

KORELACIJA MORFOLOGIJE KOŠTANE SRŽI PRIJE POČETKA TERAPIJE I RAZINE BCR/ABL TRANSKRIPTA KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD KRONIČNE MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Murković, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:494652>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Martina Murković

KORELACIJA MORFOLOGIJE KOŠTANE SRŽI PRIJE POČETKA TERAPIJE I RAZINE

BCR/ABL TRANSKRIPTA KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD KRONIČNE

MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Martina Murković

KORELACIJA MORFOLOGIJE KOŠTANE SRŽI PRIJE POČETKA TERAPIJE I RAZINE

BCR/ABL TRANSKRIPTA KOD PACIJENATA OBOLJELIH OD KRONIČNE

MIJELOIČNE LEUKEMIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Ita Hadžisejdić, dr.med.

Diplomski rad ocjenjen je dana 30. lipnja 2020. u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Kovička Matušan Ilijaš, dr.med.

2. Doc.dr.sc. Emina Babarović, dr.med.

3. Prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić, dr.med.

Rad sadrži 48 stranica, 11 slika, 5 tablica, 64 literaturna

navoda.

Zahvala

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja! Hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Iti Hadžisejdić na podršci tijekom izrade rada i inspiraciji koju sam dobila za daljnji rad.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Kronična mijeloična leukemija	1
1.2. Epidemiologija.....	1
1.3. Etiologija.....	2
1.4. Klinička prezentacija i dijagnoza	2
1.4.1. Kronična faza	3
1.4.2. Faza akceleracije.....	5
1.4.3. Blastična faza	6
1.5. BCR-ABL1 onkogen	8
1.6. Prognoza	10
1.7. Terapija	11
1.8. Praćenje odgovora na terapiju.....	13
2. Svrha rada	15
2.1. Glavni cilj istraživanja	15
2.2. Specifični ciljevi istraživanja	15
3. Ispitanici i postupci.....	16

3.1. Ispitanici.....	16
3.2. Postupci.....	17
3.2.1. Priprema preparata i prognostički parametri.....	17
3.2.2. Imunohistokemijsko bojenje.....	18
3.2.3. Analiza gustoće i površine krvnih žila.....	19
3.2.4. Statistička obrada podataka.....	20
4. Rezultati.....	21
4.1. Klinički podatci.....	21
4.2. Patohistološke karakteristike.....	21
4.3. Korelacija morfoloških karakteristika koštane srži i molekularnog odgovora	28
4.4. Korelacija MVD i MVA s molekularnim odgovorom.....	29
4.5. Korelacija molekularnog odgovora i laboratorijskih nalaza, veličine slezene te Sokal indeksa.....	31
5. Rasprava.....	34
6. Zaključak.....	39
7. Sažetak	40
8. Summary	41
9. Literatura.....	42
10. Životopis	48

Popis skraćenica i akronima

ABL1 – protoonkogen (engl. Abelson murine leukemia)

ALL – akutna limfoblastična leukemija (engl. Acute lymphoblastic leukemia)

AML – akutna mijeloična leukemija (engl. Acute myeloid leukemia)

ATP – adenzin trifosfat (engl. Adenosine triphosphate)

BCR – gen zadužen za kodiranje proteina (engl. Breakpoint cluster region)

CD10 – metalopeptidaza stanične membrane (engl. Cluster of Differentiation 10)

CD19 – transmembranski protein (engl. Cluster of Differentiation 19)

CD34 – transmembranski fosfolipoprotein (engl. Cluster of Differentiation 34)

c-KIT – transmembranski protein

CMLN - CML s predominacijom zrelih neutrofila (engl. CML with a predominance of mature neutrophils)

CMML - kronična monomijelocitna leukemija (engl. Chronic myelomonocytic leukemia)

CNS – središnji živčani sustav (engl. Central nervous system)

DAB - diaminobenzidin

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)

ELTS – prediktivni indeks preživljenja pacijenata oboljelih od CML (engl. EUTOS long-term survival score)

EUTOS – prediktivni indeks odgovora na terapiju u pacijenata oboljelih od CML (engl. European Treatment and Outcome Study)

FDA – Američka uprava za hranu i lijekove (engl. Food and Drug administration)

FISH - fluorescentna "in situ" hibridizacija (engl. Fluorescence in situ hybridization)

GRB2 – receptor za faktor rasta(engl. Growth factor receptor-bound protein 2)

HE - hematoksilin-eozin

JAK2 – Janus Kinaza 2 gen (engl. Janus Kinase 2)

KBC – Klinički bolnički centar

kD - kilodalton

KML – kronična mijeloična leukemija (engl. Chronic myeloid leukemia)

LAP – leukocitna alkalna fosfataza

MAPK - mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (engl. Mitogen-activated protein kinase)

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. Messenger ribonucleic acid)

MVA - površina krvnih žila (engl. Microvessel area)

MVD – gustoća krvnih žila (engl. Microvessel density)

NAP – neutrofilna alkalna fosfataza

PAS - reagens za pripremu histoloških uzoraka (engl. Periodic acid-Schiff)

PDGF – trombocitni čimbenik rasta (engl. Platelet derived growth factor)

PGDFR – receptor za trombocitni faktor rasta (engl. Platelet derived growth factor receptor)

Ph – Philadelphia kromosom

PV – policitemija vera (engl. Polycythemia Vera)

RT-PCR - lančana reakcija polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (engl. Reverse transcription polymerase chain reaction)

SEER - (engl. Surveillance, Epidemiology, and End Results)

TdT – terminalna deoksinukletidilna transferaza (engl. Terminal deoxynucleotidyl transferase)

TKI – tirozin kinazni inhibitor

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. Vascular endothelial growth factor)

WBC – leukociti (engl. White blood cell)

WHO – Svjetska Zdravstvena Organizacija (engl. World Health Organization)

1. Uvod

1.1. Kronična mijeloična leukemija

Kronična mijeloična leukemija (KML) je maligna hematološka bolest koja nastaje uslijed klonalnog poremećaja pluripotentne matične stanice (1). KML karakterizira nekontrolirana proliferacija pretežno granulocitne loze koja nastaje kao posljedica balansirane recipročne translokacije i posljedične fuzije ABL1 gena na 9. kromosomu s BCR genom na 22. kromosomu (2,3). Onkoprotein nastao recipročnom translokacijom naziva se BCR-ABL1 te je aktivna tirozin kinaza koja potiče rast i replikaciju stanica, dok se kromosomska abnormalnost naziva *Philadelphia kromosom* (2,3). U stanicama s tako promijenjenim genetskim materijalom dolazi do započinjanja staničnog ciklusa neovisnog o citokinskoj aktivnosti te do izostanka apoptoze (2). Pacijenti su često asimptomatski pri dijagnozi bolesti, a bolest se uglavnom otkriva pri rutinskoj kontroli krvne slike (4). Ako simptomi postoje oni mogu uključivati umor, bol ispod lijevog rebrenog luka zbog splenomegalije, krvarenje, gubitak mase, letargiju i rjeđe limfadenopatiju (4). KML ima trifazični ili bifazični klinički tijek gdje dolazi do progresije iz kronične faze u fazu akceleracije te naposljetku blastičnu fazu, a moguć je i direktni prijelaz iz kronične u blastičnu fazu (3,5).

1.2. Epidemiologija

KML je rijetka bolest, s godišnjom incidencijom 1-2 slučajeve na 100,000 oboljelih odraslih osoba u svijetu (6,7). Nešto se češće dijagnosticira u muških osoba zbog čega je omjer oboljelih muškaraca naspram oboljelih žena 1.4:1 (1). Prosječna dob oboljenja je između 46. i 53. godine života, a vrhunac oboljenja je oko 65. godine te incidencija raste s dobi (1,4). Na KML otpada otprilike 14% svih leukemija te oko 15 do 20% svih leukemija u odrasloj dobi (1,7).

1.3. Etiologija

U većine pacijenata nema jasne etiologije nastanka bolesti zbog čega se smatra da KML nije nasljedna bolest, iako je opisana pojava mijeloproliferativnih neoplazmi među rijetkim obiteljima u više članova tih obitelji (1,8). Rađene su studije u kojima se smatra da među ovim obiteljima postoji autosomno dominantna mutacija koja je predisponirajući faktor za razvoj sekundarnih mutacija kao što je Ph kromosom ili JAK2 mutacija (3,7). Ionizirajuće zračenje je zabilježeno kao jedini faktor rizika. Naime, nakon eksplozije nuklearnih bombi u Japanu 1945. zabilježena je 50 puta veća incidencija KML nego li u osoba koje nisu bile izložene ionizirajućem zračenju (1). Bolest se pojavljivala ranije u osoba koje su bile mlađe od 15 godina, a vrhunac javljanja bolesti je bio 10 godina nakon ekspozicije (1). Kod većine oboljelih od KML ne postoji prethodna izloženost ionizirajućem zračenju u povijesti bolesti (1). Zbog uspjeha tirozin kinaznih inhibitora smrtnost je svedena na 2% dok je prevalencija KML u zapadnom svijetu stalno u porastu zbog sve većeg broja oboljelih koji žive s bolesti (3,9).

1.4. Klinička prezentacija i dijagnoza

U 85% pacijenata, KML se dijagnosticira u kroničnoj fazi. Akcelerirana faza je karakterizirana poremećajem diferencijacije neutrofila u zrele stanice i lošim odgovorom na terapiju što se očituje konstantno visokim brojem leukocita, dok blastična faza nalikuje akutnoj leukemiji gdje dolazi do nekontrolirane proliferacije blasta mijeloidne ili leukemoidne loze iz razloga što KML klon potiče iz pluripotentne matične stanice (10). Dijagnoza KML uključuje analizu krvne slike i diferencijalne krvne slike, analizu bioptata koštane srži te citogenetsku i molekularnu analizu s ciljem dokazivanja translokacije (9;22) odnosno BCR-ABL1 fuzijskog transkripta (3,4).

1.4.1. Kronična faza

Kroničnu fazu KML karakterizira nalaz povećanog broja nezrelih mijeloidnih stanica i zrelih granulocita u koštanoj srži i perifernoj krvi (1,3). Pacijenti u 20 do 50% slučajeva nemaju nikakvih simptoma, a na bolest se posumnja pri rutinskoj analizi krvne slike (11). U pacijenata koji ipak imaju simptome često su prisutni slabost, zamor, vrtoglavica, gubitak tjelesne težine, osjećaj punoće u abdomenu, anoreksija, vrućica, noćno znojenje, anemija koja je obično normokromna i normocitna te krvarenja zbog disfunkcije trombocita (1,3,11). Osjećaj punoće u abdomenu, rano zasićenje nakon obroka te abdominalna bol su povezani s nastankom splenomegalije, dok se osjećaj osjetljivost iznad sternuma javlja zbog ekspanzije koštane srži uslijed proliferacije tumorskih stanica unutar koštane srži. Također, moguća je pojava akutnog uričnog artritisa zbog prekomjerne produkcije mokraćne kiseline uslijed raspada tumorskih stanica (1,3,11).

Iako su analiza bioptata koštane srži te molekularna i citogenetska analiza potrebne za definitivnu dijagnozu KML, analiza periferne krvi je važna iz razloga što pobuđuje sumnju na bolest (4). U kroničnoj fazi stanice zadržavaju sposobnost diferencijacije i proizvodnje morfološki normalnih krvnih stanica koje su sposobne izvršavati normalne fiziološke funkcije (1). U pacijenata oboljelih od KML uobičajen je nalaz upadljive leukocitoze pri čemu broj leukocita varira između 20 i 500 x 10⁹/L (ref:3.4-9.7x10⁹L) dok je prosječan broj između 134 te 225 x 10⁹/L (4,5,10). Leukocitoza ponekad može dovesti do pojave znakova i simptoma hiperviskoznosti krvi kao što su prijapizam, cerebrovaskularni inzulti, vrtoglavica te retinalna krvarenja (1). Kod čekanja potvrde dijagnoze KML broj leukocita se može reducirati korištenjem hidroksiureje kod pacijenata sa signifikantnom leukocitozom, odnosno >80 x 10⁹/L (3). Pri razmazu periferne krvi tipičan je nalaz leukocitoze koji može varirati između 12 do 1000 x

$10^9/L$, a prosječan nalaz je oko $100 \times 10^9/L$ (5). Perifernim razmazom se uglavnom nađu neutrofili u svim stadijima razvoja, gdje najveći postotak otpada na mijelocite i segmentirane neutrofile (4,5). Za kroničnu fazu karakterističan je nalaz 1 do 2% blasta (ref: 0%) u perifernoj krvi, kao i veći postotak mijelocita u odnosu na metamijelocite (4,5). Zrele granulocitne stanice su blago displastične, a ponekad displazija izostaje u potpunosti u zrelim oblicima, dok se veći stupanj displazije povezuje s evolucijom u akceleriranu fazu (4,12). Neutrofili su morfološki normalni u KML, ali postoji citokemijska abnormalnost koja se dokazuje testom leukocitne ili neutrofilne alkalne fosfataze čiji je nalaz obično snižen u KML. Snižena vrijednost LAP pomaže u razlikovanju KML od leukemoidne reakcije u infekcijama pri čemu je LAP normalan ili povišen, te od PV gdje je LAP povišen (3,4). Apsolutna bazofilija je prisutna u svim razmazima periferne krvi kod pacijenata oboljelih od KML, a čest je nalaz i apsolutne monocitoze ($>1000 \times 10^9/L$), iako je postotak monocita obično ispod 3% (3–5). Eozinofilija je prisutna u oko 90% slučajeva, a eozinofili su obično nezreli s bazofilnim granulama (3,4). Česta je blaga normokromna, normocitna anemija. Broj trombocita je normalan ili povišen i do $1000 \times 10^9/L$ (4,5,10). Trombocitopenija je rijetka, a ako je prisutna treba diferencijalno dijagnostički razmišljati o mijelodisplastičnom sindromu (4,5,10).

