing residual leukaemia. *Baillière's Clinical Haematology* 1997; 10: 389–403.
- Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Reichert A, Sauße S, Hehlmann R. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. *Recent Results in Cancer Research* 1998; 144: 36–45.
- The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1994; 330: 820–5.
- McClure JS, Litz CE. Chronic myelogenous leukemia: molecular diagnostic considerations. *Human Pathology* 1994; 25: 594–7.
- Reiter A, Skladny H, Hochhaus A et al. Quantitative Southern blot for monitoring CML patients on therapy. *Br J Haematol* 1997; 97: 86–93.
- Kantarjian HM, Smith TL, O'Brien S, Beran M, Pierce S, Talpaz M, and the Leukemia Service. Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon- α therapy. *Ann Intern Med* 1995; 122: 254–61.
- Magalini AR, Primi D, Albertini A, Capucci A, Rossi G, Mantero G. Detection of BCR/ABL transcripts in chronic myeloid leukaemia by polymerase chain reaction and DNA enzyme immunoassay: a DNA probe assay without DNA labelling. *Br J Haematol* 1993; 83: 334–9.
- Cross NCP, Melo JV, Goldman JM. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR/ABL fusion mRNAs in haematological disorders. *Leukemia* 1994; 8: 186–9.
- Hochhaus A, Reiter A, Skladny H et al. A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1996; 88: 2236–40.
- Hochhaus A, Lin F, Reiter A et al. Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon- α therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1996; 87: 1549–55.
- Lin F, Kirkland MA, van Rhee F et al. Molecular analysis of transient cytogenetic relapse after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 18: 1147–52.
- Lin F, van Rhee F, Goldman JM and Cross NCP. Kinetics of increasing BCR-ABL transcript numbers in chronic myeloid leukemia patients who relapse after bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 4473–8.
- Dhingra K, Kurzrock R, Kantarjian H et al. Minimal residual disease in interferon-treated chronic myelogenous leukemia: Results and pitfalls of analysis based on polymerase chain reaction. *Leukemia* 1992; 6: 754–60.

Strokovni prispevek/Professional article

SPREMEMBE ŠTEVILA IN PROSTORNINE TROMBOCITOV PRI IDIOPATIČNI TROMBOCITOPENIČNI PURPURI

PLATELET NUMBER AND VOLUME CHANGES IN IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

Mojca Tomažič¹, Dušan Andoljšek²¹ Splošna bolnišnica Novo mesto, radiološki oddelek, Šmihelska 1, 8000 Novo mesto² Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 1998-04-10, sprejeto 1998-04-14; ZDRAV VESTN 1998; 67: Suppl I: 1-73-6

Ključne besede: *povprečni volumen trombocitov; regulacija trombocitopoeze; ITP*

Key words: *mean platelet volume; regulation of thrombopoiesis; ITP*

Izvleček – Izhodišča. *Povprečna prostornina trombocitov (MPV) se v pogojih stresne trombocitopoeze lahko zveča. Pri idiopatični trombocitopenični purpuri (ITP) gre za spremenjene pogoje nastajanja trombocitov in bi motnja lahko vplivala na MPV. Če upoštevamo hipotezo o regulaciji trombocitopoeze prek vzdrževanja stalne količine (število × prostornina) trombocitov, potem je lahko odnos med številom trombocitov in MPV obranjen tudi pri ITP.*

Abstract – Background. *Mean platelet volume (MPV) is increased in stress thrombopoiesis. Conditions for platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) are changed and the same is true after treatment. These possibly could have influence on MPV. If we believe the hypothesis that platelet production is regulated to maintain a constant circulating platelet mass, there could be the correlation between platelet number and MPV in ITP.*

Metode. *Preiskali smo 29 zdravih krvodajalcev in 73 bolnikov z ITP (32 nezdravljenih, 25 zdravljenih z glukokortikosteroidi /GK, 16 po splenektomiji /SPL/). Število trombocitov in MPV smo določili s pomočjo števca Coulter STKS Systems. Vzorce krvi smo vzeli v epruveto s K-EDTA. Število trombocitov in MPV smo določili eno uro po odvzemu krvi.*

Methods. *29 healthy blood donors and 73 patients with ITP were examined. Blood samples with K-EDTA were analysed by cell counter Coulter STKS System for platelet number and MPV. Analyses were done one hour after venepuncture.*

Rezultati. *Ugotovili smo statistično pomembne razlike med MPV kontrolne skupine in MPV bolnikov z ITP. Razlike so največje pri bolnikih po splenektomiji, manjše pri nezdravljenih in zdravljenih z GK. Obstaja pomembna negativna povezanost med številom trombocitov in MPV pri zdravih in pri bolnikih po splenektomiji. Povezanosti ni pri zdravljenih z GK in nezdravljenih z ITP.*

Results. *There are statistically significant differences for MPV in ITP patients and controls. Differences are more pronounced after splenectomy and less in patient groups with no treatment or with corticosteroids. There is a negative correlation between platelet number and MPV in controls and splenectomy group of patients. No correlation was found in patient group with no treatment or with corticosteroids.*

