

# Utjecaj proliferacijskog biljega Ki-67 na prognozu i odabir liječenja u bolesnika s limfomom mantl (plaštene) zone

---

Petrović, Andreja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:057145>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2021-08-03**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

**Andreja Petrović**

**Utjecaj proliferacijskog biljega Ki-67 na prognozu i odabir  
liječenja u bolesnika s limfomom mantl (plaštene) zone**

**Diplomski rad**



Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb pod vodstvom dr.sc. Ivane Ilić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2015./2016.

Popis kratica korištenih u radu:

AP	alkalna fosfataza
BCL-2	gen koji kodira protein regulator apoptoze limfom B limfocita 2 (B-cell lymphoma 2)
CD	razlikovni biljeg (eng. cluster of differentiation)
cm	centimetar
CT	kompjutorizirana tomografija (eng. Computed tomography)
GGN	gornja granice normale
Gy	gray
HAD	visoke doze citarabina i deksametazona
KBC	Klinički bolnički centar
KKS	kompletna krvna slika
KR	kompletna remisija
L	leukociti
LDH	laktat-dehidrogenaza
MIPI	Internacionalni prognostički indeks limfoma plaštene zone
mm <sup>2</sup>	milimetar kvadratni

MR	magnetna rezonancija
PET-CT	pozitronska emisijska tomografija s kompjutoriziranom tomografijom
PB	progresivna bolest
PR	parcijalna remisija
R-CHOP	rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon
R-DHAP	rituksimab, deksometazon, visoke doze citarabin i cisplatina
R-EPOCH	rituksimab + etopozid, prednizon, vinkristin, ciklofosamid i doksorubicin
R-hiper-CVAD	rituksimab + ciklofosamid, vinkristin, doksorubicin i deksametazon
RTG	rentgenska snimka
SAD	Sjedinjene Američke Države
SB	stabilna bolest
SOX11	gen visoke pokretljivost vezan uz okidačku regiju razvoja testisa na kromosomu Y
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
U/L	jedinica po litri
UZV	ultrazvučna dijagnostika

## Sadržaj:

1.	Sažetak	
2.	Summary	
3.	Uvod.....	1
3.1.	Limfomi plaštene zone.....	1
3.2.	Simptomi.....	1
3.3.	Dijagnostička obrada.....	2
3.4.	Klinički stadij.....	2
3.5.	Patohistološka dijagnoza.....	4
3.6.	Laboratorijska obrada.....	6
3.7.	Radiološka obrada.....	7
3.8.	Liječenje.....	8
3.8.1.	Procjena odgovora na liječenje.....	9
3.8.2.	Komplikacije liječenja.....	10
3.9.	Prognostički čimbenici.....	11
4.	Hipoteza.....	13
5.	Ciljevi istraživanja.....	13
5.1.	Opći cilj.....	13
5.2.	Specifični ciljevi.....	13
6.	Materijali i metode.....	14
6.1.	Ispitanici.....	14
6.2.	Metode.....	14
6.3.	Statistička analiza.....	16
7.	Rezultati.....	16
7.1.	Klinički podaci bolesnika.....	16
7.2.	Laboratorijski podaci.....	18

7.3.	Patohistološki podaci.....	20
7.4.	Usporedba Ki-67 s drugim podacima.....	20
8.	Rasprava.....	23
9.	Zaključak .....	24
10.	Zahvale .....	25
11.	Literatura .....	25
12.	Životopis.....	28

## 1. Sažetak

Andreja Petrović

Utjecaj proliferacijskog biljega Ki-67 na prognozu i odabir liječenja u bolesnika s limfomom mantl (plaštene) zone

Limfom plaštene zone je tumor limfnog tkiva koji nastaje zloćudnom pretvorbom B limfocita, te pripada skupini non-Hodgkin limfoma. To je agresivan limfom s lošom prognozom i medijanom preživljenja između 2-5 godina. Zbog njegove agresivnosti i lošeg ishoda liječenja bolesnika, bitno je odrediti prognostičke čimbenike koji nam mogu pomoći u boljem odabiru vrste liječenja te samim tim poboljšati ishod liječenja. Cilj ovog istraživanja je utvrditi povezanost proliferacijskog biljega Ki-67 s odabirom liječenja, ishodom liječenja i ishodom bolesti bolesnika s limfomom plaštene zone. Analizirani su podaci 37 bolesnika dijagnosticiranih i liječenih u Kliničkom bolničkom centru Zagreb od siječnja 2011. do prosinca 2015. godine. Analizirani su klinički čimbenici : dob, spol, klinički stadij, vrsta liječenja, odgovor na liječenje; laboratorijski: broj eritrocita, leukocita i trombocita u perifernoj krvi u vrijeme dijagnoze i koncentracija laktat dehidrogenaze u serumu. Iz patohistološkog nalaza izvađen je podatak o visini ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama. Rezultati nisu dokazali povezanost ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 s odabirom i ishodom liječenja kao niti ishodom bolesti. Potrebno je provesti daljna istraživanja koja bi pomogla u izdvajanju bolesnika koje je potrebno liječiti agresivnijom terapijom što bi rezultiralo većim brojem povoljnih ishoda liječenja i boljom prognozom bolesti.

Ključne riječi: limfom plaštene zone, Ki-67, ishod liječenja, prognostički čimbenici



## **2. Summary**

Andreja Petrović

The impact of the proliferation marker Ki-67 on the outcome and choice of therapy in patients with mantle cell lymphoma

Mantle cell lymphoma is a lymphoid tissue neoplasm that arises from malignant transformation of B lymphocytes. It is a type of non-Hodgkin's lymphoma. It is an aggressive disease with the median survival being 2-5 years. Because of its high percentage of unfavorable outcomes, determining early prognostic factors would lead to a better choice of a therapy thus improving the outcome of the therapy. The aim of this study is determining the relationship of the proliferation marker Ki-67 with the choice of therapy, outcome of the therapy and outcome of the disease. We studied 37 patients diagnosed and treated at the University Hospital Centre Zagreb from January 2011 to December 2015. The analyzed factors included clinical data: age, sex, clinical stage, type of treatment and response to treatment; laboratory data: peripheral blood count of red blood cell, leukocyte and platelet as well as Lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase level in the serum at the time of diagnosis. The data of percentage of Ki-67 positive tumor cells was found in the histopathology report. The study did not prove a relationship between the proliferation marker Ki-67 and the type of treatment nor with outcome of treatment nor outcome of the disease. Further studies are necessary for identifying the patients that require more aggressive treatment that would lead to a higher number of favorable outcomes and a better prognosis of the disease.

