

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nikolina Žuljević**

**Mutacija gena *BRAF* V600E u leukemiji  
vlasastih stanica**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Dubrava pod vodstvom prof. dr. sc. Rajka Kušeca i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017./2018.

## POPIS KRATICA

ANC absolute neutrophil count, apsolutni broj neutrofila

BBA binding buffer, vezujući pufer

*BRAF* B-Raf protoonkogen

CLD cell lysis buffer, pufer za lizu stanica

CR complete response, potpuni odgovor

CWD column wash solution, otopina za ispiranje kolone

FDA The Food and Drug Administration, Američka agencija za hranu i lijekove

HCL hairy cell leukemia, leukemija vlasastih stanica

HCL-C classic hairy cell leukemia, klasična leukemija vlasastih stanica

HCL-V variant hairy cell leukemia, leukemiji vlasastih stanica sličan poremećaj

KKS kompletna krvna slika

MRD minimal residual disease, minimalna ostatna bolest ili minimalno aktivna bolest

ORR overall response rate, ukupna stopa odgovora

PA purine analogues, purinski analozi

PCR polymerase chain reaction, lančana reakcija polimerazom

PR partial response, djelomični odgovor

SDRPL splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma

TL triholeukemija

## SADRŽAJ

1. Sažetak .....	I
2. Summary .....	II
3. Uvod.....	1
3.1. Leukemija vlasastih stanica .....	1
3.1.1. Definicija.....	1
3.1.2. Epidemiologija i etiologija.....	1
3.1.3. Klinička slika .....	2
3.1.4. Dijagnostika .....	2
3.1.5. Liječenje.....	3
3.1.6. Prognoza .....	5
3.2. <i>BRAF</i> i BRAF protein kinaza .....	6
3.2.1. Definicija i uloga.....	6
3.2.2. <i>BRAF</i> V600E u patofiziologiji leukemije vlasastih stanica .....	6
3.2.3. Terapijska važnost .....	7
4. Hipoteza .....	8
5. Ciljevi rada .....	9
6. Ispitanici i metode .....	10
6.1. Ispitanici .....	10
6.2. Metode .....	12
7. Rezultati .....	16
8. Rasprava .....	26
9. Zaključci.....	30
10. Zahvala .....	31
11. Literatura .....	32
12. Životopis.....	37

## 1. Sažetak

Mutacija gena *BRAF* V600E u leukemiji vlasastih stanica

Nikolina Žuljević

Sveučilište u Zagrebu

Medicinski fakultet

Leukemija vlasastih stanica ili triholeukemija je rijetka, limfoproliferativna bolest s malobrojnim cirkulirajućim tumorskim stanicama u perifernoj krvi. Trihociti su stanice čiji su citoplazmatski izdanci nalik vlasima te karakteriziraju ovu bolest. TL je kronična tijeka i sporo progresivna, te dobro reagira na terapiju purinskim analogima koji su standard u liječenju. Bolest uglavnom zahvaća slezenu, a limfni čvorovi su pošteđeni. TL je povezana s mutacijom *BRAF* gena i to s najčešćom mutacijom gena, *BRAF* V600E. Ta mutacija dovodi do konstitutivne aktivnosti RAS-RAF-MEK-ERK signalnog puta i do proliferacije stanica. *BRAF* mutacije do sad su povezane s brojnim malignomima, a najčešće s melanomom. Otkriće povezanosti triholeukemije s *BRAF* mutacijom donosi mogućnosti za novu terapiju BRAF inhibitorima, vemurafenibom i dabrafenibom, te praćenje bolesti uz pomoć RT-PCR metode. U ovom istraživanju analizirano je 15 ispitanika dijagnosticiranih s TL-om u KB Dubrava, u Zagrebu. Korišteni su uzorci periferne krvi i koštane srži uklopljene u parafin. U istraživanju se utvrđivalo postojanje *BRAF* V600E mutacije u oboljelih te ocjenjivala uloga alel specifičnog RT-PCR-a u praćenju bolesti i otkrivanju minimalne ostatne bolesti. Zaključeno je da je RT-PCR metoda dovoljno osjetljiva za otkriće mutacije u aktivnoj bolesti te relapsu, a slabije osjetljiva u remisiji bolesti te kod minimalno aktivne bolesti. Povećan postotak limfocita u perifernoj krvi u ispitanika se pokazao kao dobar prediktor utvrđivanja *BRAF* V600E mutacije.

Ključne riječi: triholeukemija, leukemija vlasastih stanica, *BRAF*, *BRAF* V600E, RAS-RAF-MEK-ERK, vemurafenib, alel specifični RT-PCR

## 2. Summary

### *BRAF* V600E gene mutation in hairy cell leukemia

Nikolina Žuljević

University of Zagreb

School of Medicine

Hairy cell leukemia, also called trycholeukemia, is a rare lymphoproliferative disorder with few circulating tumor cells in the peripheral blood. Hairy cells, characteristic of this disorder, are cells that have hair-like cytoplasmic projections. HCL has a chronic course. It is slowly progressive and has a good response to the standard treatment with purine analogues. Usually it affects the spleen, and lymph nodes are spared. HCL is associated with the *BRAF* gene mutation, more precisely with the most common, *BRAF* V600E mutation. That mutation leads to the constitutive activity of the RAS-RAF-MEK-ERK signal pathway and cell proliferation. *BRAF* mutations are related to many malignomas, but most commonly to melanoma. The discovery of the association between the HCL and the *BRAF* mutation lead to new possibilities in the treatment of the disorder, such as BRAF inhibitors, vemurafenib, and dabrafenib, as well as the possibility to follow up the disease with the RT-PCR method. In our study, 15 patients diagnosed with HCL were analyzed in the Clinical Hospital Dubrava in Zagreb. We used peripheral blood samples and samples of bone marrow embedded in paraffin. In this study we tried to detect the *BRAF* V600E mutation in patients diagnosed with HCL, and we also evaluated the allele-specific RT-PCR in the follow up of the disease and in the detection of the minimal residual disease. We concluded that the RT-PCR method is sensitive enough to detect the mutation in the active disease and in the relapse, but is less sensitive in the remission and in the minimal residual disease. A high percentage of lymphocytes in the peripheral blood has proved to be a good predictor of the *BRAF* V600E mutation.

Keywords: hairy cell leukemia, trycholeukemia, *BRAF*, *BRAF* V600E, RAS-RAF-MEK-ERK, vemurafenib, allele-specific RT-PCR

### 3. Uvod

#### 3.1. Leukemija vlasastih stanica

##### 3.1.1. Definicija

Leukemija vlasastih stanica ili triholeukemija je rijetka, limfoproliferativna bolest obilježena proliferacijom morfološki karakterističnih stanica, podrijetla zrelih limfocita B, s citoplazmatskim izdancima nalik vlasima (Tiacci E i sur., 2006. i 2017.). Leukemija vlasastih stanica uzrokovana je točkastom mutacijom *BRAF* gena, zbog koje dolazi do zamjene timina adeninom te zamjene valina glutaminskom kiselinom na poziciji 600 u *BRAF* proteinu (Tiacci E i sur., 2017.). Stoga je ta serin-treonin protein kinaza konstitutivno aktivna i dovodi do trajne aktivnosti RAS-RAF-MEK-ERK signalnog puta (Tiacci E i sur., 2011. i 2017.; Muller D, 2012.; Falini B i sur., 2016.). Bolest se manifestira pancitopenijom i rijetkim cirkulirajućim tumorskim stanicama u krvi, a u statusu splenomegalijom, odsustvom limfadenopatije, infiltracijom i posljedičnom fibrozom koštane srži te rjeđe infiltracijom jetre i hepatomegalijom (Tiacci E i sur., 2017.).

##### 3.1.2. Epidemiologija i etiologija

Triholeukemija čini oko 2% svih leukemija (Kreitman RJ, Pastan I, 2015.). Incidencija joj je niska i iznosi 0.3 na 100.000 osoba godišnje. Prevalencija je viša budući da bolest dobro odgovara na terapiju, pa bolesnici dugo žive s dijagnozom ili nakon izlječenja, ali se često javljaju recidivi. Zato je broj ukupno oboljelih veći nego broj novooboljelih u nekom vremenskom razdoblju. (Kreitman RJ, Pastan I, 2015.; Tiacci E i sur., 2017.) TL se češće javlja u muškaraca nego u žena, u omjeru 4:1-5:1 (Troussard X, Cornet E, 2017.). Javlja se uglavnom u bijelaca i u dobi od oko 50 godina (Tiacci E i sur., 2006.).

Etiologija bolesti nije utvrđena, no smatra se da izloženost pesticidima, herbicidima, dizelu, proizvodima od petroleja ili ionizirajućem zračenju povećava rizik od obolijevanja (Tadmor T, Polliack A, 2015.). Nije utvrđena poveznica između pušenja i TL-a, nego je uočen manji rizik obolijevanja kod pušača (Tadmor T, Polliack A, 2015.).

### 3.1.3. Klinička slika

TL je bolest koja počinje podmuklo i sporog je tijeka, a prezentira se najčešće simptomima slabosti i umora (Cannon T i sur., 2008.; Quest GR, Johnston JB, 2015.). U 80% pacijenata javlja se splenomegalija, uglavnom masivna, i bol u gornjem, lijevom abdominalnom kvadrantu, rjeđe hepatomegalija te izrazito rijetko periferna limfadenopatija (Cannon T i sur., 2008.; Tiacci E i sur., 2011; Quest GR, Johnston JB, 2015.). Često se javljaju oportunističke infekcije i one su najčešći uzrok smrti kod leukemije vlasastih stanica (Cannon T i sur., 2008.; Quest GR, Johnston JB, 2015.; Wierda WG i sur., 2017.). Zbog infiltracije koštane srži i fibroze te stoga smanjene hematopoeze, ali i hipersplenizma, javlja se pancitopenija i simptomi vezani uz anemiju, trombocitopeniju, neutropeniju te monocitopeniju (Cannon T i sur., 2008.; Quest GR, Johnston JB, 2015.; Wierda WG i sur., 2017.). Limfocitoza u krvi je prisutna u 7% slučajeva triholeukemije (Quest GR, Johnston JB, 2015.). Bolesnici s TL-om imaju povećan rizik za razvoj sekundarnih malignoma (Cannon T i sur., 2008.; Troussard X, Cornet E, 2017.). Rijetke su infiltracije središnjeg živčanog sustava, osteolitičke lezije kostiju i pojava autoimunih poremećaja poput purpura ili artralgijske (Quest GR, Johnston JB, 2015.).