U aspiratu i bioptatu koštane srži prisutna je hiperplazija granulocita, a odnos stanica je sličan odnosu stanica u nalazu razmaza periferne krvi (3–5). Upadljiva je proliferacija mijeloidnih i megakariocitnih elemenata, pri čemu je povišen mijeloidni udio u mijeloidno-eritroidnom omjeru (10:1 do 20:1) (4,5). Uobičajen je nalaz debljeg sloja nezrelih neutrofila uz trabekule, dok su zreli neutrofili u intertrabekularnim prostorima (3,4). U zdravoj koštanoj srži ova linija je debljine do 3 stanice dok kod KML debljina linije može sezati od 15 do 20 stanica (4,5). Eritroidni otočići su obično reducirani u broju i veličini eritrona (3). Broj blasta u

kroničnoj fazi je nizak (<5%), a porast broja blasta na 10-19% je dijagnostički za akceleriranu fazu dok broj blasta iznad 20% upućuje na razvoj blastične krize tj. prelazak u akutnu leukemiju. Broj megakariocita je uglavnom normalan ili snižen, karakteristično su maleni s hipolobuliranim jezgrama te se opisuju kao patuljasti megakariociti (3–5). Ostale mijeloproflerativne bolesti karakteriziraju povećani ili normalni megakariociti dok kod mijelodisplastičnih sindoma se nalaze mikro-megakariociti, manji od patuljastih megakariocita (3–5). U otprilike 20-40% slučajeva moguće je naći histiocite koji sličje Gaucherovim stanicama te se nazivaju pseudo-Gaucherove stanice (3–5). Citoplazma ovih stanica je grudasta sa čestom hemofagocitozom (4). Prisutnost ovih stanica nije dijagnostička za KML jer su prisutne u određenom broju drugih hematoloških poremećaja, ali kod KML nastaju iz neoplastičnog klona što je dokazano BCR-ABL pozitivitetom pomoću FISH analize (4).

Potvrda dijagnoze KML je nalaz t(9;22) ili fuzijskog BCR-ABL1 gena (4). Ovaj nalaz se dobiva konvencionalnom citogenetskom analizom (kariotipizacija), FISH probama za BCR i ABL1 ili korištenjem lančane reakcije polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) za dokaz mRNA fuziranog gena (4,5). Kod gotovo svih oboljelih od KML, moguće je naći Ph kromosom, BCR-ABL1 gen ili produkt BCR-ABL1 gena pomoću barem jednog od tih testova (5). Manji postotak pacijenata (5%) boluje od Ph negativne KML kod koje nije moguće naći Ph kromosom.

1.4.2. Faza akceleracije

Faza akceleracije označava pogoršanje bolesti, odnosno prijelaz bolesti prema akutnoj mijeloičnoj leukemiji. Ponekad je moguć prijelaz KML izravno u blastičnu fazu, bez prethodne akcelerirane faze. Pojava akcelerirane faze bila je znatno češća prije ere TKI. Upotreba TKI je

dovela do gubljenja jasnih granica između pojedinih faza. Faza akceleracije je povezana s pogoršanjem općeg stanja, pojavom vrućice i noćnog znojenja, gubitkom tjelesne težine, koštanoj boli zbog širenja koštane srži, progresivnom splenomegalijom i s gubitkom dobrog odgovora na terapiju TKI (4,5). Prema WHO smjernicama postoji šest kriterija pomoću kojih se definira akcelerirana faza. Među te kriterije spada povećanje broja blasta u perifernoj krvi ili koštanoj srži od 10% do 19%, perzistentna trombocitopenija ($<100 \times 10^9/L$) koja nije povezana s terapijom ili trombocitoza $>1000 \times 10^9/L$ koja ne odgovara na terapiju. Ostali kriteriji su povećanje broja leukocita iznad $10 \times 10^9/L$ ili perzistentna leukocitoza, splenomegalija te periferna bazofilija veća od 20%, kao i dodatne citogenetske abnormalnosti dokazane citogenetskom analizom (3–5,13). Displazija i pojačana fibroza te klasteri malih, abnormalnih megakariocita su često prisutni u ovoj fazi, ali sami po sebi nisu dovoljni za dijagnozu prema WHO smjernicama (5). U akceleriranoj fazi postoje česte kromosomske promjene, a među najčešće spada pojava dodatnog Ph kromosoma u 30% slučajeva, trisomija osmog kromosoma u 34% slučajeva te izokromosom dugog kraka 17. kromosoma 17q [i(17q)] u 20% slučajeva. Ove abnormalnosti mogu biti izolirane ili se pojaviti u kombinaciji u 81% slučajeva koji pokazuju citogenetske promjene (4,5,14).

1.4.3. Blastična faza

Blastična faza ili blastna kriza se javlja u gotovo svih pacijenata s neliječenom KML, kao i u gotovo svih pacijenata koji su tretirani isključivo s palijativnim kemoterapeutskim agensima kao što su busulfan ili hidroskiureja (13,15). Prije pojave TKI terapije obično se javljala 4 do 6 godina nakon inicijalne dijagnoze i 18 mjeseci nakon nastupa akcelerirane faze (4,13). U eri imatiniba i ostalih TKI javlja se nakon akcelerirane faze ili je moguća iznenadna pojava bez

prethodnih znakova. Blastična faza nalikuje akutnoj leukemiji i uvijek označava terminalnu fazu bolesti. U blastičnoj fazi može doći do pojave blasta iz mijeloidne ili limfoidne loze, a blastična faza također može biti bifenotipna ili bilinealna što označava pojavu dvije blastične faze odjednom. Blastična faza se dijagnosticira kada dođe do pojave više od 20% blasta u perifernoj krvi ili u koštanoj srži gdje su prisutni veliki klasteri blasta (5,13). U većini slučajeva blastična faza se dijagnosticira iz periferne krvi ili koštane srži, ali moguće je postojanje ekstramedularnih žarišta na što upućuje pojava tumorske mase u pacijenta sa KML (4,5,13).

Blastična faza je mijeloidnog tipa u otprilike 50 do 60% slučajeva. Prije pojave TKI terapije obično je slijedila nakon akcelerirane faze i češće se javljala u starijih pacijenata sa većim brojem leukocita, težom anemijom i s povećanom slezenom. Iako blastična faza odgovara na terapiju TKI, često je refraktorna i preživljenje je loše. Mijeloidna blastična kriza u KML je heterogena. U nekim slučajevima nalikuje de novo akutnoj mijeloidnoj leukemiji bez maturacije, s maturacijom ili s monocitnom komponentnom, a također može nalikovati eritroleukemiji ili megakariocitoblastoj leukemiji. U rijetkim slučajevima blastična faza može imati t(8;21), inv(16)/t(16;16), ili t(15;17) citogenetske abnormalnosti koje se obično povezuju s de novo AML slučajevima. U većem broju slučajeva mijeloidna blastična faza može biti miješanog mijeloidnog tipa gdje spadaju mijeloblasti, monoblasti, eritroblasti, megakarioblasti te nezreli bazofili (4).

Limfoidna blastična faza je činila 16 do 30% slučajeva prije upotrebe TKI terapije. Češće se javlja u jednoj morfološkoj i imunofenotipnoj formi za razliku od mijeloidne blastične krize. Klinički se javlja u mlađih pacijenata s manjim brojem leukocita i s manjom veličinom slezene u usporedbi s pacijentima u kojih se pojavila mijeloidna blastična faza. Limfoidna blastična faza se uobičajeno javlja bez akcelerirane faze, odnosno bez upozoravajućih simptoma, stoga nema postepenog rasta limfoblasta. Morfološki nalikuje ALL iako očito potječe od KML. Limfoidna

blastična faza je češće B prekursorskog fenotipa tipično sa CD19, CD10 te TdT ekspresijom i nedostatkom površinskog imunoglobulina, dok je rjeđe T prekursorskog fenotipa. Iako postoji terapijski odgovor na drugu i treću generaciju TKI i nekih drugih kemoterapeutika, opće preživljenje je i dalje loše te pacijenti često trebaju presađivanje koštane srži (4,16).

U nekim slučajevima moguća je pojava mijeloblasta i limfoblasta u isto vrijeme. Ovaj bilinealni proces može poteći iz dva odvojena citogenetska klona koji su nastali odvojeno od Ph+ klona, stoga se posebna mijeloidna i limfoidna blastična faza javljaju simultano. U bifenotipskoj blastičnoj fazi isti blasti iskazuju limfoidne i mijeloidne značajke. Ovi blasti mogu biti T/mijeloidni ili B/mijeloidni prekursori. Ovaj tip blastične faze zahtjeva iste dijagnostičke kriterije kao i de novo akutna leukemija s miješanim fenotipom (4).

Ekstramedularna blastična faza se javlja prosječno u 5 do 10% slučajeva, stoga bi nakon pojave tumorske mase u pacijenata oboljelih od CML trebalo napraviti brzu evaluaciju i biopsiju tkiva. Najčešće lokalizacije tumorske tvorbe uključuju limfne čvorove, meka tkiva te CNS. Ekstramedularna bolest je obično mijeloidnog tipa te se još naziva i mijeloidnim sarkomom, što je solidni tumor koji se u cijelosti sastoji od mijeloidnih blasta. Pojava blasta u koštanoj srži se može javiti simultano kao i ekstramedularna pojava blasta, no ponekad se javi kratko vrijeme nakon ekstramedularne prezentacije (4,5).

1.5. BCR-ABL1 onkogen

Fuzija ABL1 gena te BCR gena nastala zbog recipročne translokacije t(9;22) dovodi do stvaranja BCR-ABL1 onkogeno koji kodira onkoprotein, konstitutivno aktivnu tirozin kinazu (1). Karakteristični oblik recipročne translokacije t(9;22)(q34;q11.2) koja rezultira nastankom Ph kromosoma se nalazi u 90 do 95% slučajeva (3,4). U manje od 5% slučajeva može postojati

submikroskopska translokacija 9q34 i 22q11.2 koja se ne može otkriti rutinskim citogenetičkim metodama te kariotip izgleda normalno (3,4). U ovom slučaju leukemija se definira kao Ph-negativna KML ili Ph-negativna, BCR-ABL1 pozitivna leukemija te je potrebna FISH analiza kako bi se potvrdio nedostatak Ph kromosoma ili RT-PCR kako bi se otkrio BCR-ABL1 fuzijski transkript (3,4). BCR gen može biti prekinut u tri različite regije te stoga može tvoriti tri različita BCR-ABL1 proteina različite veličine (4). Postoji nekoliko karakterističnih BCR-ABL1 fuzijskih proteina koji nastaju zbog kromosomske translokacije ili molekularne fuzije, a ovise o mjestu loma na BCR genu 22. kromosoma. U gotovo svim slučajevima razlog nastanka KML je lom BCR gena u području egzona 13 (egzon b2) ili egzona 14 (egzon b3) te fuzija ABL1 gena u području drugog egzona (egzon a2) (4,17). Ova fuzija se još naziva major BCR-ABL1 (M-bcr) u kojoj nastaje protein molekularne mase 210 kD zbog čega se naziva p210 BCR-ABL1 proteinom (4,17). U manjem broju slučajeva može doći do fuzije zbog loma u području prvog egzona BCR gena, e1-2, gdje se ova e1a2 fuzija naziva fuzijom asociranom sa minornom točkom loma i nastaje manji protein veličine p190 kD (4,17). Ova fuzija je daleko češća kod Ph⁺ ALL, no kada je prisutna u KML udružena je s povišenim brojem monocita što dovodi do problema u razlikovanju od CMML (4,17). Do KML može doći zbog fuzije regija egzona 17 do 20 gdje dolazi do loma u μ točki te nastala fuzija e19a2 rezultira većim proteinom veličine 230kd (p230 BCR-ABL1) (4,17). U ovim slučajevima (<1%) KML je udružena s povećanim brojem trombocita ili je moguć nastanak CMLN (4,17). Ph kromosom inicira nastanak KML, a za progresiju bolesti u akceleriranu ili blastičnu fazu su ključne dodatne kromosomske ili molekularne promjene (18). Najčešće dodatne citogenetske promjene u akceleriranoj ili blastičnoj fazi su trisomija 8 te trisomija 19, zatim duplikacija Ph kromosoma i izokromosom 17q gdje dolazi do gubitka P53 gena na 17p (18). Pronalazak bilo koje od ovih citogenetskih

promjena znači lošiju prognozu bolesti, odnosno kod ovih pacijenata se očekuje slabiji odgovor na TKI i slabije preživljenje (18).