Keywords: mantle cell lymphoma, Ki-67, treatment outcome, prognostic factors

### 3. Uvod

#### 3.1. Limfomi plaštene zone

Limfom plaštene zone je zloćudna novotvorina limfnog tkiva koja pripada skupini non-Hodgkin limfoma i najčešće se pojavljuje u limfnom čvoru (1,2). Nastaje zloćudnom pretvorbom limfocita B koji se nalaze u plaštenoj zoni limfnog folikula zbog čega se još naziva i mantl limfom (1,2). Jedan je od najrjeđih podtipova limfoma B limfocita, u Europi čini 6-9%, a u SAD-u 4-5% svih limfoma (3). Češće se javlja u muškaraca nego u žena, u omjeru 3:1 (3). U nastanku limfoma plaštene zone ulogu imaju promjene na genskoj razini od kojih je najčešća translokacija  $t(11;14)(q13;q32)$  koja dovodi do prekomjerne ekspresije ciklina D1 (4).

#### 3.2. Simptomi

Najčešći simptom je povećan i bezbolan limfni čvor (u 75% slučajeva) koji bolesnik sam napipa, a može se prezentirati i kao generalizirana limfadenopatija (1).

Simptomi su vezani uz lokalizaciju limfnih čvorova ili zahvaćenog organa, npr. u slučaju zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova, što nalazimo u 20% bolesnika, bolesnik se žali na pritisak u prsima, nedostatak zraka ili otežano disanje (5). Osim plućne simptomatologije, mogu se prezentirati i simptomima gastrointestinalnog sustava te simptomima koji su posljedica zahvaćenosti jetre, slezene i koštane srži (2). Uz simptome vezane uz povećanje organa i tkiva koji su posljedica infiltracije limfomom, u bolesnika s limfomima, pa tako i limfomima plaštene zone, javljaju se i nespecifični

simptomi, takozvani „B simptomi“. B simptomi uključuju pojavu temperature veće od 38°C, noćno znojenje i neobjašnjivi gubitak više od 10% tjelesne težine u zadnjih 6 mjeseci. B simptomi u bolesnika s limfomom plaštene zone javljaju se rjeđe nego u bolesnika s Hodgkinovim limfomom, pa tako manje od 50% bolesnika ima izražene B simptome (1).

### 3.3. Dijagnostička obrada

Veliku ulogu u dijagnostici imaju anamneza i klinički pregled bolesnika. Gotovo se svi bolesnici javljaju s bezbolno povećanim limfnim čvorom i/ili hepatosplenomegalijom (5).

Nakon postavljanja sumnje na postojanje limfoma, nužna je detaljna obrada koja zahtijeva suradnju više grana medicine (5). Za postavljanje definitivne dijagnoze limfoma potrebno je napraviti biopsiju limfnog čvora ili organa (5). Uzorak se šalje na patohistološku analizu patologu koji na temelju rasta tumora, izgleda stanica i jedinstvenog imunofenotipa stanica postavlja patohistološku dijagnozu. Osim patohistološke dijagnostike, potrebno je napraviti laboratorijsku i radiološku obradu bolesnika u svrhu procjene i određivanja kliničkog stadija što nam omogućuje pravilan pristup liječenju bolesnika (5).

### 3.4. Klinički stadij

Klinički stadij označava stupanj proširenosti bolesti ovisno o zahvaćenosti limfnih čvorova, limfatičnih i nelimfatičnih organa te prisutnosti ili odsutnosti određenih

simptoma (5). Za određivanje kliničkog stadija svih limfoma pa tako i limfoma plaštene zone koristimo Ann Arbor klasifikaciju koja dijeli bolest u četiri osnovna stadija (6).

U prvom stadiju (I) zahvaćena je jedna regija limfnih čvorova ili jedan ekstralimfatični organ. Stadij II označava zahvaćenost dvije ili više regija limfnih čvorova s iste strane ošita, također uključuje lokalizirano zahvaćanje jednog ekstralimfatičnog organa. Stadij III označava zahvaćenost regija limfnih čvorova ili ekstralimfatičnih organa s obje strane ošita. Stadij IV označava proširenu bolest, sa zahvaćanjem jednog ili više ekstralimfatičnih organa sa ili bez zahvaćanja limfnih čvorova (6).

Ako je zahvaćen ekstralimfatični organ, onda se uz oznaku stadija stavlja slovo E. Ako je zahvaćena slezena stavlja se slovo S.

Osim zahvaćenosti organa, Ann Arbor klasifikacija obuhvaća i prisutnost ili odsutnost B simptoma. Uz oznaku stadija pišemo A ukoliko nema simptoma (A = asimptomatski) ili B ukoliko su prisutni simptomi (6).

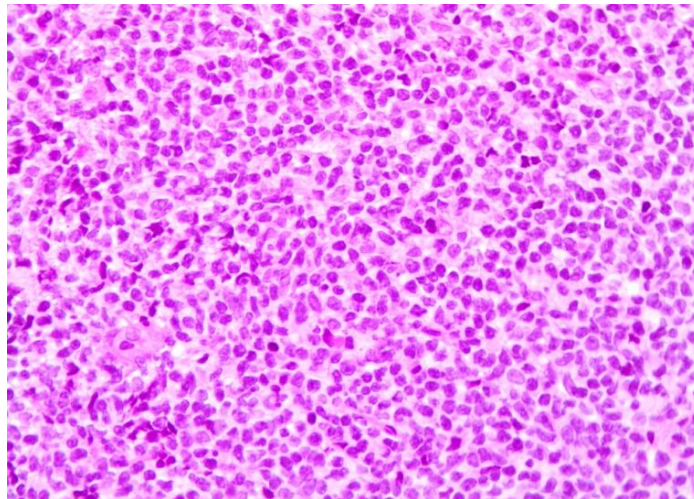
Osim toga, uz stadij i simptome, neki autori koriste oznaku X ovisno o veličini tumorske mase. Oznaka X obuhvaća proširenje medijastinuma više od jedne trećine u razini T5-T6 te nodalnu masu maksimalne dimenzije veće od 10 cm (1).