### 3.1.4. Dijagnostika

Dijagnoza se postavlja uglavnom na temelju kliničke slike, KKS-a, razmaza periferne krvi, imunofenotipizacije protočnom citometrijom te biopsije koštane srži i imunohistokemijskog bojanja (Wierda WG i sur., 2017.; Cannon T i sur., 2008.). U statusu tipično nalazimo splenomegaliju te nema periferne limfadenopatije, u KKS-u nalazimo pancitopeniju, a razmazom periferne krvi nalaze se karakteristične stanice s vlasastim izdancima (Grever MR i



sur., 2017.). Imunofenotipski stanice su CD11C, CD19, CD20, CD22, CD25, CD103, CD123, CD200 pozitivne, a CD5, CD10, CD21, CD23, CD27, CD79b negativne (Grever MR i sur., 2017.; Cannon T i sur., 2008.; Troussard X, Cornet E, 2017.). Po jedan bod dodjeljuje se kad je pozitivan neki od markera CD11C, CD25, CD103, CD123, a ukupni zbroj od tri do četiri boda smatra se važnim za dijagnozu triholeukemije (Troussard X, Cornet E, 2017.). Biopsijom koštane srži utvrđuje se stupanj infiltracije vlasastim stanicama i stupanj fibroze, a imunohistokemijskim bojanjem se utvrđuje postojanje antigena CD20, CD25, CD76, CD123, aneksina A1 te mutacije *BRAF* V600E (Grever MR i sur., 2017.; Troussard X, Cornet E, 2017.). Molekularnim testovima, poput alel specifičnog RT-PCR, ili imunohistokemijskim testovima, može se utvrditi *BRAF* V600E mutacija, što je korisno u slučajevima kad nema odgovora na standardnu terapiju purinskim analogima ili kod brojnih relapsa (Falini B i sur., 2016.; Grever MR i sur., 2017.).

### 3.1.5. Liječenje

Važno je razlikovati klasičnu HCL od bolesti sličnih HCL, kao što su varijantni oblik HCL i SDRPL, jer imaju različite mutacije, slabiji odgovor na purinske analoge i zahtijevaju drukčiji pristup u terapiji (Troussard X, Cornet E, 2017.). Bolest karakterizira dugo vrijeme remisije s izglednim relapsima (Getta BM i sur., 2015.). Asimptomatski pacijenti ne zahtijevaju terapiju već treba čekati i pratiti ih (Troussard X, Cornet E, 2017.). Terapiju trebaju pacijenti s izraženim simptomima, s hematološkim parametrima: hemoglobin <11 g/dL, broj trombocita <100 000/ $\mu$ L, ANC <1000/ $\mu$ L, s progresivnom limfocitozom, oportunističkom infekcijom, simptomatskom organomegalijom ili limfadenopatijom (Troussard X, Cornet E, 2017.; Wierda WG i sur., 2017.; Grever MR i sur., 2017.). U prošlosti su u terapiji korišteni interferon alfa i splenektomija, no danas su prva linija terapije purinski analozi, pentostatin i kladribin, koji inhibiraju sintezu DNA i dovode do smrti stanica (Getta BM i sur., 2015.; Cannon T i sur., 2008.). PA dovode do imunosupresije, ali kladribin nešto više, pa se ne

koristi kod aktivnih infekcija (Grever MR i sur., 2017.). Kladribin se uobičajeno primjenjuje kontinuiranom intravenskom infuzijom 0.09-0.1 mg/kg tijekom sedam dana, 0.12-0.14 mg/kg dvosatnom iv. infuzijom 5 do 7 dana, ili 0.1 mg/kg na dan supkutano 5 do 7 dana, a pentostatin 4 mg/m<sup>2</sup> iv. svaki drugi tjedan s ukupno osam do dvanaest doza (Robak T i sur., 2015.; Sarvaria A i sur., 2015.; Grever MR i sur., 2017.). Smatra se da nema veće razlike u učinkovitosti kladribina i pentostatina, te je njihov ORR 90-100%, a CR 80-85% (Getta BM i sur., 2015.; Falini B i sur., 2016.; Grever MR i sur., 2017.). Čak 90% pacijenata doživi relaps nakon devet godina praćenja (Getta BM i sur., 2015.). Danas se splenektomija koristi kad dođe do teške trombocitopenije, a interferon alfa kao dodatna terapiju kod relapsa (Sarvaria A i sur., 2015.).

Kod prvog relapsa, koji se javi nakon više od pet godina, koristi se isti PA korišten u prvom liječenju ili neki drugi PA, a u slučaju prvog relapsa nakon dvije do pet godina koristi se PA uz rituksimab, monoklonsko protutijelo na CD20 (Troussard X, Cornet E, 2017.). Kod prvog relapsa koji se javi nakon manje od dvije godine ili nakon drugog relapsa valja provjeriti postoji li *BRAF* V600E mutacija (Troussard X, Cornet E, 2017.). U slučaju da postoji *BRAF* mutacija koriste se *BRAF* inhibitori, vemurafenib ili dabrafenib, te se uz njih može koristiti MEK inhibitor, trametinib, za bolji odgovor ili ukoliko dođe do rezistencije na *BRAF* inhibitore (Troussard X, Cornet E, 2017.; Tiacci i sur., 2017.). Vemurafenib se daje dva puta na dan u dozi 960 mg per os 16 do 18 tjedana i ima ORR 96-100%, a CR 35% (Falini B i sur., 2016.; Tiacci i sur., 2017.).

#### 3.1.5.1. Odgovor na terapiju

Odgovor na terapiju može biti potpun ili djelomičan, a potpuni odgovor s ili bez MRD (Grever MR i sur., 2017.; Robak T i sur., 2015.). MRD ili minimalna ostatna bolest se utvrđuje protočnom citometrijom ili imunohistokemijski (Grever MR i sur., 2017.). RT-PCR se također pokazao kao dovoljno osjetljiva metoda za detekciju MRD (Schnittger S i sur.,

2012.). MRD povezana je s većim rizikom za relaps (Troussard X, Cornet E, 2017.; Grever MR i sur., 2017.). Potpuni odgovor znači gubitak simptoma, normalizaciju hematoloških parametara (hemoglobin >11 g/dL, trombociti >100 000/ $\mu$ L, ANC >1500/ $\mu$ L, smanjenje broja limfocita), odsustvo splenomegalije pri palpaciji te odsustvo vlasastih stanica u perifernoj krvi i u koštanoj srži (Troussard X, Cornet E, 2017.; Grever MR i sur., 2017.; Getta BM i sur., 2015.). PR predstavlja normalizaciju hematoloških parametara, <5% trihocita u perifernoj krvi te minimlano 50% smanjenje organomegalije i infiltracije koštane srži trihocitima (Robak T i sur., 2015.). Provjera odgovora na terapiju vrši se biopsijom koštane srži 4 do 6 mjeseci nakon terapije kladribinom, a nakon terapije pentostatinom odmah nakon vidljivog kliničkog odgovora (Grever MR i sur. 2017; Troussard X, Cornet E, 2017.).

#### 3.1.6. Prognoza

Splenomegalija veća od 3 centimetra, leukocitoza >10x10<sup>9</sup>/L, trihociti u krvi >5x10<sup>9</sup>/L i visok beta<sub>2</sub>-mikroglobulin u krvi povezani su s lošom prognozom i odgovorom na PA (Troussard X, Cornet E, 2017.). S lošijom prognozom bolesnika povezana je i starija dob, niska koncentracija hemoglobina, trombocitopenija, leukopenija, limfadenopatija, splenektomija, prethodno liječenje, kraće vrijeme od dijagnoze do terapije te nemutirani *IGHV* gen (Thompson PA, Ravandi F, 2017.).

### 3.2. *BRAF* i BRAF protein kinaza

#### 3.2.1. Definicija i uloga

*BRAF* je protoonkogen na kromosomu sedam, čiji je produkt BRAF protein, serin treonin kinaza (Richtig G i sur., 2017.; Tiacci E i sur., 2017.). BRAF serin treonin kinaza dio je signalnog puta RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) koji ima ulogu u rastu stanice, staničnoj proliferaciji, diferencijaciji, preživljavanju i migraciji (Lavoie H, Therrien M, 2015.). Mutacije *BRAF* gena do sad su povezane s brojnim tumorima, kao što su melanom, papilarni karcinom štitnjače i kolorektalni karcinom, a kao najčešća mutacija javlja se *BRAF* V600E (Richtig G i sur., 2017.; Sanz-Garcia E i sur., 2017.; Muller D, 2012.). MAPK signalni put počinje aktivacijom RAS-a nakon vezanja faktora rasta za tirozin kinazne receptore, nakon toga RAS aktivira BRAF koji zatim fosforilacijom aktivira MEK, a on dalje aktivira ERK (Muller D, 2012.).

#### 3.2.2. *BRAF* V600E u patofiziologiji leukemije vlasastih stanica

*BRAF* V600E je točkasta mutacija *BRAF* gena, u kojoj dolazi do zamjene timina adeninom na poziciji 1799 egzona 15 i time zamjene valina glutaminskom kiselinom na kodonu 600 BRAF proteina (Falini B i sur., 2016.; Jain P i sur., 2014.). Tom mutacijom BRAF protein kinaza je trajno aktivna i neovisna o RAS-u i dovodi do konstitutivne aktivnosti signalnog puta MAPK (Cornet E i sur., 2015.; Jain P i sur., 2014.). BRAF protein kinaza mutacijom doživi promjenu u G petlji aktivacijskog segmenta i stoga može vezati monomere MEK, konstitutivno je aktivna i ne odgovara na negativnu povratnu spregu djelovanjem ERK-a (Hall RD, Kudchadkar, 2014.). Dokazana je povezanost *BRAF* V600E mutacije i povećane razine fosforiliranog i time aktivnog ERK-a (Tiacci E i sur., 2013.). U MAPK signalnom putu RAS je G-protein s unutarnje strane stanične membrane te fosforilira RAF (Dhomen N, Marais R, 2009.). RAF, MEK 1 i 2 te ERK 1 i 2 su protein kinaze, koje jedna drugu u kaskadi aktiviraju, a ERK djeluje preko transkripcijskih i drugih čimbenika na proliferaciju i preživljavanje

stanica (Dhomen N, Marais R, 2009.; Tiacci E i sur., 2017.). Ciljana terapija, u obliku BRAF i MEK inhibitora, počela se koristiti kod liječenja melanoma s utvrđenom *BRAF* V600E mutacijom i pokazala se uspješnom (Muller D, 2012.; Rozeman EA i sur., 2017.).