BCR-ABL1 signalizacija se sastoji od zamršene mreže molekularnih puteva koji dovode do inhibicije apoptoze i stimuliraju proliferaciju stanica (1,19). Unatoč postojanju brojnih molekularnih puteva, smatra se kako je aktivacija MAP kinaze glavni događaj koji potiče nekontroliranu proliferaciju stanica, dok je aktivacija RAS sustava esencijalna za leukemogenu aktivnost BCR-ABL1 (1,19,20). Dokazano je postojanje barem dva neovisna mehanizma aktivacije RAS sustava, a to su direktno vezanje GRB2 proteina te aktivacija SHC proteina tirozinskom fosforilacijom (1,21,22). Razumijevanje BCR-ABL1 je omogućilo razvitak terapijskih strategija koje inhibiraju kinaznu aktivnost BCR-ABL1 (1).

1.6. Prognoza

Nakon uvođenja TKI u terapiju prognoza pacijenata oboljelih od KML se značajno popravila, a očekivano trajanje života je bliže trajanju života opće populacije. Rađena je retrospektivna kohortna studija koja je analizirala 5-godišnje preživljenje 5138 pacijenata u Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) bazi podataka te je zabilježeno poboljšanje 5-godišnjeg preživljenja pacijenata u svim dobnim skupinama (23). Najbolju prognozu imaju pacijenti čija se bolest otkrije u kroničnoj fazi koja se može dobro kontrolirati lijekovima, za razliku od pacijenata čija se bolest otkrije u akceleriranoj ili blastičnoj fazi. U slučaju da bolest u kroničnoj fazi ne odgovara na terapiju moguće je postojanje BCR-ABL1 mutacija, među kojima je najčešća T315I mutacija. Mutacije BCR-ABL1 mogu dovesti do rezistencije na tretman TKI te ova skupina pacijenata ima značajno nižu stopu preživljenja (24). Zbog duljeg trajanja života pacijenata sa KML raste rizik oboljenja od komorbiditeta koji mogu imati veći utjecaj na opće

preživljenje pacijenata nego li osnovna bolest (25). Kako bi se čim uspješnije predvidio ishod bolesti razvijeno je nekoliko „scoring“ sustava: Sokal indeks, Euro (Hasford), EUTOS te ELTS (26). Sokal indeks se temelji na 4 klinička podatka, odnosno na veličini slezene, dobi pacijenata, broju trombocita i postotku blasta u perifernoj krvi, dok Hasford sustav uzima u obzir eozinofiliju i bazofiliju uz podatke iz Sokal indeksa. EUTOS i ELTS također uzimaju u obzir veličinu slezene, postotak blasta, broj trombocita te dob pacijenta (26,27).

1.7. Terapija

Današnje terapijske mogućnosti uključuju primjenu TKI, analognu transplantaciju stanica koštane srži te palijativnu terapiju sa citotoksičnim agensima. Odluka o vrsti terapije prvenstveno ovisi o fazi KML, dobi pacijenta, odgovoru na terapiju sa TKI, a odabir transplantacije koštane srži kao načina liječenja KML ovisi o dostupnosti donora koštane srži, dobi pacijenta te o tome postoje li komorbiditeti zbog kojih transplantacija nije moguća (28). Terapijske mogućnosti u liječenju KML su se značajno promijenile razvojem TKI koji blokiraju interakciju BCR-ABL1 onkoproteina i ATP te na taj način blokiraju staničnu proliferaciju malignog klona. Ovaj ciljani pristup poboljšao je dotadašnje 10-godišnje preživljenje za otprilike 20 do 80%. Tri komercijalno dostupna TKI za liječenje KML su imatinib, dasatinib i nilotinib. Trenutne smjernice uključuju sva tri inhibitora u inicijalno liječenje KML u kroničnoj fazi bolesti (29).

Imatinib mesilat je bio prvi TKI koji je dobio dozvolu Američke Agencije za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) za liječenje pacijenata sa u kroničnoj fazi KML. Veže se kompetitivnom inhibicijom na ATP-vezno mjesto BCR-ABL1 onkoproteina što rezultira inhibicijom fosforilacije proteina uključenih u prijenos staničnih signala. Učinkovito inhibira BCR-ABL1 kinaze, te također blokira PGDFR te c-KIT tirozin kinazu. Ostale strategije

u terapiji prvog reda uključuju davanje viših doza imatiniba ili kombiniranje TKI s dodatnim lijekom kao što je interferon (29).

Dasatinib je oralni TKI druge generacije koji se odlikuje 350 puta jačom potencijom in vitro u odnosu na imatinib. Dasatinib inhibira Src obitelj kinaza što bi moglo biti važno u otupljivanju kritičnih staničnih signalnih puteva, te inducira brže i dublje terapijske odgovore u odnosu na imatinib. Također, transformacije iz kronične faze u fazu akceleracije ili blastičnu fazu su rjeđe kad se primjenjuje dasatinib (30). Pleuralni izljevi se javljaju češće kod upotrebe dasatiniba, a od ostalih nuspojava moguća je mijelosupresija i rijetko pulmonalna hipertenzija (31).

Nilotinib je strukturalni analog imatiniba te ima 30-50 puta jači afinitet za vezna mjesta za ATP BCR-ABL1 onkoproteina in vitro. Kao i kod dasatiniba, pokazao je sposobnost inducirati hematološke i citogenetske odgovore u pacijenata koji ne odgovaraju na imatinib (32). Tijekom terapije nilotinibom zabilježen je povišen rizik od kardiovaskularnih događaja, a od ostalih nuspojava zabilježeni su glavobolje, osip, povišenje indirektnog bilirubina, visoka glukoza u krvi te u rijetkim slučajevima pankreatitis (33).

Broj pacijenata kojima je potrebna alogena transplantacija koštane srži u kroničnoj fazi je značajno pao od početka korištenja TKI. Pretpostavlja se da će opet rasti potreba za transplantacijom koštane srži zbog porasta prevalencije KML zbog toga što oko 2% pacijenata svake godine postanu rezistentni na TKI. Alogena transplantacija ostaje važna terapijska opcija u pacijenata koji ne odgovaraju na barem dva TKI ili imaju BCR-ABL1 mutaciju. Prethodna izloženost TKI ne djeluje negativno na transplantaciju već pacijenti s boljim molekularnim odgovorom mogu bolje prihvatiti transplantat (29).

Ostali agensi kao hidroksiureja, interferon alfa te busulfan su se češće koristili prije ere TKI, a danas se koriste u slučaju KML refraktorne na terapiju TKI (34). Ovi agensi dovode do hematološke remisije, smanjenja simptoma te do smanjenja splenomegalije u 90% slučajeva, ali se smatraju palijativnom terapijom jer ne dovode do poboljšanja općeg preživljenja nego jedino što postižu je dobar citološki odgovor (35).

1.8. Praćenje odgovora na terapiju

Odgovor na terapiju se definira kao hematološki, citološki i molekularni odgovor na terapiju. Hematološki odgovor na terapiju se procjenjuje pomoću WBC i broja trombocita. Potpuni hematološki odgovor na terapiju se definira kada je WBC $<10 \times 10^9/L$ te nema nezrelih granulocita i manje je od 5% bazofila u diferencijalnoj krvnoj slici. Također, broj trombocita mora pasti ispod $450 \times 10^9/L$, te slezena ne smije biti palpabilna. U European LeukemiaNet preporukama stoji kako je optimalan odgovor postizanje hematološkog odgovora unutar 3 mjeseca od početka terapije (36–38).

Citološki odgovor se procjenjuje pomoću metode isprugavanja kromosoma (engl. chromosome banding analysis, CBA) u metafazi stanica koštane srži gdje je potrebno procijeniti barem 20 stanica u metafazi. Citološki odgovor se klasificira prema postotku stanica s pozitivnim Ph kromosomima, odnosno u slučaju $>95\%$ Ph+ stanica nema citološkog odgovora, parcijalni odgovor (PCyR) je 66-95%, minorni odgovor je (mCyR) 36-65%, major (MCyR) 1-35%, a kompletni odgovor (CCyR) na terapiju je u slučaju da nema Ph+ stanica. Ako pacijent nema adekvatan broj stanica u metafazi moguće je procijeniti citološki odgovor pomoću I-FISH (engl. interphase fluorescence in situ hybridization) analize gdje se kompletnim citološkim odgovorom smatra $<1\%$ BCR-ABL1 pozitivnih jezgara, a potrebno je procijeniti barem 200 jezgara (36–39).

Odgovor na terapiju se standardno procjenjuje pomoću qRT-PCR analize periferne krvi kojom se dobiva podatak o molekularnom odgovoru. Internacionalna skala (IS) izražava molekularni odgovor kao razinu BCR-ABL1 transkripta u obliku postotka na logaritamskoj skali. MR² znači da je razina detekcije BCR-ABL1 transkripta $\leq 1\%$ (≥ 2 log redukcije) što otprilike korelira sa kompletnim citološkim odgovorom. Major molekularni odgovor (MMR) ili M³ se definira kada je razina detekcije transkripta $\leq 0.1\%$ (≥ 3 log redukcije). MR⁴ se definira kada je moguća detekcija $\leq 0.01\%$ transkripta na IS (≥ 4 log redukcije), a MR^{4.5} kada je moguće detektirati bolest na razini od $\leq 0.0032\%$ na IS (≥ 4.4 log redukcije). qRT-PCR se radi svaka tri mjeseca dok se ne postigne MMR na terapiju TKI, a u slučaju postizanja MMR, qRT-PCR se radi svakih 6 mjeseci (36–38).

2. Svrha rada

2.1. Glavni cilj istraživanja

Glavni cilj istraživanja je utvrditi postoji li korelacija između morfologije koštane srži prije početka terapije i količine BCR-ABL1 transkripta pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije tj. samog odgovora na terapiju. Odnosno, cilj je utvrditi može li specifična morfologija hematopoetskih staničnih elemenata u koštanoj srži ukazivati na to koji će od pacijenata dobro odgovoriti na terapiju TKI te time utvrditi postoji li prognostički značaj morfologije koštane srži.

2.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. Procijeniti morfologiju koštane srži prema patohistološkim kriterijima u bioptičkim uzorcima (celularnost koštane srži, udio masnog tkiva, odnos mijelopoeze i eritropoeze, morfološke karakteristike megakariocita) i analizirati postoji li korelacija s razinom BCR-ABL1 transkripta.
2. Prikazati vaskularne prostore CD34 imunohistokemijskom metodom i analizirati postoji li korelacija gustoće malih krvnih žila (engl. Microvessel density, MVD) te površine malih krvnih žila (engl. Microvessel area, MVA) s razinom BCR-ABL1 transkripta.
3. Procijeniti postoji li korelacija stupnja mijelofibroze koštane srži i BCR-ABL1 transkripta.
4. Prikupiti laboratorijske parametre iz periferne krvi, izračunati Sokal indeks te procijeniti korelacija BCR-ABL transkripta i Sokal indeksa u našoj ispitivanoj skupini.

3. Ispitanici i postupci

3.1. Ispitanici

U ovoj studiji analizirani su bioptički uzorci koštane srži 32 pacijenta s dijagnozom KML prikupljeni iz arhive Zavoda za patologiju i patološku anatomiju u Rijeci. Studija je bila retrospektivnog karaktera, a u studiju su bili uključeni pacijenti kod kojih je dijagnosticirana KML u periodu od 2004. do 2019. godine na Zavodu za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju KBC-a Rijeka, a za koje su postojali podaci o molekularnom odgovoru na terapiju.