U vrijeme dijagnosticiranja limfoma plaštene zone većina bolesnika nalazi se u stadiju III ili IV, često sa zahvaćenim nelimfatičnim organima: jetrom, slezenom ili koštanom srži (2).

### 3.5. Patohistološka dijagnoza

Jedina pouzdana dijagnostička metoda za dokazivanje limfoma plaštene zone je patohistološka dijagnostika koja uključuje određivanje fenotipa tumora (4).

Limfom plaštene zone nastaje zloćudnom pretvorbom zrelih B limfocita. Tumorske stanice su srednje velike s nepravilnom jezgrom, neprimjetnom jezgricom i oskudnom citoplazmom (7). Osim ovog osnovnog tipa, postoje još dva tipa: blastični tip, u kojem su stanice izgledom nalik limfoblastima s raspršenim kromatinom i istaknutom jezgricom (7) i pleomorfni tip u kojem su tumorske stanice velike i pleomorfne stanice s istaknutom jezgricom i obilnom, blijedom citoplazmom (4). Oba navedena podtipa imaju agresivniji klinički tijek i lošiju prognozu bolesti.



Slika 1. Stanice limfoma plaštene zone su male s nepravilnim jezgrama. (bojanje hemalaun eozinom, povećanje 400x)

Stanice limfoma plaštene zone na svojoj površini izražavaju različite biljege. Neki od biljega označavaju porijeklo ovih stanica iz B limfocita kao što su CD19, CD20 te su pozitivne i na drugim non-Hodgkinovim limfomima porijekla B limfocita, dok su drugi

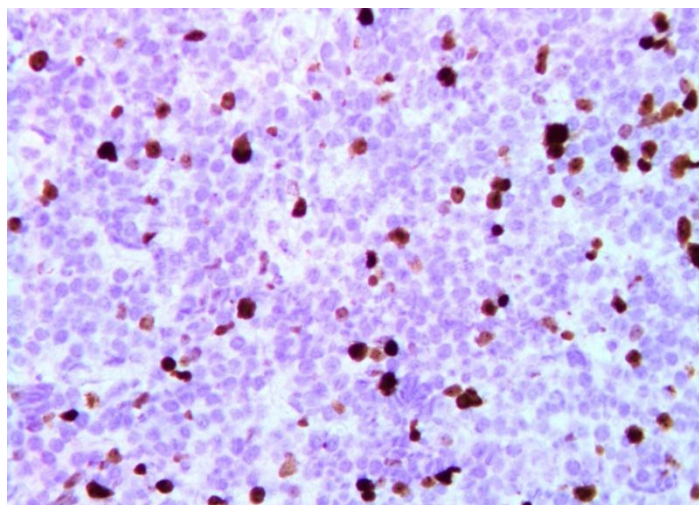
biljezi kao na primjer CD5 i ciklin D1, odnosno njihova kombinacija, karakteristični samo za limfom plaštene zone. Tumorske stanice ovog limfoma su negativne na TdT, CD10, BCL6 i CD23 (7). Cyclin D1 je regulator G1/S faze staničnog ciklusa, a njegova prekomjerna ekspresija dovodi do nekontroliranog rasta tumorskih stanica (7). U tumorskim stanicama limfoma plaštene zone nalazi se i ekspresija SOX11 gena. Protein SOX11 ima ulogu u diferencijaciji stanica djelujući kao kočničar tumorskog rasta (9). Sve ove biljege, od kojih se neki nalaze na membrani, a neki u jezgri tumorskih stanica moguće je prikazati specijalnim bojanjem imunohistokemijskom metodom koja se rutinski koristi u patohistološkoj dijagnostici.

Analiza načina rasta tumora, izgleda stanica i specifičnog imunofenotipa nam omogućuje razlikovanje limfoma plaštene zone od drugih non Hodgkin limfoma B fenotipa (2,7).

U dijagnostici nerijetko koristimo i molekularne metode, npr. fluorescentna in situ hibridizacija ili klasična citogenetika kojima je moguće dokazati prisutnost karakteristične translokacije  $t(11;14)(q13;q32)$ , koja je odgovorna za prekomjernu ekspresiju ciklina D1 (7).

Osim biljega koje koristimo kako bismo postavili patohistološku dijagnozu, imunohistokemijskom metodom možemo utvrditi i neke od prognostičkih čimbenika. Kod limfoma plaštene zone to je proliferacijski biljeg Ki-67.

Osim biopsije limfnog čvora ili zahvaćenog tkiva zbog postavljanja dijagnoze, potrebno je napraviti i biopsiju kosti zbog procjene proširenosti bolesti.



Slika 2. Smeđa obojanost jezgre tumorskih stanica imunohistokemijskim bojanjem na Ki-67 biljeg. (povećanje 400x)

Biopsija povećanog limfnog čvora, sumnjive promjene u organima i tkivima te biopsija koštane srži također se rade kod sumnje na povrat bolesti.

### 3.6. Laboratorijska obrada

Od laboratorijskih pretraga moraju se napraviti: kompletna krvna slika (KKS), testovi jetrene funkcije, biokemijske pretrage, kalcij te mokraćna kiselina (5).

Promjene u kompletnoj krvnoj slici mogu biti posljedica zahvaćenosti koštane srži, a uključuju anemiju, leukopeniju i trombocitopeniju, dok je u dijela bolesnika, njih 20-40%, prisutna limfocitoza više od  $4 \times 10^9/L$  (10).