Zaključki. *MPV je pri ITP zvečan, ni pa razlik med zdravljenjem na različen način. Ni mogoče oceniti, če stopnja motnje vpliva na MPV. Obstaja negativna povezanost med številom in MPV pri zdravih in bolnikih po splenektomiji. Povezanosti ni pri tistih, ki niso zdravljeni ali pa so zdravljeni z GK. Lahko, da je to posledica vpliva trombocitov, zadržanih v vranici. Če upoštevamo hipotezo o regulaciji trombocitopoeze prek količine trombocitov, je ta mehanizem obranjen pri ITP po splenektomiji.*

Conclusions. *MPV is increased in ITP. There is a significant negative correlation between platelet number and MPV in controls and splenectomy group of patients. No correlation was found for platelet number and MPV in corticosteroids and no treatment group of patients. Platelet pool in the spleen, which can not be assessed, probably influence the data for these patient groups. If we consider the hypothesis that platelet production is regulated to maintain a constant circulating platelet mass, than such a mechanism is operating in ITP after splenectomy.*

Uvod

Število trombocitov v krvi se spreminja in je pri zdravih osebah različno. Če sodimo samo po številu trombocitov, je kontrola nastajanja trombocitov zelo nenatančna. Ugotovili so, da je število v obratnem sorazmerju s povprečno prostornino trombocitov (MPV, mean platelet volume): osebe z majhnim številom imajo velike trombocite in obratno. Znano je tudi, da je količina trombocitov (število × prostornina, MPV) konstantna, da pa zakonitost ne velja v vsem območju razmeroma širokih meja normalnega (1–4). Vzrok je lahko nenatančna ocena količine trombocitov zaradi trombocitov v krvnem obtoku vranice (2).

Pri bolnikih s kronično idiopatično trombocitopenično purpuro in pri nekaterih podedovanih boleznih z majhnim številom trombocitov, npr. sindromu Bernard-Souliers so ugotovili zvečan MPV (5, 6). Če je pri zvečanem številu trombocitov tudi MPV zelo velik, gre verjetno za avtonomno produkcijo trombocitov, npr. pri mieloproliferativni bolezni (7).

Namen raziskave

Pri nastajanju trombocitov pod spremenjenimi pogoji (stresna trombocitopoeza) je povprečna prostornina trombocitov (MPV) lahko zvečana (5, 8).

Pri kronični idiopatični trombocitopenični purpuri (ITP) gre za nastajanje trombocitov pod spremenjenimi pogoji. Domnevamo, da bi motnja, grobo ocenjena prek števila trombocitov (večja stopnja motnje – manjše število), lahko vplivala na MPV.

Če upoštevamo hipotezo o regulaciji trombocitopoeze prek vzdrževanja stalne količine trombocitov, potem je odnos med številom trombocitov in MPV ohranjen lahko tudi pri ITP.

Bolniki in način dela

Ponovno smo pregledali 73 od 262 bolnikov z kronično idiopatično trombocitopenično purpuro (ITP), ki smo jih zdravili v Hematološki kliniki v Ljubljani v letih 1984 do 1994. Ostali, ki jih nismo mogli pregledati, so spremenili bivališče, umrli ali pa so javili, da se počutijo zdravi in se niso odzvali za pregled.

V kontrolni skupini je bilo 29 zdravih krvodajalcev (11 moških in 18 žensk), starih $36,8 \pm 8,2$ (22–49) let. Starosti obeh podskupin se nista pomembno razlikovali ($p = 0,03$).

Za vse pregledane bolnike smo imeli medicinsko dokumentacijo. Ugotovili smo način zdravljenja. Ponovno smo preverili, če gre za ITP.

Za ITP smo šteli bolnike 1. brez simptomov in znakov bolezni ali le s krvavitvami zaradi trombocitopenije, 2. brez zvečane vranice in jeter, 3. z izolirano trombocitopenijo ali trombocitopenijo in anemijo po krvavitvi, 4. s citološko normalnim kostnim mozgom in zvečanim številom megakariocitov, 5. bolniki niso jemali zdravil, niso imeli predhodne okužbe, sistemske in krvne bolezni (9). Po načinu zdravljenja smo bolnike z ITP razvrstili v tri skupine: brez zdravljenja (ITP-0) 32 bolnikov, zdravljeni z glukokortikosteroidi (ITP-GK) 25 bolnikov, zdravljeni z GK in zatem s splenektomijo (ITP-SPL) 16 bolnikov. V vseh treh skupinah je bilo več žensk kot moških, odnos je 1,2–4 : 1.

Starost skupin je bila tale:

ITP-0 $53,5 \pm 21,3$ (17–86) let,

ITP-GK $50,8 \pm 19,4$ (21–86) let,

ITP-SPL je bila $40,1 \pm 9,8$ (20–53) let.

Bolniki skupin ITP-0 in ITP-GK so bili starejši od kontrolne skupine ($p = 0,000$). Ti dve skupini bolnikov se med seboj sicer nista pomembno razlikovali po starosti ($p = 0,6$). Skupina ITP-SPL in kontrolna skupina se po starosti nista razlikovali ($p = 0,02$).