### 3.2.3. Terapijska važnost

Od terapijske su važnosti *BRAF* V600E mutacija i konstitutivna aktivnost MAPK signalnog puta budući da se u terapiji mogu koristiti inhibitori puta koji dovode do njegova stišavanja, defosforilacije MEK-a i ERK-a, gubitka tipične morfologije trihocita i na kraju smrti stanice (Jain P i sur., 2014.; Tiacci E i sur., 2017.). Od FDA su za liječenje melanoma odobreni BRAF inhibitori, vemurafenib i dabrafenib, uz koje se često daje MEK inhibitor, trametinib, zbog pojave rezistencije kod monoterapije (Karoulia Z i sur., 2017.). Mehanizmi rezistencije koji se pojavljuju su aktivacija tirozin kinaznih receptora interakcijom s mikrookolišnim faktorima i aktivacija MAPK-a preko CRAF-a, N-RAS mutacije, mutacije MEK-a, amplifikacija *BRAF* mutiranog gena ili njegovo alternativno izrezivanje i stvaranje kinaza koje mogu izbjeći djelovanje inhibitora (Falini B i sur., 2016.). Vemurafenib je oralni inhibitor BRAF kinaze i ima paradoksalni učinak kod stanica bez *BRAF* V600E mutacije te aktivira signalni put MAPK-a (Fiskus W, Mitsiades N, 2016.). Vemurafenib u TL-u ima koristan učinak kod pacijenata s refraktornom TL-u, TL-u s ranim relapsom, kod aktivne infekcije i prethodno neuspješne terapije drugim lijekovima (Dietrich S, Zenz T, 2015.). Vemurafenib je važan kao nova terapija zbog učestalih relapsa pri korištenju purinskih analoga kao standardne terapije, te zbog mijelotoksičnog i imunosupresivnog djelovanja PA (Pettirossi V i sur., 2015.). Nuspojave koje se javljaju kod terapije vemurafenibom su osip, artralgijska, fotosenzitivnost, pruritus, sekundarni tumori kože, pireksija, porast razine bilirubina, porast razine aminotransferaza, palmarna i plantarna hiperkeratoza (Robak T i sur., 2015.; Tiacci E i sur., 2015.)

#### 4. Hipoteza

U ovom istraživanju polazimo od hipoteze da je u svih pacijenata s klasičnom leukemijom vlasastih stanica prisutna *BRAF* V600E mutacija te da je RT-PCR metoda dovoljno osjetljiva za detekciju te mutacije.

## 5. Ciljevi rada

1. Dokazati da svi pacijenti s klasičnom leukemijom vlasastih stanica posjeduju *BRAF* V600E mutaciju.
2. Procijeniti test alel specifičnog RT-PCR za *BRAF* V600E mutaciju kod praćenja bolesti i kod minimalne ostatne bolesti.

## 6. Ispitanici i metode

### 6.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno petnaest ispitanika. Svi ispitanici su muškarci. Ispitanicima je leukemija vlasastih stanica dijagnosticirana u razdoblju od 1987. do 2017. U Tablici 1. prikazani su prikupljeni podaci o ispitanicima. Medijan dobi ispitanika pri dijagnozi bolesti je 54 godine. Maksimum dobi pri dijagnozi je 75 godina, a minimum 34 godine. Svi su ispitanici već prethodno dijagnosticirani s leukemijom vlasastih stanica te su bili liječeni nekom od terapijskih mogućnosti, uglavnom sa standardnom terapijom purinskim analogima (v. Tablicu 1. ). Medijan vremenskog razdoblja od dijagnoze bolesti do danas u ispitanika uključenih u istraživanje je sedam godina. Kao što se vidi u Tablici 1., dvoje ispitanika je splenektomirano, jedan od njih uzima rituksimab od petog mjeseca 2017., preostali su liječeni kladribinom te je dvoje pod opservacijom. U vrijeme testiranja u šestero ispitanika bolest je u remisiji, no u jednog od njih bolest je u parcijalnoj remisiji. Četvero ispitanika ima aktivnu bolest, a jedan ispitanik ima minimalno aktivnu bolest, tj. minimalnu ostatnu bolest. U četvero ispitanika bolest je u relapsu. Medijan vremenskog razdoblja od dijagnoze bolesti do relapsa u ispitanika s relapsom bolesti je 8.5 godina.



Tablica 1. Prikaz podataka o ispitanicima

- Nedostupan podatak, M- Muškarac, IB- Identifikacijski broj

IB	Spol ispitanika	Dob pri dijagnozi	Godina postavljanja dijagnoze	Liječenje	Status bolesti u vrijeme testiranja
1	M	60	2009.	Kladribin 2009.	Remisija
2	M	48	2011.	Kladribin 2011.	Remisija
3	M	72	2011.	Kladribin 2011.	Remisija
4	M	67	2009.	Splenektomija 2012.	Relaps 2012.
5	M	34	2016.	Kladribin 2016.	Aktivna bolest
6	M	69	2017.	Opservacija	Aktivna bolest
7	M	45	1987.	Splenektomija 1987., Rituksimab 2017.	Relaps 2017.
8	M	75	2014.	Kladribin 2015.	Aktivna bolest
9	M	50	2014.	Kladribin 2014.	Aktivna bolest
10	M	72	2011.	Opservacija	Minimalno aktivna bolest
11	M	46	2003.	Kladribin 2003.	Relaps 2017.
12	M	58	2014.	Kladribin 2014.	Relaps 2016.
13	M	51	2008.	Kladribin 2008.	Parcijalna remisija
14	M	54	2016.	Kladribin 2016.	Remisija
15	M	47	2006.	-	Remisija

## 6.2. Metode

Da bi se utvrdilo postojanje *BRAF* V600E mutacije korišten je alel specifični RT-PCR test pomoću Aria MX RT PCR System. Za to je upotrijebljena DNA izolirana iz periferne krvi te iz koštane srži uklopljene u parafin. DNA iz krvi izolirana je pomoću ReliaPrep gDNA Tissue Miniprep System, koji sadži proteinazu K, Cell Lysis Buffer, Binding Buffer, Column Wash Solution, vodu bez nukleaza te RNazu A. Potrebna količina početnog materijala iznosi 200  $\mu$ L ako se radi o krvi, plazmi ili serumu. Uzorak koji je pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$  treba se zagrijati na sobnu temperaturu. U epruvetu s 20  $\mu$ L proteaze doda se 200  $\mu$ L uzorka te 200  $\mu$ L CLD-a i vorteksira se približno 15 sekundi. Zatim se inkubira na  $56^{\circ}\text{C}$  kroz deset minuta te kratko centrifugira da se uklone kapljice s čepa epruvete. Sljedeće se doda 20  $\mu$ L RNaze, vorteksira se 15 sekundi, pa inkubira na  $56^{\circ}\text{C}$  kroz 10 minuta te kratko centrifugira. Tome se doda 250  $\mu$ L BBA-a, vorteksira 15 sekundi i kratko centrifugira. Smjesa se prenosi na spin kolonu i centrifugira minutu na sobnoj temperaturi. Tubica s filtratom se baci. Spin kolona stavi se u čistu kolekcijsku tubicu i doda se 500  $\mu$ L CWD-a te centrifugira 3 minute na sobnoj temperaturi. Spin kolona se ponovno stavi u čistu kolekcijsku tubicu, a tubica s filtratom baci. Posljednji korak s CWD-om ponovi se još dva puta kako bi se membrana isprala ukupno tri puta. Spin kolona se stavi u čistu epruvetu, tubica s filtratom baci. U spin kolonu se doda 200  $\mu$ L vode bez nukleaze, inkubira se na sobnoj temperaturi jednu do pet minuta te se zatim centrifugira jednu minutu. Pri tome eluat prolazi membranu, te se dobije uzorak s izoliranom DNA.

Izolaciju DNA fiksiranu formalinom i uklopljnu u parafin vršimo pomoću FFPE Tissue kit-a. Kao početni materijal koristi se svježi parafinski rez debljine do 10  $\mu\text{m}$ . Reagensi koji se koriste su Histo-clear ili ksilol, 96-100% etanol, proteinaza K, ATL pufer, AL pufer, AW1 i AW2 pufer. Sam postupak kreće odstranjenjem viška parafina s parafinske kocke i rezanjem kocke na najviše osam rezova debljine 5 do 10  $\mu\text{m}$ . Rezovi se stave u sterilnu epruvetu u koju

se još doda Histo-clear te se sve vorteksira 10 sekundi. Nakon toga se centrifugira dvije minute na sobnoj temperaturi. Ukloni se supernatant, doda 1 mL etanola na pelet, vorteksira se te centrifugira dvije minute na sobnoj temperaturi. Ponovno se odstrani supernatant, otvori se tubica i inkubira na sobnoj temperaturi kako bi ispario etanol, no može se i zagrijavati na 37°C tijekom 10 minuta. Pelet resuspendiramo pomoću 180 µL ATL pufera, dodamo 20 µL proteinaze K, vorteksiramo te zatim inkubiramo na 56°C oko jedan sat ili dok ne dođe do lize uzorka. Uzorak potom inkubiramo na 90°C tijekom jednog sata u termobloku ispravljajući tako modifikacije na DNA nastale djelovanjem formaldehida. Uzorak zatim kratko centrifugiramo, dodamo 200 µL AL pufera i vorteksiramo 15 sekundi. Sljedeće dodajemo 200 µL etanola te opet vorteksiramo 15 sekundi i kratko centrifugiramo. Dobiveni uzorak prenosimo na QIAamp MinElute spin kolonu, centrifugiramo minutu na sobnoj temperaturi. Nakon toga prebacimo spin kolonu u čistu kolekcijsku tubicu, a onu s filtratom bacimo. U spin kolonu dodamo 500 µL AW1 pufera, centrifugiramo 1 minutu na sobnoj temperaturi ponovno te spin kolonu premjestimo u čistu kolekcijsku tubicu dok onu s filtratom bacimo. 500 µL AW2 pufera dodaje se spin koloni te se centrifugira tri minute na sobnoj temperaturi. Spin kolonu stavljamo u čistu epruvetu, a epruvetu s filtratom bacamo. U idućem koraku se na spin kolonu dodaje 20 do 100 µL ATE pufera. Uzorak se inkubira 1 do 5 minuta na sobnoj temperaturi te se pri istoj temperaturi još centrifugira jednu minutu. Uzorci se naposljetku pohranjuju na temperaturi od -20°C.