Od biokemijskih pretraga najvažnija je laktat-dehidrogenaza (LDH) čija je vrijednost u tijelu povećana zbog raspada stanica pa korelira s proširenošću bolesti (10). Veliku važnost novija istraživanja pridaju beta2-mikroglobulinu čije povišene vrijednosti u krvi

ukazuju na lošiju prognozu bolesti (10). Abnormalni jetreni testovi posljedica su infiltracije jetre tumorom (10). Povišeni kalcij u serumu te povećana vrijednost mokraćne kiseline u krvi ukazuje na infiltraciju kosti, odnosno, sindrom lize tumora.

### 3.7. Radiološka obrada

Radiološke metode koriste se u svrhu procjene proširenosti bolesti, odnosno, određivanja kliničkog stadija. Najčešće se koriste rentgenske snimke (RTG) i kompjutorizirana tomografija (CT).

RTG prsnog koša koristimo u procjeni zahvaćenosti medijastinalnih limfnih čvorova, infiltracije plućnog parenhima ili postojanja nekih komplikacija bolesti kao što je pleuralni izljev. Osim toga, koristan je i RTG gastrointestinalnog trakta u slučaju sumnje na njegovo zahvaćanje.

Više informacija o zahvaćenosti organa nam daje uporaba CT-a. Najčešće se koristi CT vrata, prsnog koša i CT trbuha i zdjelice kojim se analiziraju palpaciji nedostupni limfni čvorovi kao što su retroperitonealni i mezenterijalni limfni čvorovi da bi se procijenilo jesu li povećani te jetra i slezena za otkrivanje žarišnih ili difuznih promjena u parenhimu.

Ako postoji indikacija, u pojedinim slučajevima, može se koristiti magnetna rezonancija (MR), ultrazvuk (UZV) i limfangiografija koje se inače koriste vrlo rijetko (5).



### 3.8. Liječenje

Metode koje su pokazale najviše učinkovitosti u liječenju limfoma plaštene zone su kemoterapija i radioterapija.

U liječenju stadija I i II najviše se koristi kemoterapija nakon čega slijedi primjena radioterapije dozom od 30 Gy, posebno ako je tumor manje veličine i dobro lokaliziran. Ako je tumor veći te slabo lokaliziran, najčešći pristup je kao za stadije III i IV. Za stadije III i IV, osim veličine tumora, za procjenu liječenja zračenjem važno je i opće stanje bolesnika, postojanje simptoma te dob bolesnika (3).

Prva linija liječenja u bolesnika mlađih od 65 godina, je kombinacija imunoterapije i kemoterapije. Najčešće korištena terapija je alternirajući R-CHOP/R-DHAP (rituksimab + ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon; rituksimab + deksometazon, citarabin i cisplatina) protokol u 6 ciklusa. Alternativna kemoterapija je R-hiper-CVAD (rituksimab + ciklofosfamid, vinkristin, doksorubicin i deksametazon), terapija je podijeljena u manje doze koje se češće primjenjuju kako bi se spriječile nuspojave kemoterapije.

Kod bolesnika starijih od 65 godina se koristi protokol R-CHOP u 8 ciklusa, a umjesto njega može se koristiti R-EPOCH (rituksimab + etopozid, vinkristin, doksorubicin, ciklofosfamid i deksametazon) (11).

Kod proširene bolesti, u mlađih bolesnika koji nisu bili liječeni visokim dozama citarabina, može se primijeniti protokol DHAP (deksometazon, citarabin i cisplatina) ili hiper-CVAD (ciklofosfamid, vinkristin, doksorubicin i deksametazon). U starijih se može primijeniti protokol HAD (visoke doze citarabina i deksametazona).

Također, korisna je autotransplantacija ili alotransplantacija matičnih stanica (11).

Medijan preživljenja je između 2-5 godina, a samo 10-15% bolesnika preživi 10 godina.

Većina limfoma plaštene zone ima lošu prognozu, ne samo zbog svoje agresivnosti nego i zbog agresivnog liječenja zbog čega se stalno istražuju i predlažu novi lijekovi i nove kombinacije lijekova. U novije vrijeme u liječenje limfoma plaštene zone uvodi se bortezomib, a u fazi istraživanja je primjena inhibitora BCL-2 te inhibitora Brutonove tirozin kinaze (10).

### 3.8.1. Procjena odgovora na liječenje

Procjena odgovora na liječenje sastoji se od: anamneze uz pomoć koje otkrivamo postoje li određeni simptomi ili ne (B simptomi), kliničkog pregleda kojim utvrđujemo postoje li povećani palpabilni limfni čvorovi i jesu li jetra i slezena povećane, laboratorijskih pretraga te radioloških i nuklearnih pretraga kao što su CT i pozitronska emisijska tomografija s kompjutoriziranom tomografijom (PET-CT) kojima dobivamo informacije o stanju limfnih čvorova i organa koje ne možemo analizirati palpacijom ili nekom drugom metodom (3).

Kod bolesnika mlađih od 65 godina, prvu procjenu odgovora na liječenje treba provesti nakon trećeg, a drugu nakon šestog ciklusa. Kod starijih od 65 godina, prva procjena radi se nakon trećeg ili četvrtog ciklusa, a druga nakon završetka terapije (11).

#### 3.8.1.1. Kompletna remisija (KR)

Kompletna remisija je nestanak kliničkih znakova i simptoma bolesti.

Limfni čvorovi koji su prije bili uvećani, nakon liječenja, moraju biti palpatorno manji od 1cm ili manji od 1.5cm na CT-u. Jetra i slezena ne smiju biti povećane ili imati fokalne

promjene vidljive CT-om. Biopsija kosti ne smije pokazivati infiltraciju koštane srži tumorskim stanicama. Ako je prije liječenja PET-CT pokazao patološko nakupljanje, nakon liječenja PET-CT ne smije pokazivati to nakupljanje (11).