Po kliničnem pregledu smo vzeli 3 ml krvi v epruveto Vacutainer Hemogard s K-EDTA. Napravili smo krvno sliko, določili število trombocitov in povprečno prostornino trombocitov (MPV).

Krvno sliko, število trombocitov in MPV so določili s pomočjo števca Coulter STKS Systems, skladno z navodili proizvajalca aparata.

Referenčne vrednosti za število trombocitov in MPV najdemo v tabeli 1 in 2.

Pred začetkom statistične analize smo preskusili in ugotovili, da podatki kontrolne skupine za število trombocitov in MPV ustrezajo normalni porazdelitvi.

Statistično analizo smo napravili s programom Statistica. Uporabili smo parametrične in neparametrične teste. Koeficient korelacije smo izračunali po Pearsonu in Kendall Tau.

Sklepe smo sprejeli za manj kot 5% tveganjem ($p < 0,05$).

Rezultati

Število trombocitov kontrolne skupine in skupine bolnikov navajamo v tabeli 1.

Obstajajo statistično pomembne razlike števila trombocitov med kontrolno skupino in skupino ITP-0 ter ITP-GK ($p = 0,000$), med obema skupinama (ITP-0 in ITP-GK) pa so razlike majhne ($p = 0,19$).

Ni razlike med kontrolno skupino in ITP-SPL ($p = 0,44$).

Povprečno prostornino trombocitov (MPV) smo prikazali v tabeli 2.

Tab. 1. Število trombocitov kontrolne skupine in skupine bolnikov z ITP.

Tab. 1. Platelet number in control group and in ITP patients.

Skupina Group	Število trombocitov Platelet number ($X \pm s.d.$) $\times 10^9/L$
Kontrolna skupina Control group	227,0 \pm 43,50
ITP-0	91,0 \pm 37,8
ITP-GK	112,2 \pm 79,70
ITP-SPL	205,5 \pm 144,4

ITP – Idiopatična trombocitopenična purpura / Idiopathic thrombocytopenic purpura
ITP-0 – Bolniki z ITP brez zdravljenja / ITP patients without treatment
ITP-GK – Bolniki z ITP zdravljeni z glukokortikosteroidi / ITP patients treated with glucocorticosteroids
ITP-SPL – Bolniki z ITP po splenektomiji / ITP patients after splenectomy

Tab. 2. Povprečna prostornina trombocitov (MPV) kontrolne skupine in bolnikov z ITP.

Tab. 2. Mean platelet volume (MPV) in control group and in ITP patients.

Skupina Group	MPV ($X \pm s.d.$) $\times 10^9/L$
Kontrolna skupina Control group	8,8 \pm 1,1
ITP-0	9,9 \pm 1,2
ITP-GK	9,9 \pm 1,9
ITP-SPL	10,46 \pm 1,3

ITP – Idiopatična trombocitopenična purpura / Idiopathic thrombocytopenic purpura
ITP-0 – Bolniki z ITP brez zdravljenja / ITP patients without treatment
ITP-GK – Bolniki z ITP zdravljeni z glukokortikosteroidi / ITP patients treated with glucocorticosteroids
ITP-SPL – Bolniki z ITP po splenektomiji / ITP patients after splenectomy

Tab. 3. Odnos med številom in povprečno prostornino trombocitov (MPV).

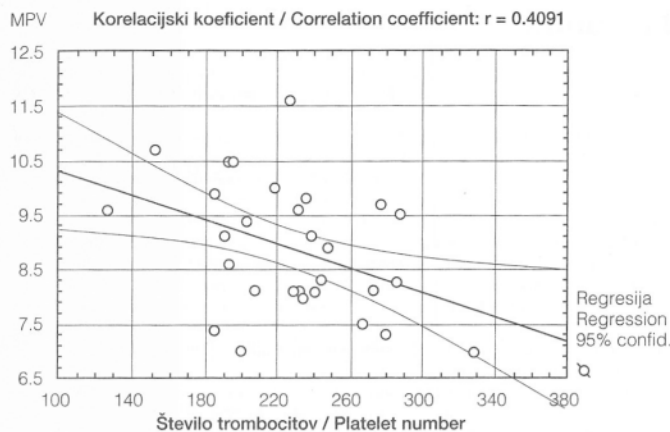
Tab. 3. Platelet number in correlation with mean platelet volume (MPV).

Skupina Group	Korelacijski koeficient (r) Correlation coefficient (r)
Število trombocitov pri kontrolni skupini Platelet number in control group	-4,41
Število trombocitov pri ITP vsi bolniki Platelet number in ITP patients	-0,14
Število trombocitov pri ITP-0 Platelet number in ITP-0	-0,25
Število trombocitov pri ITP-GK Platelet number in ITP-GK	-0,29
Število trombocitov pri ITP-SPL Platelet number in ITP-SPL	-0,66

ITP – Idiopatična trombocitopenična purpura / Idiopathic thrombocytopenic purpura
ITP-0 – Bolniki z ITP brez zdravljenja / ITP patients without treatment
ITP-GK – Bolniki z ITP zdravljeni z glukokortikosteroidi / ITP patients treated with glucocorticosteroids
ITP-SPL – Bolniki z ITP po splenektomiji / ITP patients after splenectomy