Podatci o pacijentima prikupljeni su na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju te na Zavodu za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju. Prikupljeni podatci su uključivali dob pacijenata, datum prve biopsije, datum kontrolne biopsije, datum i rezultat BCR-ABL analize, te laboratorijske nalaze periferne krvi koji su uključivali broj eritrocita, broj trombocita, broj leukocita, apsolutni broj eozinofila, apsolutni broj bazofila, postotak mijeloblasta u perifernoj krvi te ultrazvučno izmjerenu veličinu slezene. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine prema rezultatu BCR-ABL analize, odnosno prema tome jesu li ili nisu postigli odgovarajući molekularni odgovor na terapiju TKI. Postignut molekularni odgovor su imali svi pacijenti s razinom BCR-ABL transkripta u perifernoj krvi $\leq 0.1\%$ (MMR), a nepostignut molekularni odgovor svi pacijenti s razinom BCR-ABL transkripta $>0.1\%$ u perifernoj krvi. Iz podataka dobi pacijenata, veličine slezene, postotka blasta te broja trombocita izračunat je Sokal indeks pomoću aplikacije Baza lijekova (verzija 5.8).

3.2. Postupci

3.2.1. Priprema preparata i prognostički parametri

Bioptički materijali koštane srži fiksirani su u 10% puferiranom formalinu (Biognost Ltd. Zagreb, Hrvatska) te dekalcinirani otopinom koja se sastoji od dinatrij-EDTA i kiselog pufera (Osteodec, Bio-Optica, M03005, Milano). Preparati su nakon toga dehidrirani etanolom, bistreni sa ksilolom te impregnirani parafinom, nakon čega su uklopljeni kako bi se dobile parafinske kocke. Parafinske kocke su rezane na mikrotomu pri čemu su dobiveni tanki rezovi debljine 3-4 μ m te su stavljeni na stakla koja se suše na temperaturi od 60-70°C u periodu od 15–20 minuta. Rezovi su bojani rutinskim HE bojenjem, PAS, Giemsa bojenjem te je korištena Gomory impregnacija srebrom. Giemsa je metoda koja se koristi za prikaz stanične morfologije unutar hematopoetskog tkiva čime se omogućuje identifikacija različitih staničnih linija i stupanj zrelosti pojedinih stanica hematopoetskog tkiva. PAS prikazuje polisaharide, neutralne mukosupstance i bazalne membrane, dok Gomory metoda prikazuje retikularna vezivna vlakna što pomaže kod procjene stupnja fibroze. Uzorci su procijenjeni prema patohistološkim kriterijima, a analiza je uključivala procjenu mijelofibroze, celularnosti koštane srži, udjela i lokalizacije masnih stanica, morfologije eritrocitopoeze i mijelopoeze, zatim procjenu odnosa eritrocitopoeze i mijelopoeze te morfologije megakariocita (distribucija, klasteri, oblik jezgre, lobuliranost jezgre). Mijelofibroza je gradirana u četiri stupnja. Za nulti stupanj je karakterističan nalaz ravnih, raspršenih retikulinskih vlakana koja se međusobno ne križaju, dok u prvom stupnju mijelofibroze vlakna tvore rijetku mrežu s ukrštanjima koja su najčešće u perivaskularnim područjima. U drugom stadiju retikulinska vlakna su gušća i difuzno raspoređena u koštanoj srži sa širokim ukrštanjima i ponegdje sa fokalnim snopićima kolagena. Posljednji, odnosno treći stupanj mijelofibroze karakterizira još gušći raspored retikulinskih

vlakana sa opsežnim ukrštanjima i debelim snopovima kolagena (40). Celularnost koštane srži, je procijenjena prema dobi pacijenta i podijeljena na hipocelularnu, normocelularnu te hiperocelularnu koštanu srž. Udio masnih stanica je također procijenjen u odnosu na dob pacijenta te su uzorci podijeljeni na uzorke sa sniženim i normalnim udjelom masnih stanica. Raspored masnih stanica je podijeljen na raspored uz trabekule, intratrabekularno te na treću skupinu u kojoj su masne stanice bile ujedno uz trabekule te intratrabekularno. Brojnost eritrona je opisana kao reducirana, uredna te umnožena, a morfologija eritrona kao normoblastična ili megaloblastična. Broj mijeloblasta se procijenio kao reduciran (<1%), uredan (1-5%) ili umnožen (>5%). Jezgre megakariocita su opisane kao oblik jelenjih rogova (engl. staghorn), odnosno duboko lobulirane jezgre u velikim stanicama, gole jezgre bez okolne citoplazme, velike jezgre poput oblaka (engl. cloudlike) s raspršenim kromatinom te kao dismorfne jezgre bizarnih oblika. Lobulacija jezgre megakariocita je podijeljena na normalnu (4-6 lobula), hiperlobuliranu (>6 lobula) i hipolobuliranu (<4 lobula) jezgru, a grupacija je podijeljena na rahle klastere (barem 3 grupirana megakariocita, bez bliskog kontakta), guste klastere (barem 4 grupirana megakariocita koji se dodiruju), kombinacije rahlih i gustih klastera te bez klastera (41). Za pojedine pacijente nedostajale su parafinske kocke te se nije mogla učiniti re-evaluacija bioptata koštane srži stoga pojedini podaci nedostaju.

3.2.2. Imunohistokemijsko bojenje

Uzorci koštane srži za imunohistokemijsku analizu narezani su na tanke rezove debljine 3-4 μ m te prebačeni na stakalca koja su stajala u termostatu preko noći na 37°C. Preparati su nakon sušenja deparafinizirani u ksilenu te isprani u etanolu nakon čega je uslijedio postupak demaskiranja antigena 20 minuta na 97 stupnjeva (PT Link, Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Potom je uslijedio postupak imunohistokemijskog bojenja u automatskom

imunobojaču (DakoAutostainer Plus, DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, CO, SAD). Korišteno je primarno monoklonalno protutijelo CD34 Class II (Clone QBEnd-10, M7165, Glostrup Denmark) kojim se prikazao endotel krvnih žila u koštanoj srži, kao i nezrele stanice, odnosno blasti u koštanoj srži. Primarna protutijela su prethodno razrijeđena u odnosu 1:100 (Dako, Antibody Diluent, S0809). Stakalca su nakon toga inkubirana sat vremena na sobnoj temperaturi te naklopljena sa 3% H₂O₂ (Peroxidase-Blocking Solution, DakoREAL™, Glostrup, Danska) i inkubirana ponovno 6 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se blokirala endogena peroksidaza. Stakalca su onda isprana dva puta u puferu za ispiranje (Dako Wash Buffer 10x, Glostrup, Danska; 0.5 M Tris-HCl, 1.5M NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.6 (± 0.1)) koji se prethodno razrijedio sa destiliranom vodom u omjeru 1:10. Nakon toga je uslijedila primjena vizualizacijskog sistema (DakoREAL™ EnVision™ Detection System, Rabbit/Mouse) u periodu od 30 min, a potom kromogena (DakoREAL™ DAB+ Chromogen (sadržan u EnVision™ kitu)). Kada se diaminobenzidin doda na stakla potrebno je čekati oko 10 minuta kako bi došlo do promjene boje. Stakalca se nakon toga isperu u ddH₂O. Nakon primjene vizualizacijskog sistema uslijedilo je bojanje kroz 1 minutu, s DakoREAL™ Hematoxylin (DakoREAL™, Glostrup, Danska) HE, ispiranje u vodi iz slavine, dehidracija u etanolu, ispiranje u ksilenu i pokrivanje GLC Mounting Medium (Sakura, UK). Kao negativne kontrole u svim imunohistokemijskim bojanjima korišteni su histološki rezovi na koje je umjesto primarnih protutijela nanescena puferska otopina.

3.2.3. Analiza gustoće i površine krvnih žila

Kako bi se odredili angiogeni parametri, na uzrocima koštane srži obojanih anti-CD34 antitijelom, korištena je računalna analiza. Uzorci su analizirani pomoću računalnog programa

SpotBrowser (Alphelys, Plaisir, France) koji koristi metode segmentacije boje na slikama uzoraka koštane srži. Uzete su tri žarišne točke na svakom preparatu gdje je izmjerena površina preparata u mm², broj krvnih žila, ukupna površina krvnih žila u mm² te srednja površina krvnih žila u mm². Stakalce je skenirano na malom povećanju (x20) kako bi se identificirale tri žarišne točke potrebne za analizu, a zatim je skeniran na većem povećanju (x200) gdje su potom kreirane slike za detaljnu analizu. Tijekom analize histološkog uzorka SpotBrowser detektira objekte na temelju valne duljine, zasićenosti te intenziteta boje određenog piksela. Program koristi isti algoritam za sve uzorke koji prepoznajući prazan prostor isti uklanja te broji krvne žile i mjeri srednji promjer krvnih žila. Dobivena mjerenja su se nadalje koristila za izračunavanje gustoće malih krvnih žila (engl. Microvessel density, MVD) koja je dobivena računanjem aritmetičke sredine broja krvnih žila po mm², te srednje površine krvnih žila (engl. Microvessel area, MVA) koja je dobivena računanjem aritmetičke sredine iz tri podatka o srednjoj površini krvnih žila u mm² uzeta s tri žarišne točke. Nedostajalo je 8 parafinskih kocaka stoga je ispitivanje MVD i MVA provedeno u 24 od 32 pacijenta

3.2.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću programa Statistica, verzija 12. Korišteni su χ^2 -test za usporedbu proporcija te Mann-Withney U test. Rezultati s vrijednosti $p < 0,05$ označeni su kao statistički značajni.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci za biomedicinska istraživanja.

4. Rezultati

4.1. Klinički podatci

U studiji od ukupno 32 ispitanika, 19 je bilo muškaraca te 13 žena. Raspon dobi ispitanika u trenutku postavljanja dijagnoze je bio od 22 do 76 godina, a medijan dobi 59 godina. Molekularni odgovor je u 19% (6/32) pacijenata izostao, odnosno pacijenti su i dalje bili pozitivni i imali određeni postotak BCR-ABL transkripta u perifernoj krvi (>0.1%). No u većine ispitanika 81% (26/32) je došlo do molekularnog odgovora na terapiju, MMR-a (≤0.1% BCR-ABL transkripta u perifernoj krvi). Klinička obilježja ispitivane skupine te laboratorijski nalazi prikazani su u Tablici 1.

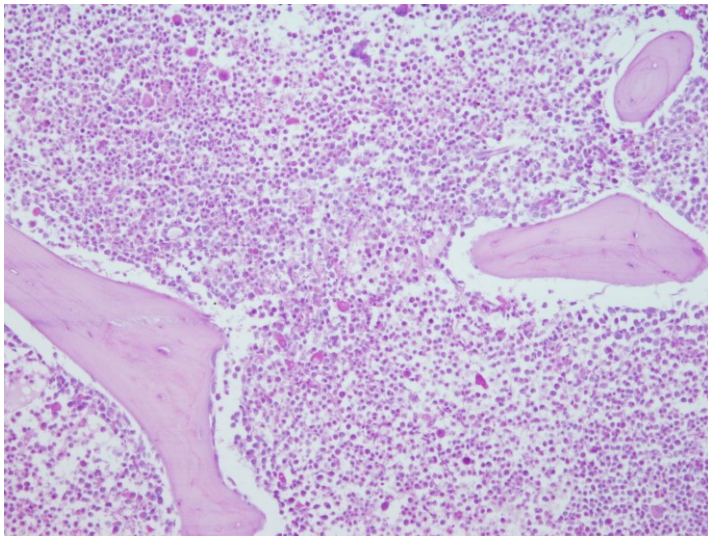
Tablica 1. Klinička obilježja pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije

Obilježje	
Dob (godine) (N=32)	
Medijan	59
Raspon	22-76
Spol	
Muški	19 (59%)
Ženski	13 (41%)
Molekularni odgovor	
Postignut	26 (81%)
Nije postignut	6 (19%)
Laboratorijski nalazi	
Eritrociti x10¹²/L, (medijan, raspon)	4,2 (3 – 5,5)
Trombociti x10¹²/L, (medijan, raspon)	347,0 (142 – 1049)
Leukociti x10¹²/L, (medijan, raspon)	38,2 (3,4 – 334,5)
Eozinofili, aps, x10⁹/L, (medijan, raspon)	1,0 (0 – 11,5)
Bazofili, aps, x10⁹/L, (medijan, raspon)	1,4 (0 – 90,3)
Hemoglobin (g/L), (medijan, raspon)	120,5 (86 – 160)
Mijeloblasti (%), (medijan, raspon)	1,5 (1 – 17)
Veličina slezene (cm), (medijan, raspon)	13,3 (10 – 21)

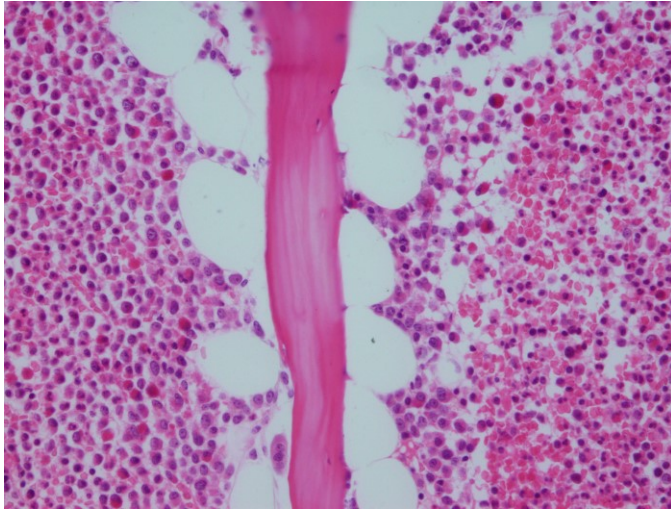
4.2. Patohistološke karakteristike

U uzorcima koštane srži procijenili smo celularnost koštane srži, udio i distribuciju masnih stanica, brojnost i morfologiju eritrona, postotak mijeloblasta, distribuciju i grupaciju megakariocita te oblik i lobulaciju jezgre megakariocita prema patohistološkim kriterijima (40,41).