#### 3.8.1.2. Parcijalna remisija (PR)

Kako bi dokazali PR moramo dokazati smanjenje zahvaćenih limfnih čvorova za >50%, smanjenje fokalnih promjena u jetri i slezeni za >50% i dokazati nepostojanje kriterija za KR (11).

#### 3.8.1.3. Stabilna bolest (SB)

Stabilna bolest vrijedi za bolesnike koji ne ispunjavaju kriteriji za KR, PR ni PB (11).

#### 3.8.1.4. Progresivna bolest (PB)

Progresivna bolest označava pojavu novog sijela ili povećanje bilo kojeg limfnog čvora za >50% ili povećanje fokalnih lezija na jetri i slezeni za >50%. PET-CT mora pokazivati patološko nakupljanje (11).

Promjenom protokola liječenja, u bolesnika koji su postigli PR, moguće je postići KR.

SB i PB znači da bolesnik ne odgovara na terapiju i treba razmotriti drugi pristup liječenju (3).

#### 3.8.2. Komplikacije liječenja

Komplikacije liječenja nastaju djelovanjem kemoterapije na cjelokupni sustav. Važnije komplikacije koje se najranije mogu opaziti i zbog kojih se predlaže praćenje krvne slike svakih 10-14 dana nakon primjene kemoterapije, jesu anemija zbog oštećenja eritrocita, neutropenija koja dovodi do težih infekcija te trombocitopenija koja može dovesti do

krvarenja, odnosno, iskrvarenja. Mučnina, povraćanje i proljev mogu dovesti do teže dehidracije i poremećaja elektrolita, te je zbog toga potrebno simptomatsko liječenje nuspojava kemoterapije. Osim navedenih, zabilježena je i pojava neuropatije (10).

### 3.9. Prognostički čimbenici

Klasični tip limfoma plaštene zone je jako agresivan zloćudni tumor s lošim ishodom liječenja kod kojeg se medijan preživljenja bolesnika kreće od 18 mjeseci do 50 mjeseci, dok samo 5-10% bolesnika preživi 10 godina (12). Osim klasičnog tipa postoji indolentni tip limfoma plaštene zone čija je prognoza bolja i tijek manje agresivan, te zbog slabo izraženih simptoma u vrijeme dijagnosticiranja, nije odmah potrebno liječenje nego se kao i kod drugih limfoma indolentnog tijeka bolesti preporučuje praćenje bolesnika. Medijan preživljenja takvih bolesnika se kreće između 7 i 10 godina (9).

Najvažniji je MIPI indeks (Internacionalni prognostički indeks limfoma plaštene zone) koji uključuje nekoliko kliničkih čimbenika:

- a) Dob bolesnika: <50 godina, 50-59 godina, 60-69 godina, >69 godina
- b) Opće stanje bolesnika: 0-1, 2-4
- c) LDH (GGN): <0.67, 0.67-0.99, 1.0-1.49, >1.5
- d) Broj leukocita ( $10^9/L$ ): <6.70, 6.70-9.99, 10.00-14.99, >15.00

Svaki od prognostičkih čimbenika nosi određen broj, te na osnovu skupljenih bodova, bolesnici su podijeljeni u tri glavne skupine. Nizak rizik: svi bolesnici koji imaju 0-3 boda,

srednji rizik: bolesnici koji imaju 4-5 bodova i visok rizik: bolesnici između 6-11 bodova (13).

Od 2009. godine uveden je patohistološki čimbenik čija važnost je značajna u procjeni preživljenja, proliferacijski biljeg Ki-67 (15). Ako je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 <10% ishod bolesti je bolji u odnosu na bolesnike kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 između 10-40%. Najlošiji ishod se zapaža u bolesnika kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 >40% (12).

Osim navedenih prognostičkih čimbenika, u obzir dolaze tip tumora i mitotski indeks.

Blastični i pleomorfni tip imaju lošiji ishod u odnosu na bolesnike s klasičnim limfomom plaštene zone. Mitotski indeks dijeli se u tri skupine po broju mitoza u mm<sup>2</sup>: <25, 25-49, >50. Povećanjem mitotskog indeksa veća je agresivnost tumora i lošija je prognoza bolesti (12, 14).

#### **4. Hipoteza**

Bolesnici koji boluju od limfoma plaštene zone čije stanice imaju viši postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 primaju agresivnije liječenje.

Bolesnici koji boluju od limfoma plaštene zone čije stanice imaju viši postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 imaju lošiji ishod liječenja.

Bolesnici koji boluju od limfoma plaštene zone čije stanice imaju viši postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 imaju lošiju prognozu bolesti.

#### **5. Ciljevi istraživanja**

##### **5.1. Opći cilj**

Opći cilj ovog istraživanja je potvrditi utjecaj nepovoljnih prognostičkih čimbenika na izbor liječenja, ishod liječenja i prognozu bolesti u bolesnika koji boluju od limfoma plaštene zone.

##### **5.2. Specifični ciljevi**

Utvrđiti povezanost povećane ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama s odabirom liječenja bolesnika koji boluju od limfoma plaštene zone.

Utvrđiti povezanost povećane ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama s nepovoljnim ishodom liječenja.

Utvrđiti povezanost povećane ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama s nepovoljnom prognozom bolesti.

## 6. Materijali i metode

### 6.1. Ispitanici

U ovo retrospektivno istraživanje uključeni su bolesnici kojima je postavljena dijagnoza limfoma plaštene zone u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb i koji su liječeni u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb od siječnja 2011. do prosinca 2015. Uvidom u informatičku arhivu Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju nađena su 52 bolesnika s dijagnozom limfoma plaštene zone. Od ukupnog broja bolesnika, njih 49 je liječeno u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb, no samo 37 je imalo potpune kliničke i laboratorijske podatke stoga su uključeni u ovo istraživanje. Dvanaest bolesnika od njih 49, iako liječeni u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb, nije imalo inicijalnu biopsiju limfnog čvora ili potpune kliničke i laboratorijske podatke te je isključeno iz studije. Tri bolesnika su liječena u drugoj ustanovi zbog čega su isključeni iz ovog istraživanja.