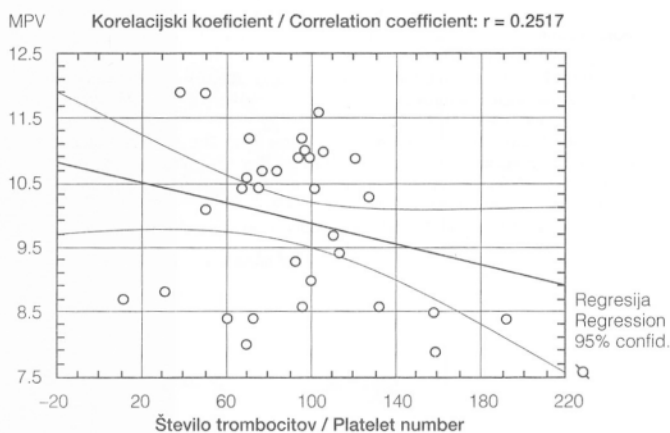
MPV kontrolne skupine in skupine ITP-0 ($p = 0,001$) ter kontrolne skupine in ITP-GK ($p = 0,022$) je statistično pomembno različen. Enako velja za MPV kontrolne skupine in skupine ITP-SPL ($p = 0,0003$). Ni razlik MPV, če primerjamo skupini ITP-0 in ITP-GK ($p = 0,95$), ITP-0 in ITP-SPL ($p = 0,19$).

Obstajajo torej statistično pomembne razlike med MPV kontrolne skupine in MPV bolnikov z ITP. Zdi se, da so razlike največje pri bolnikih z ITP po splenektomiji, manjše pa pri nezdravljenih in zdravljenih z glukokortikosteroidi.



Sl. 1. Odnos med številom ($X \times 10^9/L$) in povprečno prostornino trombocitov (MPV: fl) pri kontrolni skupini.

Fig. 1. Correlation between platelet number ($X \times 10^9/L$) and mean platelet volume (MPV: fl) in control group.



Sl. 1. Odnos med številom ($X \times 10^9/L$) in povprečno prostornino trombocitov (MPV: fl) pri OTP-0 (ITP brez zdravljenja).

Fig. 1. Correlation between platelet number ($X \times 10^9/L$) and mean platelet volume (MPV: fl) in ITP-0 (ITP without treatment).

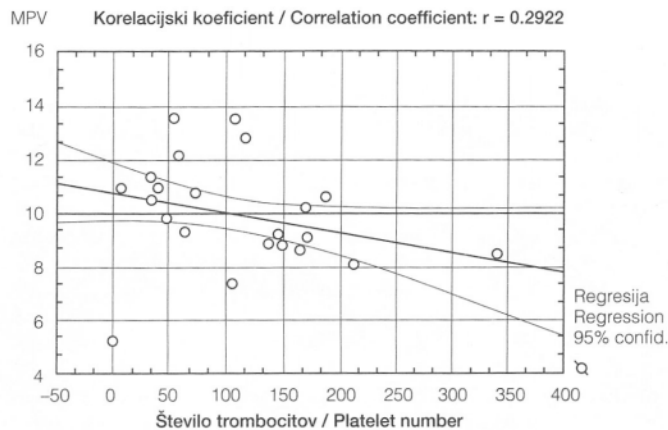
Povezanost med številom trombocitov in MPV je prikazana v tabeli 3, grafični prikaz za posamezne skupine bolnikov je na slikah 1, 2 in 3.

Obstaja pomembna negativna povezanost med številom trombocitov in MPV pri zdravih in bolnikih z ITP po splenektomiji. Te povezanosti ni pri bolnikih, ki jih nismo zdravili in pa pri tistih, ki smo jih zdravili z glukokortikosteroidi.

Razpravljanje

V raziskavi je bila pripravljena sodelovati le tretjina, ki smo jih pregledali ali zdravili zaradi kronične idiopatične trombocitopenične purpore (ITP) v obdobju desetih let. Večinoma se niso odzvali tisti, ki so imeli zmerno trombocitopenijo in je bila to naključna najdba, ko so napravili krvno sliko.

Skupini bolnikov ITP-0 (nezdravljeni) in ITP-GK (zdravljeni z glukokortikosteroidi), sta po starosti različni od kontrolne skupine, med seboj pa se ne razlikujeta. Skupina splenektomiranih (ITP-SPL) bolnikov se po starosti ne razlikuje od kontrolne skupine. Razlog za neuravnoteženost kontrolne in preiskovane skupine po starosti je dejstvo, da zdravih starostnikov za preiskavo praktično ni mogoče najti. To ne predstavlja vira napak, saj niso ugotovili pomembnih razlik v številu trombocitov pri odraslih osebah različnih starosti (10). Obstaja zelo široko območje normalnih



Sl. 3. Odnos med številom ($X \times 10^9/L$) in povprečno prostornino trombocitov (MPV: fl) pri ITP-GK (ITP zdravljena z glukokortikosteroidi).