Većina uzoraka je bila hipercelularna (Slika 1) 96% (25/26). Od 26 dostupnih bioptičkih uzoraka, 4% (1/26) uzoraka je bilo hipocelularno, a normocelularnih uzoraka nije bilo. Udio masnih stanica koštane srži je bio snižen u 96% (25/26) uzoraka te uredan u 4% (1/26). Masne stanice su bile lokalizirane uz trabekule koštane srži u 65% (17/26) uzoraka, intertrabekularno u 8% (2/26) uzoraka te je u 27% (7/26) uzoraka postojala lokalizacija masnih stanica uz trabekule i intertrabekularno (Slika 2).



Slika 1. Bioptički uzorak koštane srži pacijenta oboljelog od kronične mijeloične leukemije obojen PAS (engl. Periodic acid-Schiff) bojenjem. Koštana srž je hipercelularna, masne stanice su reducirane (povećanje x100).



Slika 2. Bioptički uzorak koštane srži pacijenta oboljelog od kronične mijeloične leukemije obojen HE (hematoksilin-eozin) bojenjem. Reducirane masne stanice su raspoređene uz koštane trabekule (povećanje x200).

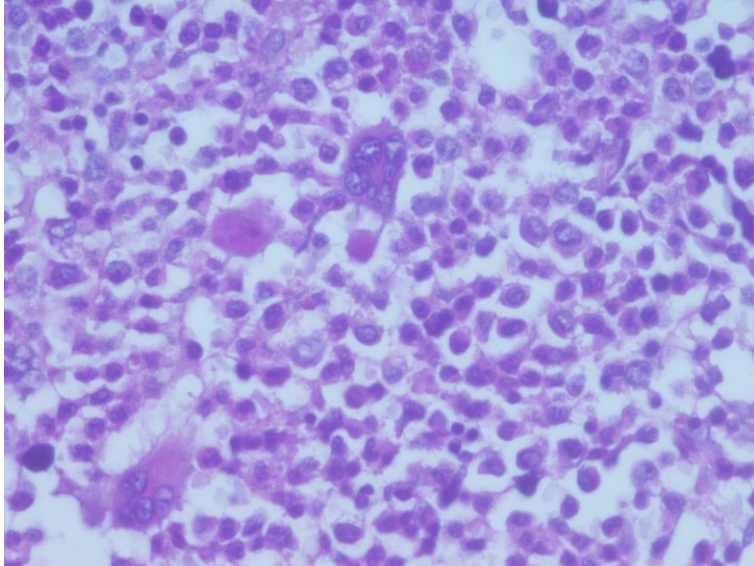
Broj eritrona je bio reduciran u 50% (13/26) uzoraka, uredan u 31% (8/26) uzoraka te umnožen u 19% (5/26) uzoraka. Eritroni su morfološki bili podijeljeni na normoblastične i megaloblastične gdje su u svih 26 dostupnih uzoraka procijenjeni kao normoblastični.

U 64% (16/25) uzoraka mijeloblasti su bili reducirani (<1%), a urednog postotka (1-5%) u 36% (9/25) uzoraka, dok uzoraka s umnoženim mijeloblastima (>5%) nije bilo.

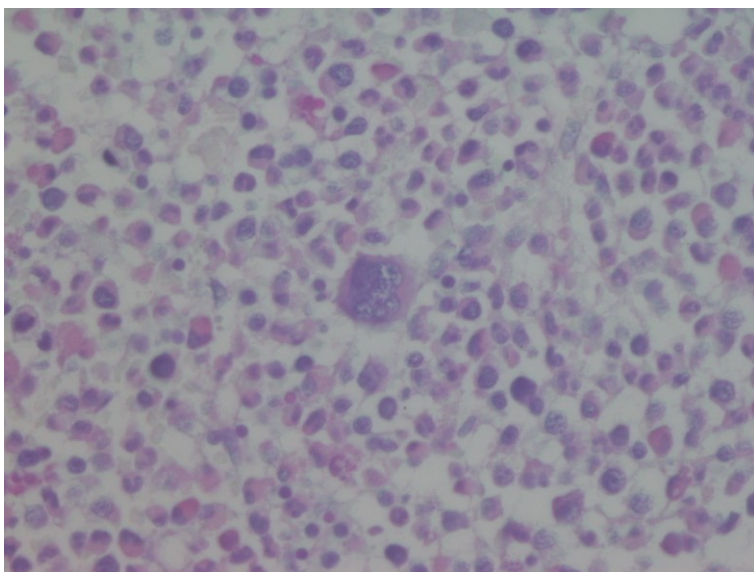
Obzirom na distribuciju megakariociti su se mogli naći uz trabekule koštane srži u 4% (1/25) uzoraka ili je distribucija megakariocita bila difuzna u 96% (24/25).

„Staghorn“ oblik jezgre se našao u 54% (14/26) uzoraka (Slika 3), „cloudlike“ u 88% (23/26) uzoraka (Slika 4), gola jezgra megakariocita kod 73% (19/26) uzoraka, a dismorfna jezgra u 4% (1/26). U svim uzorcima (26/26) nađeni su megakariociti s hipolobuliranim

jezgrama, dok ni u jednom uzorku nije bilo megakariocita s hiperlobuliranim jezgrama. Normalno lobulirane jezgre nađene su u 31% (8/26) uzoraka.

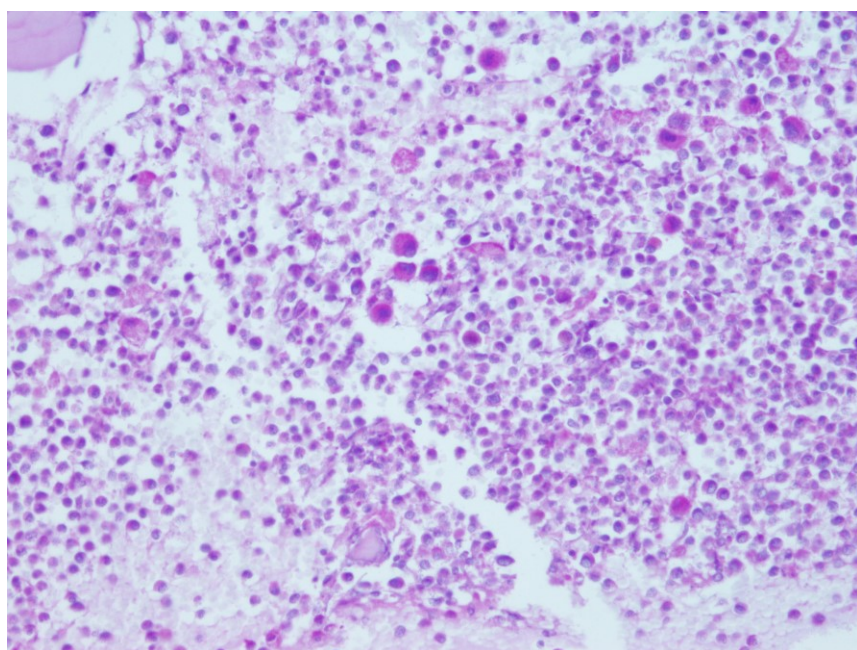


Slika 3. Bioptički uzorak koštane srži pacijenta oboljelog od kronične mijeloične leukemije obojen PAS (engl. Periodic acid-Shiff) bojenjem. Slika prikazuje „staghorn“ oblik megakariocita (povećanje x400).



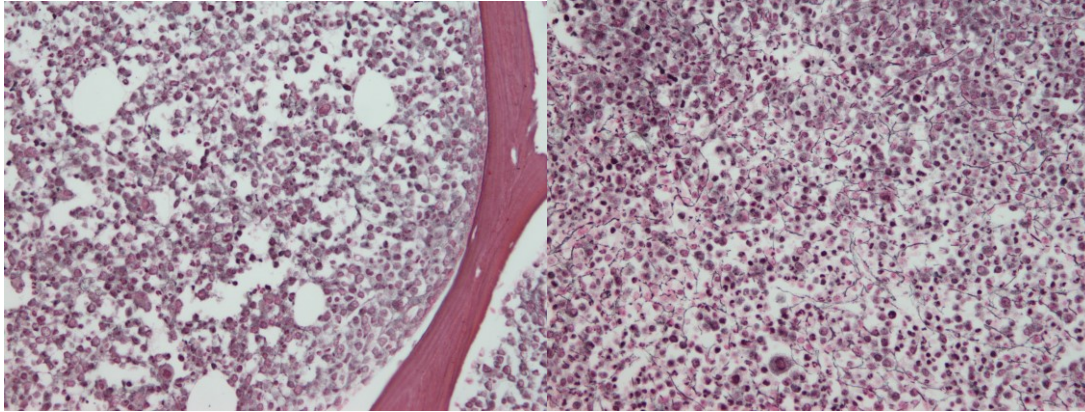
Slika 4. Bioptički uzorak koštane srži pacijenta oboljelog od kronične mijeloične leukemije obojen PAS (engl. Periodic acid-Shiff) bojenjem. Slika prikazuje „cloudlike“ oblik megakariocita (povećanje x400).

Kod većine uzoraka megakariociti su bili grupirani u rahle klustere 62% (16/26), kod 15% (4/26) uzoraka klastera nije bilo, a kombinacije rahlih i gustih klastera su nađene u 23% (6/26) uzoraka (Slika 5).

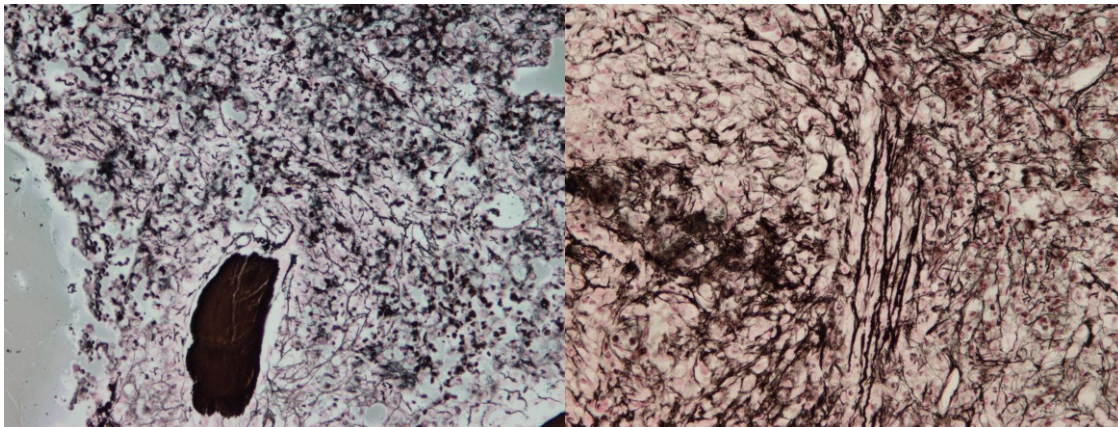


Slika 5. Bioptički uzorak koštane srži pacijenta oboljelog od kronične mijeloične leukemije obojen PAS (engl. Periodic acid-Shiff) bojenjem. Slika prikazuje megakariocite grupirane u rahle klustere (povećanje x200).