### 6.2. Metode

Prikupljeni su klinički i laboratorijski podaci bolesnika iz e-kartona KBC Zagreb te patohistološki podaci iz patohistološkog nalaza bolesnika iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb.

Od kliničkih podataka sabrali smo podatke o dobi, spolu, kliničkom stadiju, vrsti liječenja, odgovoru na liječenje, dužini praćena bolesnika, vremenu do pojave recidiva ili smrti. Od laboratorijskih podataka izvadili smo podatke o broju eritrocita ( $10^9/L$ ), broju leukocita ( $10^9/L$ ), broju trombocita ( $10^9/L$ ), koncentraciji LDH u serumu (U/L), koncentraciji alkalne-fosfataze (AP) u serumu (U/L) iz periferne krvi bolesnika.

Anemijom smo smatrali broj eritrocita manji od  $4,34 \times 10^{12}/L$  te vrijednost hemoglobina manjom od 138 g/L. Leukopenijom smo smatrali broj leukocita manji od  $3,4 \times 10^9/L$ .

Trombocitopenijom smo smatrali broj trombocita manji od  $158 \times 10^9/L$ .

Povećanom smo smatrali vrijednost LDH iznad 240 U/L te vrijednost AP iznad 142 U/L.

Iz patohistološkog nalaza prve (inicijalne) biopsije limfnog čvora ili ektranodalnog tkiva na kojem je postavljena dijagnoza limfoma plaštene zone izvadili smo podatak o proliferacijskoj aktivnosti tumorskih stanica. Proliferacijska aktivnost prikazana je imunohistokemijskim bojanjem na Ki-67 biljeg koristeći rutinski postupak imunohistokemijskog bojanja (klon MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark) te je rezultat procijenjen brojanjem na 200 tumorskih stanica i izražen u postotku. Prema visini proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama bolesnike smo podijelili u tri skupine (12). Niskom vrijednošću Ki-67 smatrali smo vrijednost ispod i jednake 10% dok smo srednjom vrijednošću smatrali vrijednost Ki-67 više od 10%, a manje od 40%, a visokom smo vrijednošću smatrali vrijednosti iznad 40%.

S obzirom na vrstu liječenja bolesnici su podijeljeni u tri skupine. Prvu skupinu činili su bolesnici koji su primili standardni kemoterapijski protokol koji uključuje R-CHOP ili kombinaciju R-CHOP/R-DHAP protokola. Drugu skupinu činili su bolesnici koji su liječeni nekim drugim protokolom ili su započeli liječenje standardnim protokolom no nisu na reevaluaciji liječenja imali dobar odgovor na liječenje te je primijenjen neki drugi kemoterapijski protokol. Treću skupinu činili su bolesnici koji su uz kemoterapiju imali napravljenu i transplantaciju matičnih stanica.



Povoljnim ishodom liječenja smatrali smo odgovor na liječenje ako je nakon provedenog liječenja postignuta kompletna ili parcijalna remisija, dok smo nepovoljnim ishodom smatrali progresivnu ili refraktornu bolest, odnosno ako je bolesnik umro tijekom terapije.

Nepovoljnim ishodom bolesti smatrali smo smrt bolesnika koja je uslijedila zbog osnovne bolesti.

### 6.3. Statistička analiza

Za usporedbu kliničkih, laboratorijskih, patohistoloških podataka s podacima o liječenju i ishodu liječenja između skupina koristili smo Hi kvadrat test. Značajnost razlika u rezultatima među skupinama testirali smo t-testom. P-vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

## 7. Rezultati

### 7.1. Klinički podaci bolesnika

U studiju je ukupno uključeno 37 bolesnika. Od ukupnog broja bolesnika većina (26/37, 70%) su bili muškog spola dok je 11 (30%) bolesnika bilo ženskog spola. Raspon dobi bolesnika bio je od 37 do 81 godine s medijanom 67 godina. Prema dobi bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: skupinu starijih od 60 godina u kojoj je bilo 29 bolesnika (78%) i skupinu mlađih od 60 godina u kojoj je bilo 8 bolesnika (22%) (Tablica 1).

Od kliničkih stadija bolesti, najveći broj bolesnika bio je u vrijeme postavljanja dijagnoze u kliničkom stadiju IV (70%), dok je najmanje bolesnika bilo u kliničkom stadiju II (6%).

Tablica 1. Klinički podaci bolesnika s limfomom plaštene zone.

	Ukupan broj	%
Bolesnici	37	100
Dob		
Raspon (medijan)	37-81 (67)	
<60 godina	8	22
>60 godina	29	78
Spol		
Žene	11	30
Muškarci	26	70
Klinički stadij bolesti		
I	3	8
II	2	6
III	6	16
IV	26	70
Simptomi		
B simptomi	8	22
Bez simptoma	29	78
Vrsta liječenja		
Standardni protokol	21	56
Drugi protokol	8	22
Transplantacija matičnih stanica	8	22
Ishod liječenja		
Povoljan ishod	26	70
Nepovoljan ishod	11	30
Ishod bolesti		
Živi	27	73
Umrli	10	27

Tri bolesnika (8%) bila su u kliničkom stadiju I, a 6 bolesnika (16%) bilo je u kliničkom stadiju III. Većina bolesnika (78%) nije imala simptome bolesti, a 8 bolesnika (22%) u trenutku postavljanja dijagnoze imalo je jedan ili više B simptoma.

Bolesnika liječenih standardnom terapijom bio je 21 bolesnik (56%). U skupini bolesnika liječenih drugačijim protokolom bilo je 8 bolesnika (22%). Od ukupnog broja bolesnika kod njih 8 (22%) je napravljena transplantacija koštane srži.

Povoljan ishod liječenja postignut je u većine bolesnika (70%) dok je nepovoljan ishod liječenja zabilježen u 30% bolesnika. Deset (27%) bolesnika imalo je povrat bolesti. Dva (6%) bolesnika su preminula tijekom terapije te nije zabilježen ishod liječenja.