Fig. 3. Correlation between platelet number ($X \times 10^9/L$) and mean platelet volume (MPV: fl) in ITP-GK (ITP treated with glucocorticosteroids)

vrednosti za število trombocitov. Vzrok za to so tudi izrazita sezonska nihanja števila trombocitov, z vrhom v obdobju december-februar (10). Preiskovanje bolnikov smo opravili v petih tednih, poleti.

Vzorec krvi smo vzeli v epruveti s K-EDTA. Znano je, da se MPV pod temi pogoji spreminja po odvzemu krvi. Ugotovili so, da so spremembe števila trombocitov in MPV nepomembne, če opravimo preiskavo eno uro po odvzemu krvi (11). Da bi se izognili temu viru napak, smo vzorce krvi pregledali eno uro po odvzemu.

Regulacija trombocitopoeze je malo poznana (1). Obstajajo razlike glede števila, velikosti, starosti in funkcije trombocitov v krvnem obtoku zdrave osebe (2). 1974 je O'Brien ugotovil, da je število trombocitov v obratnem sorazmerju z njihovo povprečno prostornino (3). Kasneje se je pokazalo, da je količina (število \times prostornina) trombocitov konstantna, da pa zakonitost ne velja v vsem območju širokih meja normalnega. Vzrok za to je lahko nenatančna ocena deleža trombocitov, ki so v krvnem obtoku vranice. Ti trombociti so tudi v povprečju večji (2, 4). Domnevamo lahko, da obstaja neka najmanjša prostornina trombocita, ki nastane pod fiziološki pogoji. Ko število trombocitov preseže $450 \times 10^9/L$, vzdrževanje konstantne količine ni več mogoče, pač pa le-ta narašča skupaj s številom trombocitov.

Verjetno sta število trombocitov in njihova povprečna prostornina določena pod fiziološkimi pogoji med njihovim nastajanjem (12). Ugotovili smo statistično pomembne razlike v številu trombocitov med zdravimi osebami in tistimi z ITP, ki jih nismo zdravili ali pa so bili dobili glukokortikosteroide. Ni pa bilo razlik v številu trombocitov pri zdravih osebah in splenektomiranih bolnikih. Delež trajnih izboljšanj ITP po splenektomiji je preko 90% (9, 15). Povprečna prostornina trombocitov (MPV) je pri bolnikih z ITP pomembno večja od zdravih. Zdi se, da so razlike največje pri zdravljenih z ITP po splenektomiji, manjše pri nezdravljenih in zdravljenih z glukokortikosteroidi.

Trombociti, ki nastajajo v pogojih spremenjene produkcije, imajo večji MPV (2). Ker so zvečanje MPV ugotovili tudi, če so poskusni živali odstranili vranico, domnevajo, da zvečanje ni posledica izplavljanja trombocitov iz vranice, v kateri so pretežno večji trombociti (2, 13).

Ker je skupina pregledanih po splenektomiji majhna, ni mogoče oceniti pomena ugotovitve, da je bil MPV največji ravno pri tej skupini. Po drugi strani pa seveda ugotovitve iz poskusov na živalih ni mogoče brez zadržkov prenesti na človeka.

Ugotovili smo negativno povezanost med številom trombocitov in MPV pri zdravih in bolnikih po splenektomiji. Če upoštevamo hipotezo o regulaciji nastajanja prek vzdrževanja stalne količine

trombocitov v krvnem obtoku, se zdi, da je ta ohranjena le pri ITP po splenektomiji.

Trombociti, ki nastanejo pod stresnimi pogoji, so večji od normalnih. Če v poskusu sprožimo imunsko trombocitopenijo, se MPV zveča že 8 ur po začetku poskusa, tj. 40 ur preden so opazne spremembe v dozorevanju megakariocitov. Verjetno nastanejo večji trombociti z demarkacijo robnega dela citoplazme megakariocitov in šele kasneje se zveča število na račun večjega nastajanja trombocitov iz posameznega megakariocita. Končno pa se po treh do šestih dneh zveča tudi število megakariocitov v kostnem mozgu (13, 14). ITP je kronična in ponavadi doživljenjska bolezen (2, 9, 15). Po mesecih ali letih trajanja se ne zdi verjetno, da bi nastajanje trombocitov teklo enako kot pri akutni trombocitopeniji, tj. pretežno z demarkacijo robnega dela citoplazme megakariocitov (2, 13). Po mnenju Najeana, Raina in Dufoura je veljavni koncept trombocitoeze zmoten. Ni je mogoče primerjati z eritropoezo, kjer je po kronični izgubi vedno zvečano nastajanje celic. Domnevno je nastajanje trombocitov pri ITP lahko normalno ali le malo zvečano. Avtorji so mnenja, da podrobnosti regulacije trombocitopoeze ne poznamo in da so dosedanja podatki nezadostni ali pa dvomljive vrednosti (16).

Zaključki

Nastajanje trombocitov pod spremenjenimi pogoji pri idiopatski trombocitopenični purpuri (ITP) vpliva na povprečno prostornino trombocitov (MPV).

MPV je zvečan pri vseh bolnikih z ITP, ne glede na zdravljenje. Ni mogoče oceniti, če stopnja motnje vpliva na MPV.