Nakon izolacije u samom uzorku se provjerava koncentracija DNA te čistoća uzorka. Kao zadovoljavajuća koncentracija uzima se koncentracija DNA iznad 10 ng/µL, a za čistoću OD<sub>260/280</sub> uzima se od 1.8 do 2.0. Sam proces vrši se pomoću spektrofotometrije na uređaju Shimadzu biotech BioSpec-nano spektrofotometar.

Dokazivanje mutacije *BRAF* gena provodi se pomoću qPCR-a u realnom vremenu diskriminirajući mutirani i nemutirani alel s fluorescentno obilježenim probama za normalni i

mutirani alel. Analitička osjetljivost qPCR-a je 1:1 000 000, a specifičnost je ukoliko pozitivna kontrola daje signal mutiranog i nemutiranog alela, a uzorak koji ne sadrži mutaciju daje signal samo normalnog alela. Reagensi koji se pri tome koriste su TaqMan Universal PCR Master Mix, oligonukleotidni primeri i fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe te destilirana voda. Primeri su *BRAF*-51F te *BRAF*-176R, a probe *BRAF* wild obilježen VIC bojom te *BRAF* mutant obilježen FAM bojom. U reakcijama se koristi pozitivna kontrola tj. uzorak s *BRAF* V600E mutacijom, kontrola specifičnosti tj. uzorak koji nema mutaciju te negativna kontrola za PCR, voda. Reakcija je valjana ako pozitivna kontrola daje signal, a kontrola specifičnosti i voda ne daju. U postupku se načini reakcijska smjesa od 1.5 µL primera *BRAF*-51F, 1.5 µL primera *BRAF*-176R, 0.5 µL probe FAM *BRAF* mutanta, 0.5 µL probe VIC *BRAF* wild, 12.5 µL Taqman Universal PCR Master Mix-a te 3.5 µL destilirane vode. U reakcijsku smjesu od ukupno 20 µL dodaje se 5 µL DNA. Svi uzorci idu u triplikatu. Smjesa zatim ide na proces umnažanja koji se sastoji od taljenja, na 95°C 10 minuta pri čemu se aktivira enzim i provodi se u 1 ciklusu, te od PCR ciklusa. PCR ciklus sastoji se od djelovanja temperature od 92°C na 15 sekundi te djelovanja temperature od 60°C 60 sekundi kad dolazi do elongacije, te pri kojem se mjeri fluorescencija. PCR ciklus se ponavlja 50 puta. Rezultati mogu pokazivati nemutirane homozigote, mutirane homozigote te heterozigote. Kad se radi o nemutiranim homozigotima poraste fluorescencija hidrolizom probe za divlji tip (VIC). Kad se radi o mutiranim homozigotima poraste fluorescencija hidrolizom probe za mutantni tip (FAM). Kod heterozigota dolazi do porasta fluorescencije hidrolizom obju proba. Razlozi pojave varijabilnosti rezultata jesu različita kvaliteta materijala za uzorkovanje, kvaliteta i količina izolirane DNA te učinkovitost qPCR-a.

Pri statističkoj obradi podataka korišten je Mann-Whitney U Test. Kao statistički značajne uzimale su se P vrijednosti manje od 0.05. Pomoću testa prikazana je distribucija vrijednosti

broja leukocita, broja trombocita, koncentracije hemoglobina i postotka limfocita u perifernoj krvi u ovisnosti o dokazu prisutnosti *BRAF* V600E mutacije.

## 7. Rezultati

Od petnaest ispitanika dijagnosticiranih s leukemijom vlasastih stanica u sedam je dokazana *BRAF* V600E mutacija kvalitativnom metodom RT-PCR. U devetero ispitanika su korišteni samo uzorci periferne krvi, pri čemu je mutacija dokazana u četiri od devet ispitanika. U dvoje ispitanika korišteni su samo uzorci koštane srži i u oba slučaja mutacija je dokazana. U dvoje ispitanika korišteni su uzorci i periferne krvi i koštane srži. U jednog od njih mutacija nije dokazana ni u jednom od uzoraka. Od šestero ispitanika s remisijom bolesti u samo jednog je dokazana mutacija, čija je bolest u parcijalnoj remisiji. Od četvero ispitanika s relapsom u dvoje je dokazana mutacija. Od četvero ispitanika s aktivnom bolešću u svih četvero je potvrđena mutacija. U jednog ispitanika s minimalnom aktivnom bolešću nije dokazana mutacija. U Tablici 2. prikazani su rezultati ispitivanja uz status bolesti u vrijeme testiranja te uzorci koji su pri testiranju korišteni.

Za sažeti prikaz laboratorijskih parametara i rezultata analize te statusa bolesti u vrijeme analize, pogledaj Tablicu 3. U petero ispitanika je pronađena leukopenija. Od njih petero s leukopenijom u troje je dokazana *BRAF* mutacija. Ispitanici s leukopenijom su dvoje s aktivnom bolešću, dvoje s relapsom bolesti i jedan s PR. U dvoje ispitanika prisutna je leukocitoza. U oba ispitanika s leukocitozom dokazana je *BRAF* mutacija i imaju aktivnu bolest. U devetero ispitanika je snižena koncentracija hemoglobina, a od njih devetero u šestero je dokazana *BRAF* mutacija. Od njih devetero sa sniženom koncentracijom hemoglobina sedmero ima aktivnu bolest ili bolest u relapsu, dvoje ispitanika ima bolest u remisiji, a jedna od remisija je parcijalna. U jedanaestero ispitanika je prisutna trombocitopenija, a od njih jedanaestero u sedmero je dokazana *BRAF* mutacija. Od sedam ispitanika u kojih je prisutna trombocitopenija i dokazana mutacija, šestero ima aktivnu bolest ili relaps, a jedan ispitanik ima bolest u parcijalnoj remisiji. Trombocitopenija je bila prisutna u svih ispitanika s aktivnom bolešću i relapsom bolesti, te u parcijalnoj remisiji.

Trombocitopenija nije bila prisutna u troje ispitanika s remisijom te u ispitanika s MRD. Postotak limfocita u perifernoj krvi povišen je u sedam ispitanika od njih petnaest. U svih sedam ispitanika s povećanim postotkom limfocita u krvi potvrđena je prisutnost *BRAF* mutacije. Gotovo svi ti ispitanici, tj. njih šestero od sedam ima aktivnu bolest ili bolest u relapsu. Samo jedan od njih ima bolest u parcijalnoj remisiji. Postotak limfocita u perifernoj krvi u ovom istraživanju pokazao se kao vrlo dobar pokazatelj mogućnosti dokaza *BRAF* V600E mutacije. Od petnaest ispitanika u petero je palpabilna slezena, s tim da je dvoje od petnaest ispitanika splenektomirano ranije. Od petero ispitanika s palpabilnom slezenom u troje je dokazana mutacija. Od njih petero, troje ispitanika ima aktivnu bolest, a dvoje ispitanika ima bolest u relapsu.

Tablica 2. Prikaz ispitanika, njihova statusa bolesti u vrijeme testiranja i rezultati testiranja za *BRAF* V600E mutaciju

IB-identifikacijski broj, PK-periferna krv, KS-koština srž, M-muškarac

IB	SPOL ISPITANIKA	STATUS BOLESTI U VRIJEME TESTIRANJA	<i>BRAF</i> V600E MUTACIJA	GODINA TESTIRANJA I UZORAK
1	M	Remisija	NEGATIVAN	2018.; PK
2	M	Remisija	NEGATIVAN	2017.; PK
3	M	Remisija	NEGATIVAN	2018.; PK
4	M	Relaps	POZITIVAN	2012.; PK
5	M	Aktivna bolest	POZITIVAN	2016.; PK/KS
6	M	Aktivna bolest	POZITIVAN	2017.; PK
7	M	Relaps	POZITIVAN	2017.; PK
8	M	Aktivna bolest	POZITIVAN	2014.; KS
9	M	Aktivna bolest	POZITIVAN	2014.; KS
10	M	Minimalno aktivna bolest	NEGATIVAN	2017.; PK
11	M	Relaps	NEGATIVAN	2017.; PK
12	M	Relaps	NEGATIVAN	2016.; PK/KS
13	M	Parcijalna remisija	POZITIVAN	2018.; PK
14	M	Remisija	NEGATIVAN	2018.; PK
15	M	Remisija	NEGATIVAN	2018.; PK