## 7.2. Laboratorijski podaci

Bolesnici su najčešće imali anemiju koju je imalo 20 (54%) bolesnika, dok je trombocitopeniju imalo 18 (49%) bolesnika. Poremećaj u broju leukocita zabilježen je u 13 (36%) bolesnika od kojih je 5 (14%) imalo leukopeniju, dok je 8 (22%) imalo leukocitozu.

Normalna vrijednost LDH u serumu bolesnika zabilježena je u 23 (62%) bolesnika dok je povišena vrijednost zabilježena u 13 (35%) bolesnika, a jedan bolesnik (3%) nema podataka o vrijednosti LDH u serumu. U većine bolesnika (86%) je snižena vrijednost alkalne fosfataze, dok 6% ima povišene vrijednosti, a 8% njih nema podataka o vrijednosti alkalne fosfataze (Tablica 2).

Tablica 2. Laboratorijski podaci bolesnika s limfomom plaštene zone.

	Ukupan broj	%
Bolesnici	37	100
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )		
$\geq 3,4$	17	46
$< 3,4$	20	54
Leukociti ( $\times 10^9/L$ )		
$< 3,4$	5	14
$> 9,7$	8	22
Trombociti ( $\times 10^9/L$ )		
158-424	19	51
$< 158$	18	49
LDH (U/L)		
$< 240$	23	62
$> 240$	13	35
Nije rađena	1	3
Alkalna fosfataza (U/L)		
$< 142$	32	86
$> 142$	2	6
Nije rađena	3	8

### 7.3. Patohistološki podaci

Raspon ekspresije biljega Ki-67 u tumorskim stanicama bio je između 1% i 90% s medijanom 40%. Podijelivši bolesnike prema postotku ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama najviše bolesnika (57%) pripada skupini u kojoj je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 između 10 i 40% dok najmanje bolesnika (8%) pripada skupini u kojoj je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 ispod 10% (Tablica 3.).

Tablica 3. Ekspresija Ki-67 u tumorskim stanicama bolesnika s limfomom plaštene zone

Raspon	1-90%
Medijan	40%
<10%	3 (8%)
10-40%	21 (57%)
>40%	13 (35%)

### 7.4. Usporedba Ki-67 s drugim podacima

Rezultate dobivene o postotku ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 usporedili smo s rezultatima dobivenim o kliničkom stadiju, odabiru liječenja bolesnika, ishodu liječenja bolesnika i ishodom bolesti bolesnika s limfomom plaštene zone.

Usporedbom postotka ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 i kliničkog stadija bolesti dobili smo rezultate koji pokazuju da najviše bolesnika (42%) pripada skupini u kojoj je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 između 10% i 40% s kliničkim stadijem IV, također veliki dio bolesnika (24%) pripada skupini u kojoj je postotak ekspresije

proliferacijskog biljega Ki-67 iznad 40% s kliničkim stadijem IV (Tablica 4.). Međutim statističkom usporedbom Hi kvadrat testom nismo dobili statistički značajnu razliku u rezultatima ( $p=0.616$ ).

Tablica 4. Usporedba postotka ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 i kliničkog stadija bolesti.

Klinički stadij bolesti	Postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67		
	<10% N (%)	10-40% N (%)	>40% N (%)
I	1 (3)	1 (3)	1 (3)
II	0 (0)	1 (3)	1 (3)
III	1 (3)	3 (8)	2 (5)
IV	1 (3)	16 (42)	9 (24)

Usporedbom postotka ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 i odabira liječenja bolesnika s limfomom plaštene zone dobili smo rezultate koji pokazuju da su bolesnici kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama iznad 40% najčešće primili drugi kemoterapijski protokol (16%). Isto tako bolesnici s Ki-67 više od 40% češće su imali transplantaciju matičnih stanica (10%). Standardni kemoterapijski protokol najčešće su primili bolesnici kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama između 10 i 40% (43%) te bolesnici kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama ispod 10% (6%) (Tablica 5.). Usporedbom podataka pomoću Hi kvadrat statističkog testa navedena razlika nije statistički značajna ( $p=0.307$ ).

Tablica 5. Usporedba postotka ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 i vrste liječenja.

Vrsta liječenja	Postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67		
	<10% N (%)	10-40% N (%)	>40% N (%)
Standardni kemoterapijski protokol	2 (6)	16 (43)	3 (8)
Drugi kemoterapijski protokol	0 (0)	2 (6)	6 (16)
Transplantacija matičnih stanica	1 (3)	3 (8)	4 (10)

Uspoređujući podatke ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 s ishodom bolesti našli smo da je povoljan ishod imalo 2 bolesnika iz skupine I ( $Ki-67 \leq 10\%$ ), 12 bolesnika iz skupine II ( $Ki-67$  10-40%) i 5 bolesnika iz skupine III ( $Ki-67 > 40\%$ ). Nepovoljan ishod bolesti bio je najčešći u skupini III bolesnika ( $Ki-67 > 40\%$ ), a samo kod jednog bolesnika iz skupine I ( $Ki-67 < 10\%$ ). Razlike u ishodu među bolesnicima s različitim nivoom ekspresije Ki-67 biljega nisu statistički značajne ( $p=0.109$ ).

Tablica 6. Usporedba postotka ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 i ishoda liječenja bolesti.

Ishod liječenja	Postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67		
	<10% N (%)	10-40% N (%)	>40% N (%)
Povoljan ishod	2 (6)	12 (34)	5 (14)
Nepovoljan ishod	1 (3)	8 (23)	7 (20)

## 8. Rasprava

Podaci o glavnim podjelama, epidemiološkim obilježjima i općim karakteristikama limfoma nađeni u ovom istraživanju većinom odgovaraju podacima svjetske literature.