Mijelofibroza koštane srži se procjenjivala u 4 stupnja, gdje je stupanj 0 nađen u 24% (6/25) uzoraka. Mijelofibroza 1. stupnja nađena je u 44% (11/25) uzoraka, 2. stupnja u 24% (6/25) uzoraka te 3. stupnja u 8% (2/25) uzoraka (Slika 6-9). Patohistološke karakteristike uzoraka ispitivane skupine prikazane su u Tablici 2.



Slika 6. i 7. Biopsijski uzorci koštane srži pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije obojani Gomory bojenjem. Slika lijevo prikazuje stupanj 0 mijelofibroze koštane srži, a slika desno prikazuje stupanj 1 mijelofibroze koštane srži (povećanje x200).



Slika 8. i 9. Biopsijski uzorci koštane srži pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije obojani Gomory bojenjem. Slika lijevo prikazuje stupanj 2 mijelofibroze koštane srži, a slika desno prikazuje stupanj 3 mijelofibroze koštane srži (povećanje x200).

Tablica 2. Patohistološke karakteristike bioptičkih uzoraka koštane srži u pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije

Obilježje	
Celularnost koštane srži	
Hipocelularna	1 (4%)
Normocelularna	0 (0%)
Hiperocelularna	25 (96%)
Udio masnih stanica	
Snižen	25 (96%)
Uredan	1 (4%)
Distribucija masnih stanica	
Uz trabekule	17 (65%)
Intertrabekularno	2 (8%)
Uz trabekule+intertrabekularno	7 (27%)
Broj eritrona	
Reduciran	13 (50%)
Uredan	8 (31%)
Umnožen	5 (19%)
Morfologija eritrona	
Normoblastični eritroni	26 (100%)
Megaloblastični eritroni	0 (0%)
Mijeloblasti	
Reducirani	16 (64%)
Uredni	9 (36%)
Umnoženi	0 (0%)
Distribucija megakariocita	
Uz trabekule	1 (4%)
Difuzno	24 (96%)
Grupacija megakariocita	
Nema klastera	4 (15%)
Rahli klasteri	16 (62%)
Gusti klasteri	0 (0%)
Rahli+gusti klasteri	6 (23%)
Morfologija jezgre megakariocita	
Staghorn jezgra	14 (44%)
Gola jezgra	23 (72%)
Cloudlike jezgra	19 (26%)
Dismorfna jezgra	1 (3%)
Lobuliranost jezgre megakariocita	
Hiperlobulirana jezgra	0 (0%)
Normolobulirana jezgra	8 (31%)
Hipolobulirana jezgra	26 (100%)
Mijelofibroza koštane srži	
0	6 (24%)
I	11 (44%)
II	6 (24%)
III	2 (8%)

4.3. Korelacija morfoloških karakteristika koštane srži i molekularnog odgovora

Rezultati su pokazali kako je postignut molekularni odgovor statistički značajno povezan s povećanom celularnosti koštane srži ($p=0.037$), odnosno sa sniženim udjelom masnih stanica u koštanoj srži zbog hipercelularnosti koštane srži ($p=0.037$). Osim što postoji značajna povezanost s brojem masnih stanica i lokalizacija masnih stanica uz trabekule koštane srži također je statistički značajno korelirala s postignutim molekularnim odgovorom ($p=0.010$).

Od ostalih morfoloških parametara jedino se pokazala statistički značajnom povezanost postignutog molekularnog odgovora s morfološkim karakteristikama megakariocita. Postignut molekularni odgovor je statistički značajno povezan s difuznom distribucijom megakariocita u koštanoj srži ($p=0.041$), kao i sa grupiranjem megakariocita (stvaranjem klastera) i to kada su grupirani kao rahli klasteri ($p=0.007$). Još jedna morfološka karakteristika megakariocita koja je pokazala statistički značajnu povezanost s postignutim molekularnim odgovorom na terapiju je „cloudlike“ oblik jezgre megakariocita ($p=0.027$).

Ostale morfološke karakteristike nisu bile statistički značajno povezane s postignutim molekularnim odgovorom (broj i morfologija eritrona, mijeloblasti, ostali oblici megakariocita, lobuliranost jezgre megakariocita te mijelofibroza).

Morfološke karakteristike koštane srži te njihova povezanost s molekularnim odgovorom prikazane su u Tablici 3.

Tablica 3. Morfološke karakteristike koštane srži u korelaciji s molekularnim odgovorom

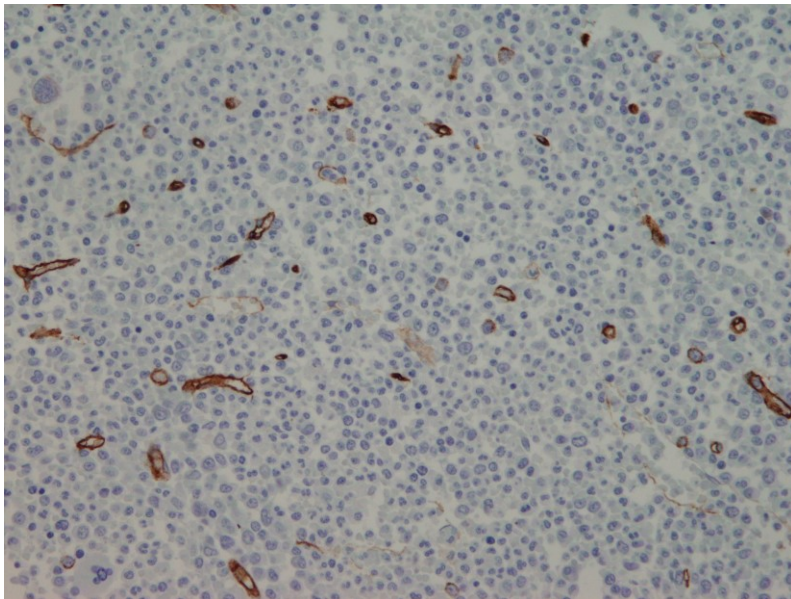
Obilježje	Postignut molekularni odgovor (N=26)	Nije postignut molekularni odgovor (N=6)	p vrijednost
Celularnost			
Hipercelularnost	21	4	
Hipocelularnost	0	1	p=0.037
Udio masnih stanica			
Snížen	21	4	p=0.037
Uredan	0	1	
Lokalizacija masnih stanica			
Uz trabekule	15	2	p=0.010
Intratrabekularno	0	2	
Uz trabekule+intratrabekularno	6	1	
Lokalizacija megakariocita			
Uz trabekule	0	1	
Difuzno	20	4	p=0.041
Lokalizacija megakariocita			
Nema klastera	1	3	
Rahli klasteri	14	2	p=0.007
Gusti klasteri	0	0	
Rahli+gusti klasteri	6	0	
Cloudlike jezgra			
Da	1	2	
Ne	20	3	p=0.027

* χ^2 -test

4.4. Korelacija MVD i MVA s molekularnim odgovorom

U ispitivanoj skupini (N=24) izračunata je srednja vrijednost MVD te MVA koja je iznosila 35,03 po mm², odnosno 118,5 mm². Nadalje, nađen je medijan MVD i MVA koji je iznosio 29,5 po mm² za MVD, odnosno 108,28 mm² za MVA. Minimalna vrijednost MVD je

iznosila 8,33 po mm^2 , a maksimum 83 po mm^2 , dok je minimum od MVA iznosio 21,69 mm^2 , a maksimum 335,25 mm^2 . U skupini pacijenata u kojih je postignut molekularni odgovor (N=20) srednja vrijednost MVD je iznosila 37,8 po mm^2 , medijan 30,67 po mm^2 , maksimum 83 po mm^2 , a minimum 12,67 po mm^2 , dok je srednja vrijednost MVA iznosila 110,15 mm^2 , medijan 116,51 mm^2 , maksimum 333,70 mm^2 , a minimum 21,69 mm^2 . U skupini pacijenata u kojih nije postignut molekularni odgovor (N=4) srednja vrijednost MVD je iznosila 21,17 po mm^2 , medijan 20,67 po mm^2 , maksimum je iznosio 35 po mm^2 , a minimum 8,33 po mm^2 , dok je srednja vrijednost MVA iznosila 160,26 mm^2 , medijan 134,38 mm^2 , maksimum 335,25 mm^2 , a minimum 37,05 mm^2 . Slika 10 prikazuje primjer uzorka bojanog anti-CD34 antitijelom koji je korišten za računanje MVD i MVA. Tablica 4. prikazuje usporedno vrijednosti MVD i MVA u skupinama pacijenata kod kojih je postignut, odnosno nije postignut molekularni odgovor. Usporedbom MVD te MVA koštane srži s molekularnim odgovorom nije nađena statistički značajna povezanost molekularnog odgovora te MVD ($p=0.23$) i MVA ($p=0.46$).



Slika 10. Bioptički uzorak koštane srži pacijenta oboljelog od kronične mijeloične leukemije s anti-CD34 protutijelom za prikaz krvnih žila (povećanje x200).

Tablica 4. Usporedba angiogenih parametara u bioptičkim uzorcima koštane srži bolesnika s kroničnom mijeloičnom leukemijom ovisno o postignutom molekularnom odgovoru

	Postignut molekularni odgovor (N=20)	Nije postignut molekularni odgovor (N=4)	p vrijednost
Angiogeni parametri			
MVD* (medijan, raspon)	30,67 (12,67 – 83)	20,67 (8,33 – 35)	0,23**
MVA* (medijan, raspon)	116,51 (21,69 – 333,70)	134,38 (37,05 – 335,25)	0,46***

*MVD= gustoća malih krvnih žila (engl. Microvessel density); MVA =površina malih krvnih žila (engl. Microvessel area)

** Mann-Whitney U test izračuna povezanosti molekularnog odgovora i MVD

*** Mann-Whitney U test povezanosti molekularnog odgovora i MVA

4.5. Korelacija molekularnog odgovora i laboratorijskih nalaza, veličine slezene te Sokal indeksa

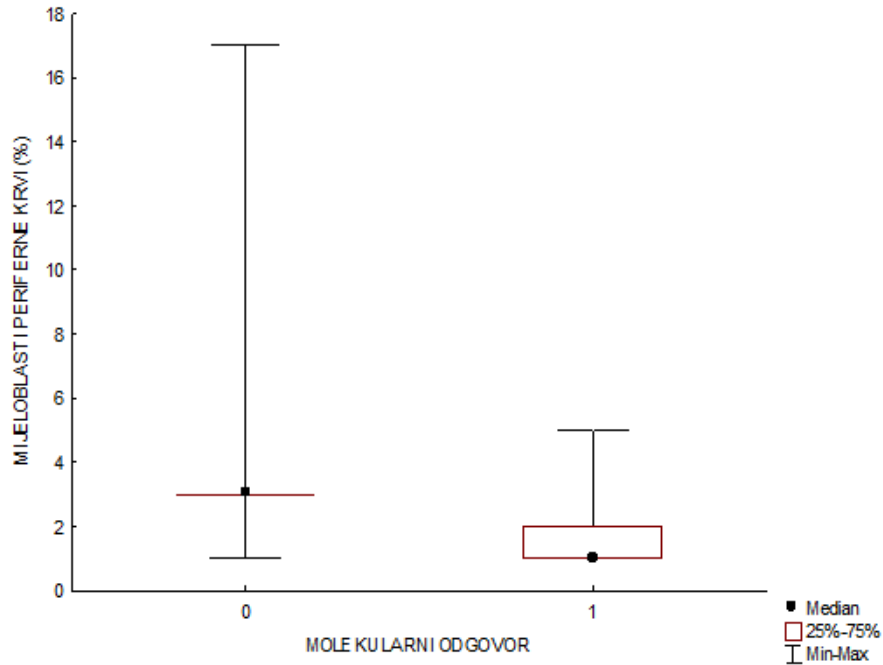
Analizom odnosa molekularnog odgovora i laboratorijskih nalaza periferne krvi tj. broja eritrocita, trombocita i leukocita, apsolutnog broja bazofila i eozinofila, hemoglobina i postotka mijeloblasta utvrđeno je kako postoji statistički značajna korelacija postotka mijeloblasta ($p=0.035$) s postignutim molekularnim odgovorom, dok drugi parametri nisu pokazali statistički značajnu korelaciju s postignutim molekularnim odgovorom (Slika 11). Za pacijente koji nisu postignuli molekularni odgovor medijan postotka mijeloblasta iznosio je 3% dok je raspon bio između 1 i 17, dok je za pacijente s postignutim molekularnim odgovorom medijan postotka mijeloblasta iznosio 1% s rasponom između 1 i 5. Također je utvrđeno kako nema statistički značajne povezanosti veličine slezene prije početka terapije te Sokal indeksa s molekularnim odgovorom.