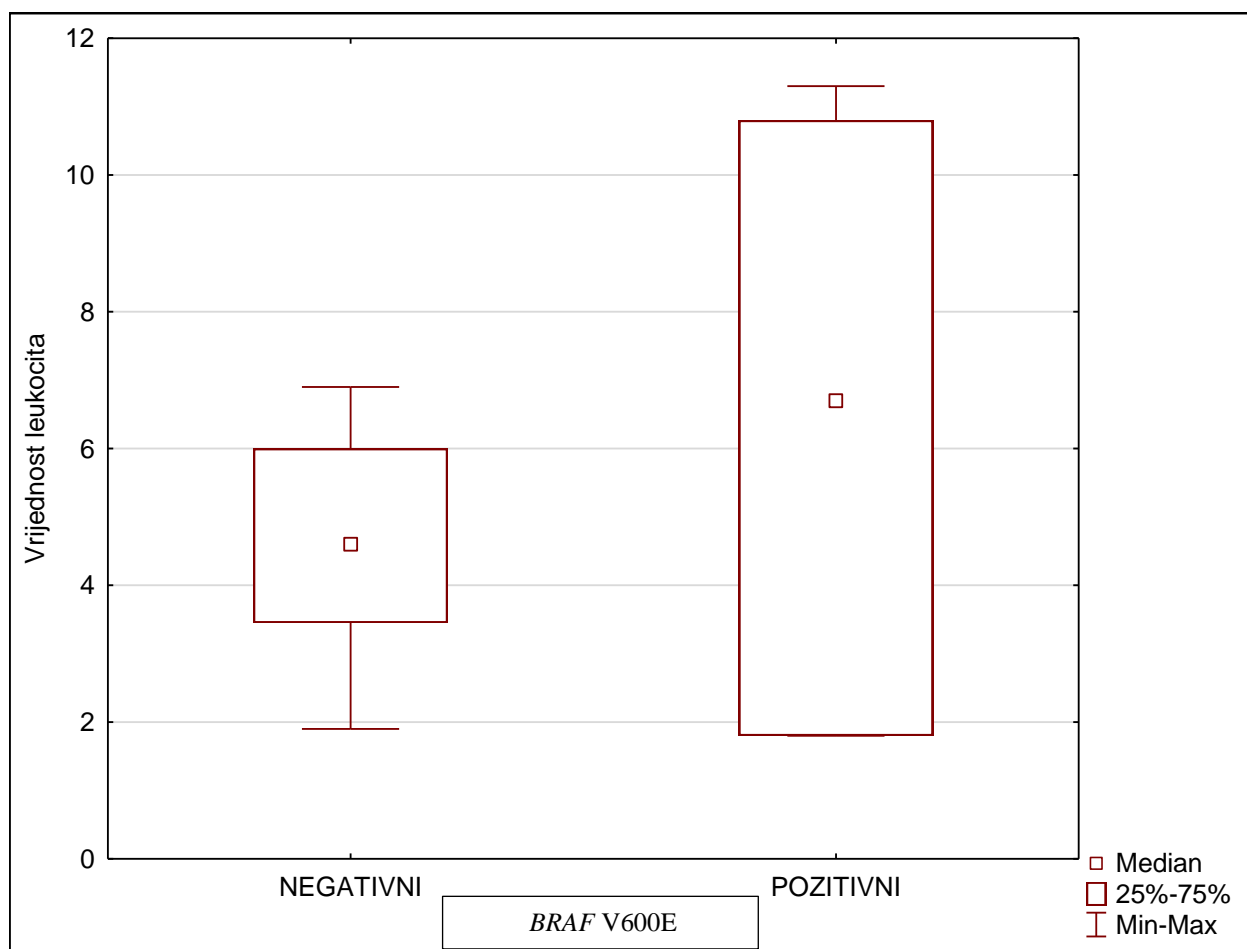


Tabica 3. Prikaz ispitanika, njihovih rezultata nakon analize uzoraka, statusa bolesti te laboratorijskih parametara

IB-identifikacijski broj, MAB-minimalno aktivna bolest, AB-aktivna bolest, L-leukociti, TRC-trombociti, HGB-hemoglobin, PK-periferna krv, cm-centimetri, PR-parcijalna remisija, LIMF-limfociti

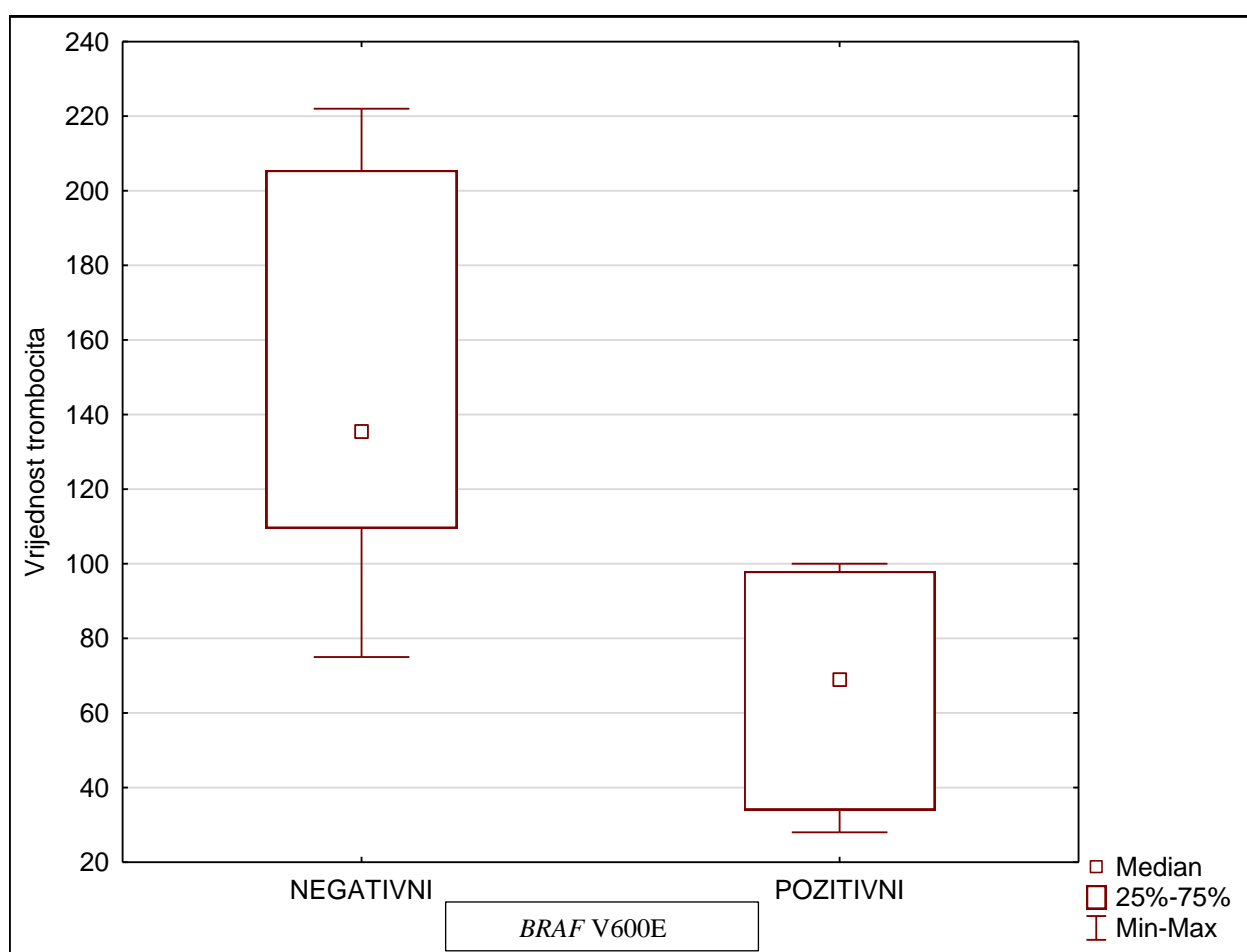
IB	STATUS BOLESTI	<i>BRAF</i> V600E MUTACIJA	L x10 <sup>9</sup> /L	TRC x10 <sup>9</sup> /L	HGB g/L	SLEZENA Palpacijski u cm	LIMF % u PK
1	REMISIJA	-	4.4	105	124	0	20.45%
2	REMISIJA	-	5.3	191	158	0	27.6%
3	REMISIJA	-	3.8	154	141	0	33%
4	RELAPS	+	8.1	70	143	Splenektomiran	59%
5	AB	+	11.3	69	117	12	88%
6	AB	+	1.8	28	74	10	55%
7	RELAPS	+	6.7	55	56	Splenektomiran	74%
8	AB	+	1.8	98	100	0	73.7%
9	AB	+	10.8	34	105	8	74.6%
10	MAB	-	4.8	222	136	0	20.7%
11	RELAPS	-	3.1	114	104	3	26.2%
12	RELAPS	-	1.9	75	150	1	36.5%
13	PR	+	3.0	100	121	0	56.67%
14	REMISIJA	-	6.9	117	164	0	24%
15	REMISIJA	-	6.7	220	149	0	24.6%

Medijan broja leukocita svih ispitanika je  $4.8 \times 10^9/L$ , minimum iznosi  $1.8 \times 10^9/L$ , a maksimum  $11.3 \times 10^9/L$ . Medijan broja trombocita svih ispitanika je  $100 \times 10^9/L$ , minimum iznosi  $28 \times 10^9/L$ , a maksimum  $222 \times 10^9/L$ . Medijan koncentracije hemoglobina ispitanika je  $124 \text{ g/L}$ , minimum  $56 \text{ g/L}$ , a maksimum je  $164 \text{ g/L}$ . Medijan postotka limfocita u perifernoj krvi je  $36.5\%$ , minimum je  $20.45\%$ , a maksimum  $88\%$ . Pomoću Mann-Whitney U Testa prikazana je distribucija vrijednosti broja leukocita, broja trombocita, koncentracije hemoglobina i postotka limfocita u perifernoj krvi, u skupini s dokazanom i bez dokazane *BRAF* V600E mutacije.