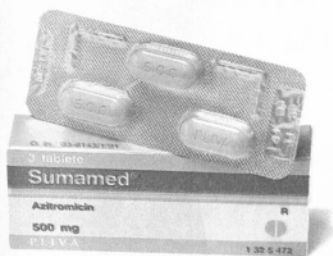
Obstaja negativna povezanost med številom trombocitov in MPV pri zdravih in tudi pri bolnikih z ITP po splenektomiji. Te povezanosti nismo dokazali pri ostalih bolnikih z ITP. Lahko, da je to zaradi vpliva v vranici zadržanih trombocitov.

Če upoštevamo hipotezo o regulaciji trombocitopoeze prek količine (število \times prostornina) trombocitov, domnevamo, da je mehanizem regulacije ohranjen pri ITP po splenektomiji.

Literatura

1. Burnstein SA, Breton-Gorius J. Megakaryopoiesis and platelet formation. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps Th J. Williams Hematology. 5th ed. New York: McGraw Hill, 1995: 1149-16.
2. Thompson CB, Jakubowski JA. The pathophysiology and clinical relevance of platelet heterogeneity. *Blood* 1988; 72: 1-8.
3. O'Brien JR, Jamieson S. A relationship between platelet volume and platelet number. *Thromb Diath Haemorrh* 1974; 31: 363-5.
4. Levine J, Bessman JD. The inverse relationship between platelet volume and platelet number: abnormalities in hematologic disease and evidence that platelet size does not correlate with platelet age. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 295-307.
5. Kokawa T, Nomura S, Yasunaga K. Relationship between platelet volume and antiplatelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 1991; 47: 104-8.
6. Gardner FH, Bessman JD. Thrombocytopenia due to defective platelet production. *Clin Haematol* 1983; 12: 23-38.
7. Small BM, Bettigole RE. Diagnosis of myeloproliferative disease by analysis of the platelet volume distribution. *Am J Clin Path* 1981; 76: 685-91.
8. Bessman JD, Gardner FH. Platelet size in thrombocytopenia due to sepsis. *Surg Gynec Obstet* 1983; 156: 177-80.
9. Berchtold P, McMillan R. Therapy of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in adults. *Blood* 1989; 74: 2309-17.
10. Maes M, Scharpe S, Cooreman et al. Components of biological, including seasonal, variation in hematological measurements and plasma fibrinogen concentrations in normal humans. *Experimentia* 1995; 51: 141-9.
11. Kralj J. Pomen zunanjih dejavnikov pri oceni povprečnega volumna trombocitov. Magisterska naloga. Ljubljana: Medicinska fakulteta, 1993.
12. Thompson CV, Love DG, Quinn PG, Valeri CR. Platelet size does not correlate with platelet age. *Blood* 1983; 62: 487-94.
13. Corash L, Chen HY, Levin J, Baker G, Lu H, Mok Y. Regulation of thrombopoiesis: Effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 1987; 70: 177-85.
14. Martin JF, Trowbridge EA, Salmon GL, Slater DN. The relationship between platelet and megakaryocyte volume. *Thromb Res* 1982; 28: 447-59.
15. Andoljšek D, Repše S. Splenektomija pri kronični idiopatski trombocitopenični purpuri. *Zdrav vestn* 1991; 60: 287-9.
16. Najean Y, Rain JD, Dufour V. Platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993; 35: 431-6.

Naučiti se morate samo treh lahkih korakov in že lahko plešete valček. S Sumamedom postane antibiotično zdravljenje tako privlačno preprosto kot valček. Enkrat na dan, samo tri dni. Sumamed, en in enkrat.



1-2-3.

Trije lahki koraki

Širokospektralni antibiotik za zdravljenje okužb dihal.