U Tablici 5. je prikazana povezanost molekularnog odgovora te laboratorijskih nalaza periferne krvi, veličine slezene prije početka terapije te Sokal indeksa.

Tablica 5. Usporedba laboratorijskih nalaza periferne krvi, veličine slezene i Sokal indeksa u pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije ovisno o molekularnom odgovoru

	Postignut molekularni odgovor (N = 20)	Nije postignut molekularni odgovor (N= 4)	p vrijednost*
Dob	59,5 (22 – 76)	56 (28 – 72)	0.717
(medijan, raspon)			
Eritrociti, x10¹²/L	4,65 (3 – 5,5)	3,91 (3,01 – 5,13)	0.519
(medijan, raspon)			
Trombociti, x10¹²/L	359 (142 - 1049)	273 (186 – 646)	0.435
(medijan, raspon)			
Leukociti x10⁹/L	38,8 (3,4 – 334,5)	20,20 (4,5 – 146,40)	0.649
(medijan, raspon)			
Bazofili, aps, x10⁹/L	1,45 (0 – 11,5)	0,66 (0,2-7,1)	0.174
(medijan, raspon)			
Eozinofili, aps, x10⁹/L	1,84 (0 – 90,32)	0,90 (0,4 – 2,02)	0.396
(medijan, raspon)			
Hemoglobin [(g/L), medijan, raspon]	124 (86 – 160)	118 (94 – 129)	0.313
Mijeloblasti [(%), medijan, raspon]	1 (1 – 5)	3 (1 – 17)	0.035
Slezena [(cm), medijan, raspon]	13,5 (10 – 18)	12,5 (12 – 21)	0.780
Sokal score	0,9 (0,6 – 2,1)	1 (0,6 – 3,5)	0.459
Eritro:mijelo loza	-	-	0.371

*Mann-Whitney U test



Slika 11. Dijagram prikazuje usporedbu postotka mijeloblasta u perifernoj krvi između pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije koji nisu postigli kompletan molekularni odgovor u odnosu na pacijente koji su postigli kompletan molekularni odgovor nakon terapije. Postotak mijeloblasta u perifernoj krvi pacijenata koji nisu postigli kompletni molekularni odgovor značajno je viši ($p=0.035$; Mann-Whitneyev U test)

5. Rasprava

KML je hematološka maligna bolest koju karakterizira BCR-ABL1 konstitutivno aktivna tirozin kinaza. Terapija KML se provodi TKI, a odgovor na terapiju se danas najčešće definira kao citološki odgovor ili molekularni odgovor. Pacijenti koji postignu MMR ($\leq 0.1\%$) u razdoblju od 12 mjeseci imaju bolje izgleda ostati u citološkoj remisiji za razliku od pacijenata koji isti nisu postigli, te se zbog toga smatra kako je MMR značajno bolji prediktor ishoda bolesti u odnosu na citološki odgovor na terapiju (42–44). Cilj našeg rada bio je utvrditi može li se pomoću morfoloških karakteristika koštane srži prije početka terapije predvidjeti ishod terapije TKI, odnosno determinirati povezanost MMR te morfoloških karakteristika koštane srži prije terapije. Zanimalo nas je postoje li specifične morfološke značajke koje bi nam već na prvoj biopsiji mogle ukazati na pacijente koji će imati lošiji odgovor na terapiju TKI. Takve pacijente bi se moglo pobliže pratiti tijekom bolesti i ako ne postižu adekvatan rani molekularni odgovor, primijeniti TKI koji postiže dublje i brže molekularne odgovore.

U ovom radu istraživana je korelacija između morfoloških parametara koštane srži, laboratorijskih nalaza periferne krvi, veličine slezene te Sokal indeksa prije početka terapije s količinom BCR-ABL1 transkripta u perifernoj krvi pacijenata oboljelih od kronične mijeloične leukemije, odnosno odgovora na terapiju. Pregledom literature nađen je vrlo mali broj radova koji istražuju povezanost molekularnog odgovora s morfologijom koštane srži, odnosno što se tiče istraživanja korelacije laboratorijskih nalaza i veličine slezene s molekularnim odgovorom nije nađeno radova u literaturi.

U našem istraživanju potvrđena je korelacija hipercelularnosti koštane srži, udjela i rasporeda masnih stanica te morfologije megakariocita s postignutim molekularnim odgovorom. U literaturi postoji jedan rad koji istražuje povezanost molekularnog odgovora i morfoloških karakteristika koštane srži, ali je fokus istraživanja na morfologiji koštane srži 3 mjeseca nakon terapije imatinibom. U tom istraživanju uzeto je 7 morfoloških i citoloških karakteristika. Kao i u našem radu podijelili su celularnost koštane srži na normocelularnu i hipercelularnu. Odnos mijelopoeze i eritropoeze (M:E) je podijeljen na $\leq 4:1$, odnosno $>4:1$, fibroza koštane srži grupirana je u dvije skupine (gradus 0-2 te gradus 3). Izračunali su postotak abnormalnih megakariocita koji je bio pozitivan u slučaju $\geq 10\%$ megakariocita. Od citoloških karakteristika uzeli su u obzir uspješnost aspiracije koštane srži, te postotak bazofila i blasta u aspiratu koštane srži. Pandey i suradnici su za svaku prisutnu karakteristiku dodavali 1 bod te je maksimalan zbroj mogao biti 7 bodova. Od 22 pacijenta s 0 ili 1 bodom nakon terapije njih 15/22 postiglo je kompletan molekularni odgovor, dok je njih 7/22 imalo suboptimalan molekularni odgovor ($>10\%$ BCR-ABL1 transkripta u perifernoj krvi). Svi pacijenti (N=4) s ≥ 2 boda nakon terapije su imali suboptimalan molekularni odgovor. Nakon 3 mjeseca većina slučajeva pokazala je normalizaciju celularnosti, M:E odnosa, redukciju abnormalnih megakariocita, fibroze koštane srži te broja blasta. Istraživanje je pokazalo kako imatinib normalizira ne samo celularnost nego i mikrookoliš redukcijom fibroze i angiogeneze, a morfološke karakteristike 3 mjeseca nakon terapije su povezane s molekularnim odgovorom na terapiju. U istraživanju Pandey i suradnika nije objašnjena korelacija navedenih morfoloških karakteristika prije početka terapije i molekularnog odgovora (45).

Neki radovi istražuju povezanost kompletnog citološkog odgovora na terapiju TKI i morfoloških karakteristika koštane srži nakon primjene terapije (46–48). Istraživanja Srinivas i

suradnika te Lugli i suradnika opisuju kako je u pacijenata koji su postigli CCyR došlo do normalizacije celularnosti koštane srži, odnosa mijelopoeze i eritropoeze, redukcije abnormalnih megakariocita te do redukcije fibroze, kao i normalizacija broja blasta i bazofila u perifernoj krvi (48). Lugli i suradnici zaključuju kako su perzistentne morfološke abnormalnosti u korelaciji s slabim odgovorom na terapiju te predlažu usporednu evaluaciju morfoloških parametara i citološkog odgovora kako bi se izdvojili pacijenti koji slabo odgovaraju na imatinib i postali kandidati za alternativnu terapiju (47).

Nadalje, istraživali smo povezanost mijelofibroze i molekularnog odgovora te nismo potvrdili korelaciju između ta dva parametra, iako u literaturi postoji više radova koji tvrde kako viši stupanj mijelofibroze (3,4) korelira s nemogućnosti postizanja dobrog molekularnog odgovora u prvih godinu dana nakon početka terapije TKI. Odnosno, blaži stupanj mijelofibroze (0,1) sugerira kako će pacijent imati bolje izgleda postići dobar molekularni odgovor na terapiju pa time imati i bolju prognozu (49–51). Eliacik i suradnici navode bFGF (engl. Basic fibroblast growth factor) kao čimbenik koji bi mogao predstavljati vezu između angiogeneze, fibroze i klonalne neoplastične hematopoeze, a kako fibroblasti proizlaze iz hematopoetskih stanica razvoj mijelofibroze u KML bi mogao biti povezan s klonalnim procesom (51). Kimura i suradnici navode PDGF, kojeg ispuštaju atipični megakariociti te stimulira fibroblaste, kao faktor koji vjerojatno ima važnu ulogu u stvaranju mijelofibroze (52). Neki autori su umjesto stupnjevanja mijelofibroze mjerili postotak retikulinskih vlakana po mm^2 i utvrdili da pacijenti koji su brže ušli u akceleriranu, odnosno blastičnu fazu bolesti imaju veći postotak retikulinskih vlakana po mm^2 , odnosno smatraju kako je mijelofibroza zapravo dobar prediktor prognoze u pacijenata s KML (53).

U ovoj studiji analizirali smo postoji li korelacija MVD i MVA s molekularnim odgovorom no u našoj ispitivanoj skupini nismo našli povezanost između navedenih parametara i molekularnog odgovora. Pregledom kroz literaturi nalazi se tek jedan rad koji detaljnije istražuje povezanost angiogeneze i molekularnog odgovora na terapiju koji je pokazao kako niže vrijednosti MVD koreliraju s postizanjem dobrog molekularnog odgovora (54). U tome radu Čojbašić i suradnici su zaključili kako je u pacijenata koji nisu postigli povoljan terapijski odgovor zabilježen veći broj krvnih žila, veći MVA te su krvne žile bile nepravilnijih oblika u odnosu na pacijente koji su postigli zadovoljavajući terapijski odgovor (54). Istraživanje Korkolopoulou i suradnika je pokazalo da su vrijednosti MVD veće u blastičnoj fazi u odnosu na kroničnu fazu KML što bi moglo indicirati da pojačana angiogeneza dovodi do otpornosti na terapiju TKI i do prelaska kronične faze u blastičnu fazu (55). Agresivni rast tumora dovodi do hipoksije tkiva, a hipoksija potiče sekreciju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. Vascular endothelial growth factor, VEGF) koji potiče angiogenezu i dovodi do širenja i daljnjeg rasta tumora (56). Istraživanje Pruneri i suradnika je istraživalo ekspresiju VEGF u pojedinim stanicama u mijelodisplastičnih sindroma te su pronašli pojačanu ekspresiju VEGF u megakariocitima (57). U našem radu postojala je statistički značajna korelacija određenih morfoloških oblika megakariocita s postizanjem dobrom molekularnog odgovora što bi moglo biti povezano s ekspresijom VEGF. Veliki megakariociti s hiperlobuliranim jezgrama i grupirani u guste klastere u literaturi se navode kao značajka Ph negativnih mijeloproliferativnih bolesti (58). U našem radu pacijenti s megakariocitima grupiranima u rahle klastere su bolje odgovarali na terapiju, dok lobulacija jezgre megakariocita nije bila statistički značajno povezana s odgovorom na terapiju.

Rezultati ove studije su pokazali kako je broj blasta statistički značajno povezan s postizanjem molekularnog odgovora. Nije nađeno radova u literaturi koji istražuju povezanost između broja blasta i postizanja molekularnog odgovora. Neke studije su istraživale povezanost broja blasta u perifernoj krvi te općeg preživljenja pacijenata. Studija Pfirmann i suradnika je determinirala kako pacijenti koji imaju veći broj blasta u perifernoj krvi češće završe sa smrtnim ishodom (27). Broj blasta je jedan od parametara u prediktivnim indeksima kao što su Sokal, Hasford i EUTOS.

Sokal i Hasford prediktivni indeksi su razvijeni u eri prije početka korištenja TKI terapije te se njihova vrijednost u današnjem dobu još uvijek ispituje, ali se smatra kako se još uvijek mogu koristiti kao prediktivni indeksi (59). U ovom istraživanju smo ispitivali povezanost Sokal indeksa te molekularnog odgovora na TKI terapiju te nismo našli statistički značajne povezanosti Sokal indeksa i postizanja molekularnog odgovora. Neka istraživanja uspoređuju korist Sokal indeksa i drugih prediktivnih indeksa kao što je EUTOS, koji je razvijen 2011. kao prediktivni indeks koji bolje predviđa ishod terapiju u odnosu na starije indekse, a neki autori navode i Hasford indeks kao bolji izbor u odnosu na Sokal indeks (26,60–62). Rezultati drugih istraživanja pokazuju kako je EUTOS definitivno bolji prediktivni indeks od Sokal indeksa. EUTOS ima svoje nedostatke, ali za sad nema boljih prediktivnih indeksa, a EUTOS je jednostavna i jeftina metoda s kojom se može procijeniti kakav će biti odgovor na terapiju (26,63,64).