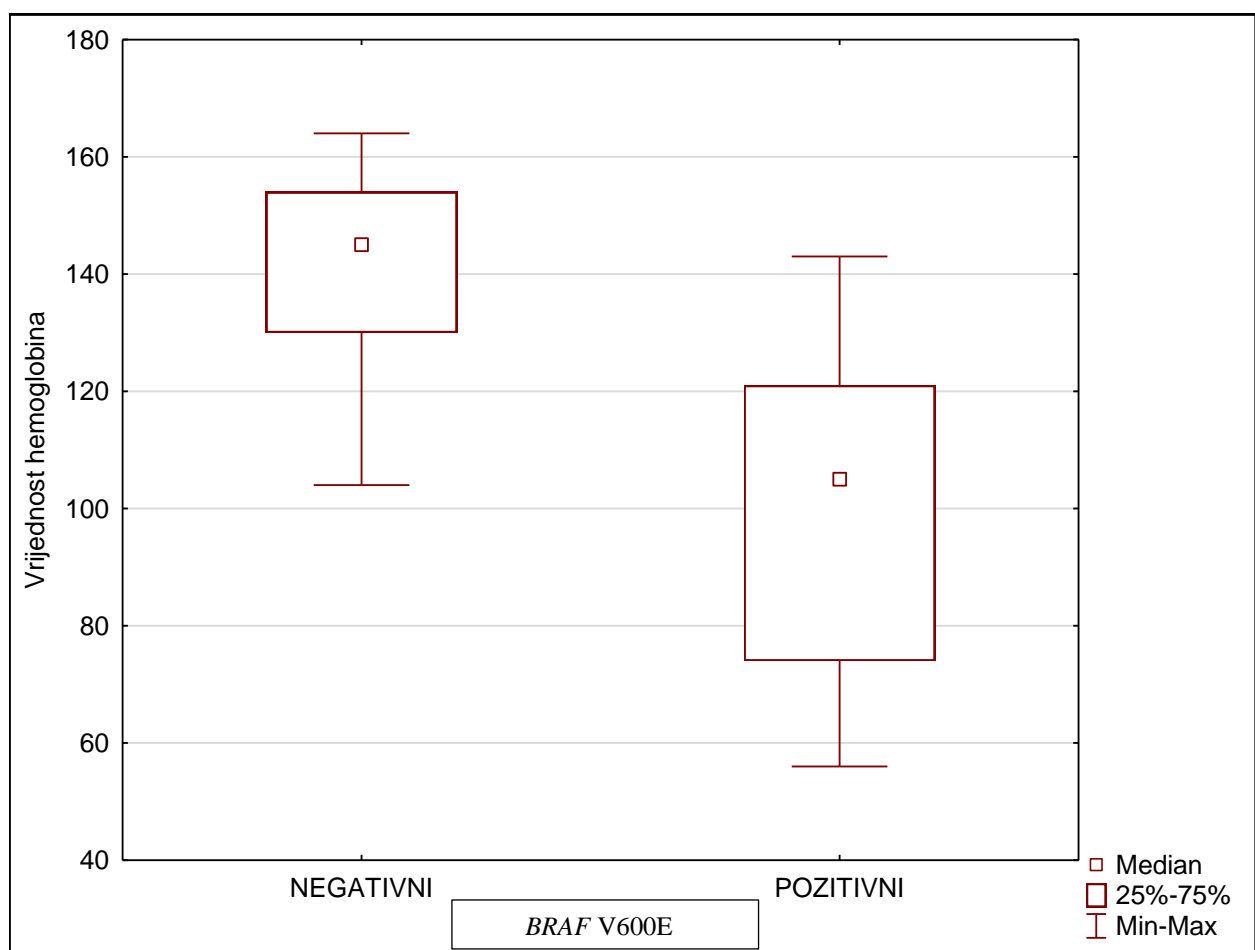
Slika 1. Prikaz distribucije vrijednosti broja leukocita u skupini ispitanika s dokazanom i bez dokazane *BRAF* V600E mutacije, tj. u skupini pozitivnih i skupini *BRAF* V600E negativnih ispitanika pomoću Mann-Whitney U Test-a,  $Z=0.35$ ,  $P=0.73$ .

Prema P vrijednosti kod distribucije vrijednosti broja leukocita između skupine s dokazanom *BRAF* V600E mutacijom i one u kojoj nije dokazana nema značajne razlike u broju leukocita. Kao što se vidi na Slici 1. postoji razlika u medijanima kod pozitivnih i negativnih ispitanika. Kod pozitivnih medijan broja leukocita je  $6.7 \times 10^9/L$ , minimum iznosi  $1.8 \times 10^9/L$ , a maksimum  $11.3 \times 10^9/L$ . Kod negativnih medijan broja leukocita je  $4.6 \times 10^9/L$ , minimum je  $1.9 \times 10^9/L$ , a maksimum  $6.9 \times 10^9/L$ . Minimum je prema tome u negativnih i pozitivnih gotovo jednak, a razlikuju se prema maksimumu i medijanu (v. Sliku 1.).



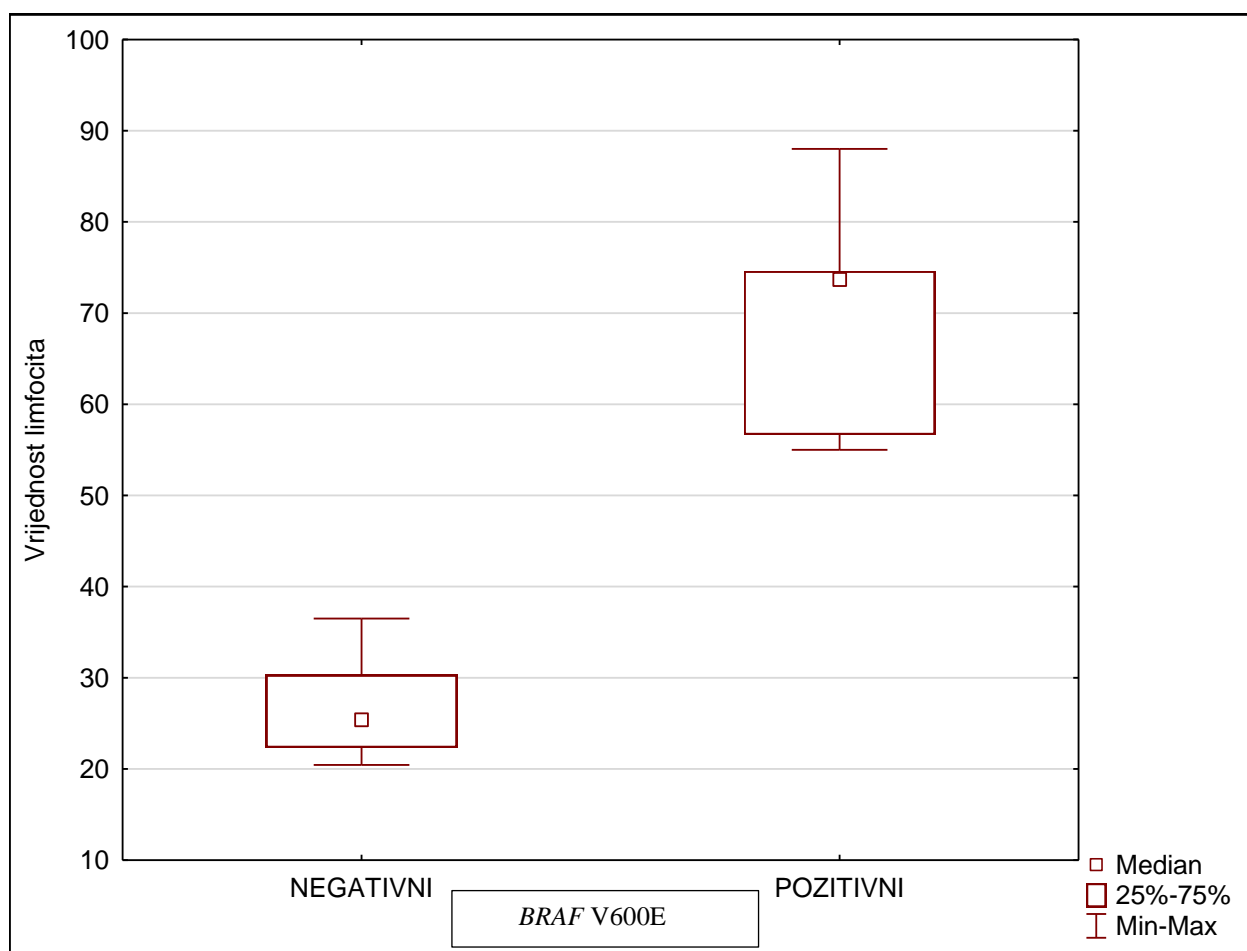
Slika 2. Prikaz distribucije vrijednosti broja trombocita kod skupine s dokazanom *BRAF* V600E mutacijom i kod onih u kojih nije dokazana, tj. pozitivnih i negativnih ispitanika, pomoću Mann-Whitney U Testa,  $Z=2.95$ ,  $P=0.003$ .

Prema P vrijednosti, između pozitivnih i negativnih postoji značajna razlika u distribuciji vrijednosti broja trombocita. Na Slici 2. vidi se da je kod pozitivnih ispitanika minimum puno niži nego kod negativnih ispitanika. No, oni se razlikuju i po medijanu i maksimumu, koji su u *BRAF* V600E pozitivnih ispitanika znatno niži (v. Sliku 2.). U *BRAF* V600E pozitivnih ispitanika medijan vrijednosti broja trombocita iznosi  $69 \times 10^9/L$ , minimum  $28 \times 10^9/L$ , a maksimum  $100 \times 10^9/L$ . U negativnih medijan vrijednosti broja trombocita je  $135 \times 10^9/L$ , minimum je  $75 \times 10^9/L$ , a maksimum  $222 \times 10^9/L$ .



Slika 3. Prikaz distribucije vrijednosti koncentracije hemoglobina u skupini s dokazanom *BRAF* V600E mutacijom i skupini bez dokazane mutacije, tj. u skupini pozitivnih i negativnih, pomoću Mann-Whitney U Testa,  $Z=2.37$ ,  $P=0.02$ .

Prema P vrijednosti postoji značajna razlika u distribuciji vrijednosti koncentracije hemoglobina između pozitivne i negativne skupine ispitanika. Kao što je vidljivo na Slici 3., u pozitivnih je minimum i maksimum niži, te postoji i razlika u medijanu, koji je također niži u pozitivne skupine. Medijan vrijednosti koncentracije hemoglobina u negativnih je 145 g/L, minimum 104 g/L, a maksimum je 164 g/L. Medijan vrijednosti koncentracije hemoglobina u pozitivnih je 105 g/L, minimum 56 g/L, a maksimum 143 g/L.



Slika 4. Prikaz distribucije postotka limfocita u perifernoj krvi u skupini s dokazanom *BRAF* V600E mutacijom i u skupini u kojoj nije dokazana, tj. u skupini pozitivnih i negativnih ispitanika, pomoću Mann-Whitney U Testa,  $Z=3.18$ ,  $P=0.001$ .