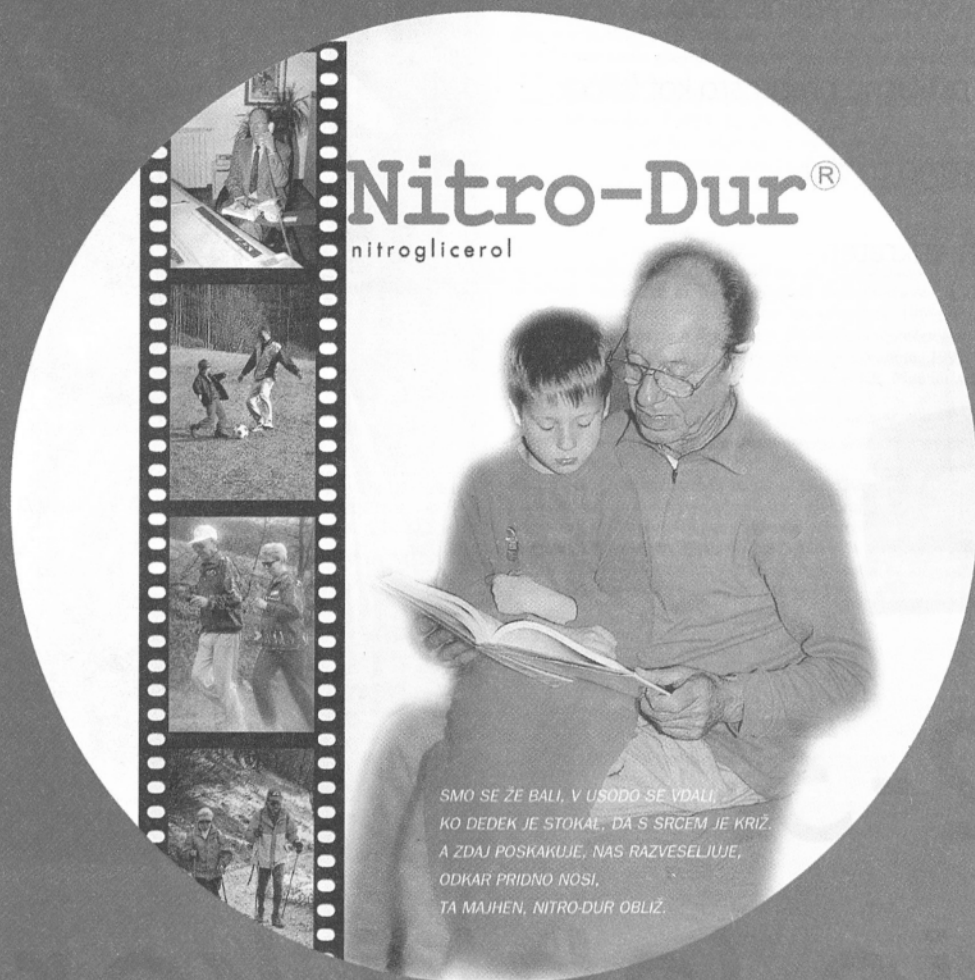
Sumamed[®]
azitromicin



Proizvajalec: PLIVA d.d., Zagreb, Hrvaška, Zastopnik: PLIVA LJUBLJANA d.o.o., Dunajska 51, 1000 Ljubljana, Telefon: 061/302 150; telefaks 061/302 850

SKRAJŠANO NAVODILO: Sumamed je prvi predstavnik makrolidnih antibiotikov nove generacije, imenovanih azalidi. **Indikacije:** Okužbe zgornjega dela dihal: bakterijsko vnetje žrela in tonzil, akutno vnetje srednjega ušesa in sinusov. Okužbe spodnjega dela dihal: akutne eksacerbacije kroničnega bronhitisa, intersticijske in bakterijske pljučnice. Okužbe kože in mehkih tkiv: erizipel (šen), impetigo in sekundarne piodermije. **Kontraindikacije:** Preobčutljivost za makrolidne antibiotike. **Interakcije:** Hrana zmanjšuje absorpcijo azitromicina, zato moramo zdravlilo jemati uro pred jedjo ali dve uri po njej. Antacidi upočasnijo absorpcijo azitromicina, zato priporočamo vsaj 2-urni presledek med jemanjem obeh zdravil. V nasprotju z večino makrolidov azitromicin ne inaktivira citokroma P-450, zato doslej niso opazili interakcij z drugimi zdravili. **Posebna opozorila:** Previdnost pri jemanju zdravila je potrebna pri bolnikih z okvarami jetrnih funkcij. Prilagajanje odmerkov pri starejših bolnikih ni potrebno. **Nosečnost in dojenje:** Poskusi na bregljih živalih niso pokazali škodljivih učinkov zdravila na plod, vendar so klinični podatki le maloštevilni, zato uporabljamo azitromicin med nosečnostjo in dojenjem le, če je res potreben. **Odmerki in uporaba:** Okužbe dihal, kože in mehkih tkiv: odrasli vzamejo tri dni zapored po 500 mg enkrat na dan. **Stranski učinki:** Azitromicin redko povzroča stranske učinke. Lahko se pojavijo prebavne motnje (napenjanje, slabost, bruhanje, driska, bolečine v trebuhu) in izpuščaji. Opazili so prehodno rahlo povečanje vrednosti jetrnih encimov, nevtropenijo ter le redko nevtrofilijo in eozinofilijo. Zvečane vrednosti se povrnejo na normalno raven v dveh do treh tednih po koncu zdravljenja. **Oprema:** kapsule po 250 mg, tablete po 500 mg. **Podrobnejše informacije o zdravilu so vam na voljo pri zastopniku.**

IZBIRA V PREVENTIVI IN ZDRAVLJENJU ANGINE PEKTORIS



Nitro-Dur[®]
nitroglicerol

SMO SE ŽE BALI, V USODO SE VDALI,
KO DEDEK JE STOKAL, DĀ S SRCEM JE KRIŽ.
A ZDAJ POSKAKUJE, NAS RAZVESELJUJE,
ODKAR PRIDNO NOSI,
TA MAJHEN, NITRO-DUR OBLIŽ.

NITRO-DUR
transdermalni nitroglicerol
0,2 mg/h
0,4 mg/h

- tanek, prosojen
- enostavno odpiranje, nameščanje in odstranjevanje
- manj iritacij

Schering-Plough CE AG



kapsule

Diflazon®

flukonazol

- *v svetu največ predpisovani sistemski antimikotik*
- *edini peroralni sistemski antimikotik za zdravljenje vaginalne kandidoze, ki ga je odobril FDA*

Skrajšano navodilo

Flukonazol je sistemski antimikotik iz skupine triazolov.