Među ispitanicima 78% bolesnika su stariji od 60 godina, a 70% bolesnika su muškog spola što odgovara literaturi koja navodi da se limfom plaštene zone češće javlja u muškaraca starijih od 60 godina (4,7). Naše istraživanje također je potvrdilo veći broj oboljelih muškaraca u odnosu na žene. Međutim, taj omjer u našem istraživanju je nešto manji i iznosi 2.36:1, a u pisanoj literaturi omjer iznosi 3:1 (3). U vrijeme dijagnosticiranja bolesti 70% bolesnika su bili u kliničkom stadiju IV što također odgovara podacima iz drugih studija kao i naši rezultati koji pokazuju da je 22% bolesnika imalo B simptome u odnosu na podatak iz literature da B simptome ima manje od 50% bolesnika (16).

Sukladno podacima iz literature u kojoj se navodi da 20-40% bolesnika ima povećan broj leukocita (10) mi smo u našem istraživanju zabilježili povećan broj leukocita u 22% bolesnika.

Proliferacijski biljeg Ki-67 jedan je od najvažnijih prognostičkih čimbenika za limfome plaštene zone, a osim toga smatra se da ima i značajnu ulogu u ishodu liječenja bolesti (15). Studije su dokazale da postoji statistički značajna povezanost između većeg postotka ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama i lošeg ishoda liječenja, te da postoji povezanost između postotka ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama i odabira liječenja bolesnika (15, 16). Rezultati u našem



istraživanju nisu u potpunosti potvrdili rezultate navedenih studija te pokazuju da 58% bolesnika kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 na tumorskim stanicama iznad 40% su imali nepovoljan ishod liječenja, a čak 67% bolesnika kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega ispod 10% su imali povoljan ishod liječenja, no rezultati nisu dosegli statističku značajnost.

Rezultati u našem istraživanju potvrđuju rezultate studija te pokazuju da se 77% bolesnika kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 iznad 40% liječilo agresivnije, dok se 67% bolesnika kod kojih je postotak ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 ispod 10% liječilo standardnim kemoterapijskim protokolom: R-CHOP ili kombinacijom protokola R-CHOP/R-DHAP, no razlike u navedenim skupinama nisu statistički značajne.

## **9. Zaključak**

Limfom plaštene zone pripada skupini agresivnih limfoma s čestim nepovoljnim ishodom liječenja standardnim kemoterapijskih protokolom što uključuje refraktornu ili progresivnu bolest, te upravo zbog toga bitno je odrediti prognostičke čimbenike koji nam mogu pomoći u odabiru bolje te možda agresivnije terapije kako bismo time poboljšali ishod liječenja. Iako u ovom istraživanju nismo dobili statistički značajne rezultate koji potvrđuju vezu ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 s ishodom liječenja ili odabirom liječenja, naš uzorak je bio malen te smatramo da potrebno je provesti daljnja istraživanja koja bi pomogla u izdvajanju bolesnika koje je potrebno liječiti

drugačijom terapijom što bi u konačnici pridonijelo većem broju povoljnih ishoda liječenja , a time i boljoj prognozi bolesti.

## **10. Zahvale**

Zahvaljujem mentorici dr.sc. Ivani Ilić na savjetima, stručnoj pomoći i vodstvu tijekom pripreme i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima na razumijevanju, strpljenju i podršci.

Zahvaljujem kolegici i prijateljici Kseniji Prodan na savjetima tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

## **11. Literatura**

- 1.Kumar P, Clark M (2012) Kumar and Clark clinical medicine. Edinburgh: Saunders.
2. Strayer DS, Rubin E (2015) Rubin's Pathology Clinicopathologic foundations of medicine. Philadelphia: Wolters Kluwer.

3. Dreyling M, Geisler C, Hermine O, Kluin-Nelemans H.C, Le Gouill S, Rule S, i sur. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014; 25 (3):83–92.
4. Aster JC, Pozdnyakova O, Kutok JL (2013) *Hematopathology*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
5. Longo DD, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Hauser SL, Loscalzo J (2012) *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division.
6. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971 Nov;31(11):1860-1.
7. Kumar V, Abbas AK, Aster JC (2013) *Robbins Basic Pathology*. Philadelphia: Elsevier/Saunders.
8. Klapper W, Hoster E, Determann O, Oschliesl, Van der Laak J, Berger F, i sur. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2009; 2: 103–111.
9. Furtado M, Rule S. Indolent mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2011;96(8):1086-88.
10. Abbasi M.R (2015) Mantle cell lymphoma Workup. Medscape. (pristupljeno 28.05.2016.) Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/203085-overview#a8>

11. Aurer I, Gašparov S, Kralik M, Balenović A, Huić D, Šantek F, i sur. Dijagnostika i liječenje limfoma- drugi hrvatski konsenzus. *Liječ Vjesn* 2013;135:63-76.
12. Pileri S.A, Falini B. Mantle cell lymphoma. *Haematologica* 2009;94(11):1488-92.
13. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, i sur. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:558-565.
14. Campo E. Prognostic factors in non-Hodkin's lymphomas. *Symposium* 1999;32(3):308-310.
15. Determann O, Hoster E, Ott G, Bernd H.W, Loddenkemper C, Hansmann M.L, i sur. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2008;111(4):2385-7.
16. Hoster E, Klapper W, Hermine O, Kluin-Nelemans H.C, Walewski J, Van Hoo A, i sur. Confirmation of the Mantle-Cell Lymphoma International Prognostic Index in Randomized Trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *JCO* 2014;32(3):1338-46.

## 12. Životopis

Rođena sam 05.03.1989. u Jajcu, Bosni i Hercegovini, gdje sam završila opću gimnaziju odličnim uspjehom. 2009. godine upisala sam Medicinski fakultet u Zagrebu gdje sam redovita studentica šeste godine. Demonstratorica sam tri godine iz predmeta Fiziologije i Imunologije te godinu dana iz predmeta Klinička mikrobiologija, parazitologija i virologija. Zadnje četiri godine honorarno radim u poliklinici Sinteza. Služim se engleskim i njemačkim jezikom. U slobodno vrijeme sudjelujem u rekreativnim trkačkim utrkama.