Prema P vrijednosti postoji značajna razlika u distribuciji postotka limfocita u pozitivnih i negativnih skupina ispitanika. Također nema preklapanja u distribuciji vrijednosti u pozitivnih i negativnih (v. Sliku 4.). Postoji razlika u medijanu, u minimumu te maksimumu. Kao što je vidljivo iz Slike 4. u pozitivnoj skupini ispitanika maksimum, minimum i medijan su znatno viši. Medijan postotka limfocita u pozitivnih ispitanika je 73.7%, minimum je 55%, a maksimum 88%. Medijan postotka u negativnih je 25.4%, minimum je 20.45%, a maksimum 36.5%. U svih ispitanika koji imaju povećan postotak limfocita u krvi pri analizi *BRAF* V600E mutacije, ona je i dokazana, a u onih s normalnim brojem limfocita mutacija nije utvrđena.

Tablica 4. Tablica kontingencije 1

Odnos postotka limfocita u krvi i dokaza *BRAF* V600E mutacije u ispitanika

	<i>BRAF</i> V600E +	<i>BRAF</i> V600E -
Povišen % limfocita u krvi	7	0
Normalan % limfocita u krvi	0	8

Tablica 5. Tablica kontingencije 2

Odnos statusa bolesti i dokaza *BRAF* V600E mutacije

\*Uključujući minimalno aktivnu bolest, \*\*Uključujući parcijalnu remisiju

PR-parcijalna remisija

	<i>BRAF</i> V600E +	<i>BRAF</i> V600E -
Aktivna bolest i relaps*	6	3
Remisija**	1(PR)	5

Usporedbom Tablice 4. za odnos postotka limfocita u krvi i dokaza *BRAF* V600E mutacije u ispitanika te Tablice 5. za odnos statusa bolesti i dokaza mutacije, proizlazi da je u ovom istraživanju postotak limfocita u krvi bolji pokazatelj toga hoće li se moći dokazati *BRAF* V600E mutacija RT-PCR metodom, nego što je status bolesti. U svih ispitanika s povećanim postotkom limfocita u krvi dokazana je *BRAF* V600E mutacija (v. Tablicu 4.). Kod statusa bolesti u troje ispitanika u kojih bi očekivali da je mutacija dokazana, a to su dvoje s relapsom bolesti i jedan s MRD, ona nije dokazana (v. Tablicu 5.). U svih ispitanika s remisijom bolesti nije utvrđena mutacija, osim kod ispitanika s bolešću u parcijalnoj remisiji (v. Tablicu 5.).

## 8. Rasprava

Koristeći RT-PCR metodu u ovom istraživanju je u sedam od petnaest ispitanika dijagnosticiranih s leukemijom vlasastih stanica potvrđena mutacija *BRAF* V600E. Korišteni su uzorci periferne krvi i koštane srži. Uzorci koštane srži nisu bili dostupnih od svih ispitanika. Uzorci koštane srži korišteni u istraživanju bili su samo od onih ispitanika u kojih su prvotno korišteni za potrebe postavljanja dijagnoze bolesti. Pacijenti su u istraživanje uključeni nakon postavljanja dijagnoze temeljene na citološkim nalazima. Prije uključivanja u ispitivanje nije napravljena protočna citometrija. Moguće je da manji dio ispitanika u kojih nije utvrđena *BRAF* mutacija možda posjeduje neku od rjeđih mutacija, ali također povezanih s TL-om. Jedna od takvih mutacija je *IGHV4-34*, uz koju u leukemiji vlasastih stanica uglavnom nije pronađena *BRAF* V600E mutacija (Schnittger S i sur.; 2012.). Također dio ispitanika možda ima HCL-V koja je u 30% slučajeva povezana s mutacijom *MAP2K1* (Durham BH i sur.; 2017.). Budući da u obje, HCL-C i HCL-V, u perifernoj krvi nalazimo trihocite koje citološki ne možemo razlikovati, u razlikovanju ovih dvaju različitih poremećaja pomogla bi protočna citometrija. U razlikovanju bi pomoglo odsustvo CD25, CD123, CD200 u HCL-V, a koji su prisutni u HCL-C (Schnittger i sur., 2012.; Matutes E i sur., 2015.). U leukemiji vlasastih stanica karakteristično u perifernoj krvi nalazimo mali broj cirkulirajućih tumorskih stanica, pa je time otežano utvrđivanje mutacije koristeći uzorke periferne krvi. Upravo je manjak tumorskih stanica u periferiji najvjerojatniji uzrok za to što nije u svih ispitanika dokazana mutacija, za koju se smatra da se nalazi u gotovo 100% bolesnika s klasičnom leukemijom vlasastih stanica. U prilog tome govori i to što su ispitanici u kojih mutacija nije dokazana uglavnom u remisiji bolesti, a jedan ima minimalno aktivnu bolest. Moguće da bi veći dio ispitanika imao dokazanu mutaciju kad bi se pri analizi RT-PCR metodom u svih koristili uzorci koštane srži. Prilikom korištenja uzoraka koštane srži gotovo u svih ispitanika je dokazana mutacija. Uzorci koštane srži poslužili bi i za



potvrđivanje mutacije nekim dostupnijim metodama. Primjerice, za imunohistokemijsku obradu uzoraka koštane srži prilikom čega je za HCL-C karakteristična ekspresija aneksina-1 (Tiaci E i sur., 2017.). No, međutim tu se postavlja etičko pitanje o uzimanju uzoraka metodom biopsije ili punkcije srži koje su za pacijenta bolne i neugodne, a izvodile bi se ovdje za svrhe istraživanja. Također na taj način izvođenje istraživanja bilo bi tehnički zahtjevnije nego kad se koriste uzorci periferne krvi. Samo uzorkovanje srži teže je izvodivo nego li uzorkovanje periferne krvi, a i uzorci koji bi se dobili potencijalno ne bi bili korisni budući da je srž u TL-u često fibrozno promijenjena. Uzorkovanje koštane srži nosi i moguće komplikacije, kao što su produljeno krvarenje, bol, infekcija na mjestu punkcije, prodor igle u okolne šuplje prostore i druge. Utvrđivanje *BRAF* V600E mutacije u bolesnika s TL-om donijelo bi im korist zbog mogućeg uključivanja u liječenje pomoću *BRAF* ili *MEK* inhibitora, kao što je vemurafenib. Pogotovo je to važno za one pacijente s teškim nuspojavama na liječenje standardnom terapijom purinskim analogima ili onima čija je bolest prestala odgovarati na terapiju PA. Svakako bi prije liječenja inhibitorima signalnog puta, trebalo protočnom citometrijom razlikovati HCL-C i HCL-V, a PCR metodom utvrditi *BRAF* V600E mutaciju. HCL-C i HCL-V imaju različit odgovor na terapiju, različitu prognozu te su uzrokovane različitim mutacijama (Robak T, 2011.). HCL-C pokazala se kao poremećaj s boljom prognozom i boljim odgovorom na liječenje purinskim analogima od HCL-V (Robak T, 2011.). Međutim HCL koja nema *BRAF* V600E mutaciju nego mutaciju u području *IGHV4-34* ima lošiju prognozu od *BRAF* V600E pozitivne HCL (Liqiang X i sur., 2012.). Kod HCL-V terapija inhibitorima signalnog puta *RAF*-*MEK*-*ERK* nije učinkovita budući da je uzrokovana drugim mutacijama te ne posjeduje *BRAF* V600E mutaciju i time ne dolazi do utišavanja signalnog puta u podlozi. Primjerice, u trećini slučajeva HCL-V uzrokovana je mutacijama u području *TP53* gena (Matutes E i sur., 2015.). U ovom istraživanju RT-PCR metoda u leukemiji vlasastih stanica pokazala se kao osjetljiva metoda kod aktivne bolesti,

manje osjetljiva ako se radi o relapsu, a najmanje, pak, ako se radi o remisiji bolesti ili minimalnoj ostatnoj bolesti. Kod aktivne bolesti u svih ispitanika dokazana je prisutnost mutacije. U ispitanika s minimalno aktivnom bolesti mutacija nije utvrđena. To je i za očekivati kod minimalno aktivne bolesti, jer je broj trihocita i u krvi i u koštanoj srži nizak. U polovice ispitanika s relapsom je dokazana mutacija, te je mutacija potvrđena i kod ispitanika s parcijalnom remisijom. U parcijalnoj remisiji i dalje je prisutan, iako reduciran, broj trihocita u perifernoj krvi dovoljan za utvrđivanje prisutnosti mutacije. U slučajevima kompletne remisije bolesti u istraživanju nije dokazana mutacija. Iako je osjetljivost metode takva da raspoznaje otprilike jednu tumorsku stanicu u 1000 zdravih, nije u svih ispitanika utvrđeno postojanje mutacije. Radi se vjerojatno o manjem broju tumorskih stanica u perifernoj krvi kod remisije bolesti ili minimalno aktivne bolesti, a ne o nedostatnosti same metode. U istraživanju se pokazalo da povećan postotak limfocita i trombocitopenija najbolje koreliraju sa statusom bolesti. Trombocitopenija je prisutna u sva četiri ispitanika s aktivnom bolešću, u sva četiri ispitanika s relapsom, te u ispitanika s parcijalnom remisijom. Trombocitopenija nije bila prisutna u samo četvero ispitanika, od toga su troje u remisiji i jedan ima minimalno aktivnu bolest. Povećan postotak limfocita je bio prisutan u sva četiri slučaja aktivne bolesti, u dva od četiri relapsa te u parcijalnoj remisiji. U svim slučajevima povećanog postotka limfocita u ispitavanju je potvrđena mutaciju. U onih ispitanika s normalnim brojem limfocita mutacija nije potvrđena analizom. U svih ispitanika s utvrđenom mutacijom je prisutna trombocitopenija, no ona je prisutna i u nekih ispitanika u kojih nismo utvrdili mutaciju. Nasuprot tome, nijedan ispitanik s povećanim postotkom limfocita nije bio negativan u analizi *BRAF* mutacije. Uspoređujući tablice kontingencije ispitanika, vidi se da u svim slučajevima povećanog postotka limfocita utvrđena mutacija, a u slučajevima aktivne bolesti ili relapsa u šestoro ispitanika od njih devetero ukupno je potvrđena mutacija. To pokazuje da se u ovom istraživanju postotak limfocita u perifernoj krvi pokazao kao bolji

prediktor za potvrđivanje mutacije RT-PCR metodom nego status bolesti. Postavlja se pitanje- sugerira li nalaz u ovom istraživanju da se u ispitanika s normalnim brojem limfocita u perifernoj krvi uopće ne radi RT-PCR jer se mutacija neće moći utvrditi? To jest da u tih bolesnika nekom od drugih metoda pokušamo utvrditi mutaciju ili da, ukoliko koristimo RT-PCR za potvrdu, kao uzorak koristimo koštanu srž zbog većeg broja trihocita. Prema ovom istraživanju, kao najbolji pokazatelj od laboratorijskih parametara za mogućnost potvrđivanja *BRAF* V600E mutacije, pokazao se povećan postotak limfocita u perifernoj krvi, dok se kao najbolji pokazatelj statusa bolesti pokazala trombocitopenija. Trombocitopenija je bila prisutna u svih ispitanika s relapsom, aktivnom bolešću te u PR. Trombocitopenija nije bila prisutna samo u ispitanika s remisijom bolesti i s MRD.