Odmerjanje pri različnih indikacijah:

vaginalna kandidoza	150 mg v enkratnem odmerku
mukozna kandidoza	50 do 100 mg na dan
dermatomikoze	50 mg na dan ali 150 mg na teden
sistemska kandidoza	prvi dan 400 mg, nato od 200 do 400 mg na dan Največji dnevni odmerek je 800 mg.
preprečevanje kandidoze	50 do 400 mg na dan
kriptokokni meningitis	prvi dan 400 mg, nato od 200 do 400 mg na dan
vzdrževalno zdravljenje	200 mg na dan

Kontraindikacije: Preobčutljivost za zdravilo ali sestavine zdravila. **Interakcije:** Pri enkratnem odmerku flukonazola za zdravljenje vaginalne kandidoze klinično pomembnih interakcij ni. Pri večkratnih in večjih odmerkih so možne interakcije s terfenadinom, cisapridom, astemizolom, varfarinom, derivati sulfonilureje, hidroklorotiazidom, fenitoinom, rifampicinom, ciklosporinom, teofilinom, indinavirom in midazolamom. **Nosečnost in dojenje:** Nosečnica lahko jemlje zdravilo le, če je korist zdravljenja za mater večja od tveganja za plod. Doječe matere naj med zdravljenjem s flukonazolom ne dojijo. **Stranski učinki:** Povezani so predvsem s prebavnim traktom: slabost, napenjanje, bolečine v trebuhu, driska, zelo redko se pojavijo preobčutljivostne kožne reakcije, anafilaksija in angioedem – v tem primeru takoj prenehamo jemati zdravilo. Pri bolnikih s hudimi glivičnimi obolenji lahko pride do levkopenije in trombocitopenije in do povečane aktivnosti jetrnih encimov. **Oprema in način izdajanja:** 7 kapsul po 50 mg, 28 kapsul po 100 mg, 1 kapsula po 150 mg. Na zdravniški recept. 5/98.

Podrobnejše informacije so na voljo pri proizvajalcu.



Krka, d. d., Novo mesto
Šmarješka cesta 6
8501 Novo mesto

Kdo uporablja
najnaprednejše
metode
znanja
za razvoj
novih zdravil
21. stoletja?



NOVARTIS

Vodilni farmacevtski koncern v svetu.
Nastal z združitvijo Sandoza in Cibe.

novo znanje
za razumevanje življenja

Informacije in literatura so na voljo pri
Novartis Pharma Services Inc., Podružnica v Sloveniji
Dunajska 22, 1511 Ljubljana



40 YEARS OF CLINICAL HEMATOLOGY IN LJUBLJANA

CONTENTS

LEADING ARTICLE

- 40 years of clinical haematology in Ljubljana**, P. Černelč I-1

ARTICLES

- The evolution of bone marrow transplantation in the cure of human disease**, E. D. Thomas I-3
- Treatment of chronic lymphocytic leukemia and low-grade non Hodgkin's lymphomas with fludarabine**, C. Rozman I-5
- Autologous stem cell transplantation in the treatment of acute leukemias**, B. Labar, D. Nemet, M. Mrsić, V. Bogdanič, D. Batinič, B. Golubič-Čepulič, M. Petrovečki, I. Radman, I. Aurer, D. Sertič I-9
- Allogeneic haemopoietic stem cell transplantation for chronic granulocytic and acute leukaemias in University Medical Centre Ljubljana**, J. Pretnar, S. Zver, M. Benedik-Dolničar I-11
- Autologous stem cell transplantation for solid tumors in children and our experiences**, M. Benedik-Dolničar, J. Anžič I-15
- High dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell support in solid tumors in adults**, B. Zakotnik, B. Pajk, J. Pretnar I-19
- Treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukemia with fludarabine**, P. Černelč I-23
- Treatment of hairy cell leukemia with cladribine**, U. Mlakar I-27
- Pre-treatment serum erythropoietin in patients with multiple myeloma**, U. Mlakar I-31
- Our results in adult patients with acute myeloid leukemia treated according to AML 10 protocol**, M. Modic I-35
- Treatment of acute myeloblastic leukemia with cladribine in elderly patients - Our experiences**, S. Zver, J. Pretnar I-39
- Myelodysplastic syndrome with acquired corpuscular haemolytic anaemia and later transition in AML - Case report**, U. Mlakar I-43
- Treatment of pure red cell aplastic anemia in patient with chronic lymphocytic leukemia**, M. Bervar, P. Černelč I-47
- Reticulocyte counting by microscopy and flow cytometry**, I. Preložnik-Zupan I-51
- Detection of activated platelets by flow cytometric analysis of antigens CD62P and CD63**, J. Kralj I-57
- Flow cytometry analysis of platelet antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura**, D. Žontar, P. Černelč I-61
- Relation between plasma heparin concentration and clothing disturbance during heparin hemodialysis**, Z. Čede, A. Andoljšek I-65
- Chronic myeloid leukemia and respondent molecular diagnostic methods**, T. Pajič, P. Černelč I-69
- Platelet number and volume changes in idiopathic thrombocytopenic purpura**, M. Tomažič, D. Andoljšek I-73