## 9. Zaključci

1. Iako gotovo svi bolesnici s dokazanom klasičnom leukemijom vlasastih stanica imaju u podlozi *BRAF* V600E mutaciju, nije u svih moguće utvrditi postojanje mutacije metodom RT-PCR zbog oskudnosti tumorskim stanicama u perifernoj krvi, čiji je broj ovisan o statusu bolesti.

2. Kvalitativna metoda RT-PCR kojom smo utvrđivali postojanje *BRAF* V600E mutacije pokazala se dovoljno osjetljivom kod utvrđivanja mutacije u aktivnoj bolesti, nešto manje osjetljivom kod relapsa, a slabo osjetljivom u detekciji mutacije kod remisije bolesti te minimalne ostatne bolesti.

## 10. Zahvala

Zahvaljujem se mentoru prof.dr.sc.Rajku Kušecu za priliku za rad na ovoj temi, savjetovanje i svesrdnu pomoć, usmjeravanje i podršku prilikom izrade rada.

Zahvaljujem članovima komisije, prof.dr.sc. Vlatku Pejši te prof.dr.sc. Ljiljani Šerman.

Hvala mag.med.lab.diagn. Katarini Mariji Tupek na velikoj pomoći i susretljivosti.

Velika hvala doc.dr.sc. Slavici Sović za savjetovanje, pomoć i usmjeravanje pri analizi rezultata ispitivanja.

Hvala mojim roditeljima i sestrama, dečku Mateu i prijateljima na velikoj i stalnoj podršci.

## 11. Literatura

1. Cannon T, Mobarek D, Wegge J, Tabbara IA. Hairy cell leukemia: current concepts. *Cancer Invest.* 2008 Oct;26(8):860-5. doi: 10.1080/07357900801965034
2. Cornet E, Damaj G, Troussard X. New insights in the management of patients with hairy cell leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2015 Sep; 27(5):371-6. doi: 10.1097/CCO.0000000000000214
3. Dhomen N, Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 Jun;23(3):529-45, ix. doi: 10.1016/j.hoc.2009.04.001
4. Dietrich S, Zenz T. BRAF inhibitor therapy in HCL. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015 Dec;28(4):246-52. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.001
5. Durham BH, Getta B, Dietrich S, Taylor J, Won H, Bogenberger JM i sur. Genomic analysis of hairy cell leukemia identifies novel recurrent genetic alterations. *Blood.* 2017 Oct 5;130(14):1644-1648. doi: 10.1182/blood-2017-01-765107
6. Falini B, Martelli MP, Tiacci E. BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia: from bench to bedside. *Blood.* 2016 Oct 13;128(15):1918-1927. doi: 10.1182/blood-2016-07-418434
7. Fiskus W, Mitsiades N. B-Raf Inhibitor in the Clinic: Present and Future. *Annu Rev Med.* 2016;67:29-43. doi: 10.1146/annurev-med-090514-030732
8. Getta BM, Park JH, Tallman MS. Hairy cell leukemia: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015 Dec;28(4):269-72. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.015
9. Grever MR, Abdel-Wahab O, Andritsos LA, Banerji V, Barrientos J, Blachly JS i sur. Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with

- classic hairy cell leukemia. *Blood*. 2017 Feb 2;129(5):553-560. doi: 10.1182/blood-2016-01-689422
10. Hall RD, Kudchadkar RR. BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies. *Cancer Control*. 2014 Jul;21(3):221-30. doi: 10.1177/107327481402100307
11. Jain P, Pemmaraju N, Ravandi F. Update on the biology and treatment options for hairy cell leukemia. *Curr Treat Options Oncol*. 2014 Jun; 15(2):187-209. doi: 10.1007/s11864-014-0285-5
12. Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulidakos PI. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017 Nov;17(11):676-691. doi: 10.1038/nrc.2017.79
13. Kreitman RJ, Pastan I. Immunoconjugates in the management of hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015 Dec;28(4):236-45. doi: 10.1016/j.beha.2015.09.003
14. Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 May; 16(5):281-98. doi: 10.1038/nrm3979
15. Matutes E, Martinez-Trillos A, Campo E. Hairy cell leukaemia-variant: Disease features and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015 Dec; 28(4):253-63. doi: 10.1016/j.beha.2015.09.002
16. Muller D. B-Raf mutacija te izraženost beta-kenina, ciklina D1 i p6 u melanomu. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2012.
17. Pettirossi V, Santi A, Imperi E, Russo G, Pucciarini A, Bigerna B i sur. BRAF inhibitor reverse the unique molecular signature and phenotype of hairy cell leukemia and exert potent antileukemic activity. *Blood*. 2015 Feb 19;125(8):1207-16. doi: 10.1182/blood-2014-10-603100

18. Quest GR, Johnston JB. Clinical features and diagnosis of hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015 Dec;28(4):180-92. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.017
19. Richtig G, Hoeller C, Kashofer K, Aigelsreiter A, Heinemann A, Kwong LN i sur. Beyond the BRAF<sup>V600E</sup> hotspot: biology and clinical implications of rare BRAF gene mutations in melanoma patients. *Br J Dermatol.* 2017 Oct; 177(4):936-944. doi: 10.1111/bjd.15436
20. Robak T, Matutes E, Catovsky D, Zinzani PL, Buske C. Hairy cell leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015 Sep;26 Suppl 5:v100-7. doi: 10.1093/annonc/mdv200
21. Robak T, Wolska A, Robak P. Potential breakthroughs with investigational drugs for hairy cell leukemia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2015; 24(11):1419-31. doi: 10.1517/13543784.2015.1081895
22. Robak T. Management of hairy cell leukemia variant. *Leuk Lymphoma.* 2011 Jun;52 Suppl 2:53-6. doi: 10.3109/10428194.2011.566392
23. Rozeman EA, Dekker TJA, Haanen JBAG, Blank CU. Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives. *Am J Clin Dermatol.* 2018 Jun;19(3):303-317. doi: 10.1007/s40257-017-0325-6
24. Sanz-Garcia E, Argiles G, Elez E, Tabernero J. BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Ann Oncol.* 2017 Nov 1; 28(11):2648-2657. doi: 10.1093/annonc/mdx401
25. Sarvaria A, Topp Z, Saven A. Current Therapy and New Directions in the Treatment of Hairy Cell Leukemia. *JAMA Oncol.* 2016 Jan;2(1):123-9. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.4134



26. Schnittger S, Bacher U, Haferlach T, Wendland N, Ulke M, Dicker F i sur. Development and validation of a real-time quantification assay to detect and monitor *BRAF*V600E mutations in hairy cell leukemia. *Blood*. 2012 Mar 29; 119(13):3151-4. doi: 10.1182/blood-2011-10-383323
27. Tadmor T, Polliack A. Epidemiology and environmental risk in hairy cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015 Dec;28(4):175-9. doi: 10.1016/j.beha.2015.10.014
28. Thompson PA, Ravandi F. How I manage patients with hairy cell leukaemia. *Br J Haematol*. 2017 May;177(4):543-556. doi: 10.1111/bjh.14524
29. Tiacci E, Liso A, Piris M, Falini B. Evolving concepts in the pathogenesis of hairy-cell leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jun;6(6):437-48. doi: 10.1038/nrc1888
30. Tiacci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S i sur. Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Oct 29;373(18):1733-47. doi: 10.1056/NEJMoa1506583
31. Tiacci E, Pettrossi V, Schiavoni G, Falini B. Genomics of Hairy Cell Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017 Mar 20;35(9):1002-1010. doi: 10.1200/JCO.2016.71.1556
32. Tiacci E, Schiavoni G, Martelli MP, Boveri E, Pacini R, Tabarrini A i sur. Constant activation of the RAF-MEK-ERK pathway as a diagnostic and therapeutic target in hairy cell leukemia. *Haematologica*. 2013 Apr;98(4):635-9. doi: 10.3324/haematol.2012.078071
33. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP. BRAF Mutations in Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med*. 2011 Jun 16;364(24):2305-15. doi: 10.1056/NEJMoa1014209

34. Troussard X, Cornet E. Hairy cell leukemia 2018: Update on diagnosis, risk-stratification, and treatment. *Am J Hematol.* 2017 Dec;92(12):1382-1390. doi: 10.1002/ajh.24936
35. Wierda WG, Byrd JC, Abramson JS, Bhat S, Bociek G, Brander D i sur.. Hairy Cell Leukemia, Version 2.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017 Nov;15(11):1414-1427. doi: 10.6004/jnccn.2017.0165
36. Xi L, Arons E, Navarro W, Calvo KR, Stetler-Stevenson M, Raffeld M i sur. Both variant and IGHV4-34-expressing hairy cell leukemia lack the BRAF V600E mutation. *Blood.* 2012 Apr 5;119(14):3330-2. doi: 10.1182/blood-2011-09-379339

## 12. Životopis

Rođena sam u Splitu 30.12.1993.godine. Osnovnu školu završila sam u Zagrebu. Pohadala sam i završila II. opću gimnaziju u Zagrebu. Maturirala sam 2012. godine te sam iste godine upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Govorim engleski jezik, a služim se njemačkim i francuskim jezikom. Položila sam tečaj osnovnog održavanja života uz korištenje automatskih vanjskih defibrilatora (BLS-Basic Life Support) te tečaj neposrednog održavanja života (ILS-Immediate Life Support).