6. Zaključak

Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako hipercelularnost koštane srži, odnosno udio i raspored masnih stanica, te morfološke karakteristike megakariocita kao što su rahli klasteri, difuzna distribucija megakariocita u koštanoj srži te „cloudlike“ jezgra megakariocita koreliraju s postizanjem boljeg odgovora na terapiju TKI u pacijenata oboljelih od KML. Od laboratorijskih parametara jedino postotak mijeloblasta u perifernoj krvi korelira s postignutim molekularnim odgovorom na terapiju.

Morfološki parametri i postotak mijeloblasta u perifernoj krvi bi mogli poslužiti kao prediktor terapijskog ishoda u pacijenata oboljelih od KML.

7. Sažetak

Kronična mijeloična leukemija (KML) je maligna hematološka bolest koju karakterizira recipročna translokacija t(9;22) koja dovodi do stvaranja BCR-ABL1 onkogen. Liječenje KML se provodi tirozin kinaznim inhibitorima (TKI), a veliki molekularni odgovor (engl. Major molecular response, MMR) na terapiju TKI se prati određivanjem razine BCR-ABL1 transkripta u krvi. MMR se definira kada je postignuta $\leq 0,1\%$ razina BCR-ABL1 transkripta u perifernoj krvi. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li korelacija morfoloških karakteristika koštane srži, laboratorijskih nalaza periferne krvi, veličine slezene te Sokal indeksa prije početka terapije te postizanja molekularnog odgovora (engl. Molecular response, MR) na terapiju TKI. Analizirana je koštana srž 32 pacijenta s dijagnozom KML u razdoblju od 2004. do 2019. godine. Rezultati su pokazali povezanost postignutog MR s hipercelularnosti koštane srži ($p=0,037$), odnosno sniženog udjela masnih stanica ($p=0,037$) te distribucije masnih stanica uz trabekule koštane srži ($p=0.010$). Također, utvrđena je statistički značajna povezanost između postignutog MR i difuzne distribucije megakariocita ($p=0.041$), grupacije megakariocita po tipu rahlih klastera ($p=0.007$) i „cloud-like“ morfologije jezgre megakariocita ($p=0.027$). Ostali morfološki parametri nisu pokazali statistički značajnu povezanost s MR. Uspoređivanjem karakteristika malih krvnih žila kao što su srednja gustoća (MVD) i srednja površina malih krvnih žila (MVA) nije se našlo povezanosti s MR. Sokal indeks nije pokazao povezanost s MR statusom. Od laboratorijskih nalaza jedino je postotak mijeloblasta ($p=0.035$) pokazao statistički značajnu povezanost s postignutim MR. Rezultati ove studije ukazuju na mogućnost korištenja morfoloških parametara koštane srži te postotka mijeloblasta periferne krvi kao mogućeg prediktora ishoda terapije u pacijenata oboljelih od KML.

Ključne riječi: Kronična mijeloična leukemija ; Molekularni odgovor ; Morfologija koštane srži ; MVA ; MVD ; Sokal indeks

8. Summary

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant hematological disease characterized by the t(9;22) reciprocal translocation which results in the formation of the BCR-ABL1 oncogene. CML treatment with tyrosine kinase inhibitors (TKI) is defined by the major molecular response (MMR) when BCR-ABL1 transcript level is $\leq 0,1\%$ in the peripheral blood. The aim of this study was to analyze a morphometry of the bone marrow, peripheral blood laboratory results, the spleen size and Sokal score before therapy and compare it to the molecular response (MR) status after the TKI therapy. We analyzed bone marrow biopsy material of 32 patients which were diagnosed with CML in the period between 2004. and 2009. The MR showed statistically significant association with hypercellular bone marrow ($p=0,037$), lower adipocyte count ($p=0,037$) and trabecular adipocyte distribution ($p=0.010$). Also, we found statistically significant association of MR with diffuse distribution of megakaryocytes ($p=0.041$), loose megakaryocyte clusters ($p=0.007$) and cloudlike megakaryocyte nuclei ($p=0.027$). However, there was no statistically significant association between MR status and other morphologic parameters. Blood vessel morphometric characteristics like microvascular density (MVD) and microvascular area (MVA) didn't show statistically significant association with MR status. Also, Sokal score did not show significant association with MR status. In the peripheral blood, only myeloblast percentage ($p=0.035$) showed statistically significant association with MR. Our results indicate that some of the bone marrow morphometric parameters as well as peripheral blood myeloblast percentage could serve as predictors to TKI therapy response in CML patients.

Key words: Bone marrow morphometry ; Chronic myeloid leukemia ; Molecular response ; MVA ; MVD ; Sokal score

9. Literatura

1. Quintás-Cardama A, Cortes J, Kantarjian H, O'Brien S. Chronic Myelogenous Leukemia. U: Provan D, Gibben JG, eds. *Molecular Hematology: Third Edition*. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010. p. 76-88.
2. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am J Hematol*. 2016; 93(3): 442-59.
3. Van Etten RA. Clinical manifestations and diagnosis of chronic myeloid leukemia. U: UpToDate, Larson RA ed. *UpToDate [Internet]*. Waltham, MA: UpToDate; 2020. [citirano 13.3.2020.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
4. Hsi ED, Goldblum JR. *Hematopathology*. 2nd edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4th Edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
6. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. *SEER cancer statistics review, 1975–2009 (Vintage 2009 Populations) [Internet]*. Bethesda(MD): National Cancer Institute; Travanj 2012.[ažurirano 20.8.2012., citirano 21.2.2020.] Dostupno na: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017; 67(1): 7-30.
8. Bellanné-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006; 108(1): 346-52.
9. Huang X, Cortes J, Kantarjian H. Estimations of the increasing prevalence and plateau prevalence of chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer*. 2012; 118(12): 3123-7.
10. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341(3): 164–72.
11. Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol*. 1997; 96(1): 111-6.
12. Spiers ASD, Bain BJ, Turner JE. *The Peripheral Blood in Chronic Granulocytic*

- Leukaemia: Study of 50 Untreated Philadelphia-Positive Cases. *Scand J Haematol.* 1977; 18(1): 25-38.
13. Schiffer CA, Atallah E. Overview of the treatment of chronic myeloid leukemia. U: UpToDate, Larson RA ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020. [citirano 13.3.2020.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
 14. Yin CC, Medeiros LJ, Glassman AB, Lin P. t(8;21)(q22;q22) in Blast Phase of Chronic Myelogenous Leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121(6): 836-42.
 15. Van Etten RA. Cellular and molecular biology of chronic myeloid leukemia. U: UpToDate, Larson RA ed. UpToDate [Internet]. Waltham, MA: UpToDate; 2020. [citirano 13.3.2020.] Dostupno na: <https://www.uptodate.com>
 16. Allouche M, Bourinbaiar A, Georgoulas V, Consolini R, Salvatore A, Auclair H JC. T cell lineage involvement in lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1985; 66(1): 1155–61.
 17. Clark SS, McLaughlin J, Timmons M, Pendergast AM, Ben-Neriah Y, Dow LW, et al. Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive Acute Lymphocytic Leukemia (ALL). *Science.* 1988; 239(1): 775-7.
 18. Cortes JE, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Rios MB, Shan J, et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood.* 2003; 101(10): 3794-800.
 19. Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene.* 1997; 15(19): 2333–42.
 20. Sawyers CL, McLaughlin J, Witte ON. Genetic requirement for ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med.* 1995; 181(1): 307-13.
 21. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell.* 1993; 75(1): 175-85.
 22. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 1994; 13(4): 764–73.
 23. Brunner AM, Campigotto F, Sadrzadeh H, Drapkin BJ, Chen Y Bin, Neuberg DS, et al. Trends in all-cause mortality among patients with chronic myeloid leukemia: A surveillance, epidemiology, and end results database analysis. *Cancer.* 2013; 119(14): 2620-9.

24. Nicolini FE, Mauro MJ, Martinelli G, Kim DW, Soverini S, Müller MC, et al. Epidemiologic study on survival of chronic myeloid leukemia and Ph(+) acute lymphoblastic leukemia patients with BCR-ABL T315I mutation. *Blood*. 2009; 114(26): 5271-8.
25. Sauße S, Krauß MP, Hehlmann R, Lauseker M, Proetel U, Kalmanti L, et al. Impact of comorbidities on overall survival in patients with chronic myeloid leukemia: Results of the randomized CML Study IV. *Blood*. 2015; 126(1): 42-9.
26. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: The EUTOS score. *Blood*. 2011; 118(3): 686-92.
27. Pffirmann M, Baccarani M, Saussele S, Guilhot J, Cervantes F, Ossenkoppele G, et al. Prognosis of long-term survival considering disease-specific death in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2016; 30(1): 48-56.
28. Kantarjian HM, Cortes J, Guilhot F, Hochhaus A, Baccarani M, Lokey L. Diagnosis and management of chronic myeloid leukemia: A survey of American and European practice patterns. *Cancer*. 2007; 109(7): 1365-75.
29. Jabbour EJ, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2016; 89(5): 547-56.
30. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 362(24): 2260-70.
31. O'Brien SG, Hedgley C, Adams S, Foroni L, Apperley JF, Holyoake TL, et al. Spirit 2: An NCRI Randomised Study Comparing Dasatinib with Imatinib in Patients with Newly Diagnosed CML. *Blood*. 2014; 124(1): 517.
32. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, Le Coutre P, Etienne G, Lobo C, et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 362(24): 2251-9.
33. Larson RA, Hochhaus A, Saglio G, Kim D-W, Jootar S, Le Coutre PD, et al. Nilotinib versus imatinib in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP): ENESTnd 4-year (y) update. *J Clin Oncol*. 2013; 31(15): 7052.
34. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb H, Pralle H, Hossfeld D, et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood*. 1994; 84(12): 4064-77.

35. Anonymous. Hydroxyurea versus busulphan for chronic myeloid leukaemia: an individual patient data meta-analysis of three randomized trials. Chronic myeloid leukemia trialists' collaborative group. *Br J Haematol.* 2000; 110(3): 573-6.
36. Cross NCP, White HE, Müller MC, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012; 26(10): 2172-5.
37. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013; 122(6): 872-84.
38. Cortes J, Quintás-Cardama A, Kantarjian HM. Monitoring molecular response in chronic myeloid leukemia. *Cancer.* 2011; 117(6): 1113–22.
39. Testoni N, Marzocchi G, Luatti S, Amabile M, Baldazzi C, Stacchini M, et al. Chronic myeloid leukemia: A prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: A study of the GIMEMACMLWP. *Blood.* 2009; 114(24): 4939-43.
40. Gianelli U, Vener C, Bossi A, Cortinovis I, Iurlo A, Fracchiolla NS, et al. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. *Mod Pathol.* 2012; 25(9): 1193-202.
41. Koopmans SM, Bot FJ, Lam KH, Van Marion AMW, De Raeve H, Hebeda KM. Reproducibility of histologic classification in nonfibrotic myeloproliferative neoplasia. *Am J Clin Pathol.* 2011; 136(4): 618-24.
42. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(10): 3037-42.
43. Kantarjian H, O'Brien S, Shan J, Huang X, Garcia-Manero G, Faderl S, et al. Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia: Need for new response definitions? *Cancer.* 2008; 112(4): 837-45.
44. Klil-Drori AJ, Yin H, Azoulay L, Del Corpo A, Harnois M, Gratton MO, et al. Molecular monitoring of therapeutic milestones and clinical outcomes in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer.* 2019; 125(4): 618-25.
45. Pandey N, Yadav G, Kushwaha R, Verma SP, Singh US, Kumar A, et al. Effect of Imatinib on Bone Marrow Morphology and Angiogenesis in Chronic Myeloid Leukemia. *Adv Hematol [Internet].* 2019 January 1 [citirano 15.06.2020.] [8 p.] Dostupno na: <https://www.hindawi.com/journals/ah/2019/1835091/> doi: 10.1155/2019/1835091

46. Braziel RM, Launder TM, Druker BJ, Olson SB, Magenis RE, Mauro MJ, et al. Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate-treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 Months' experience. *Blood*. 2002; 100(2): 435-41.
47. Lugli A, Ebnoether M, Cogliatti SB, Gratwohl A, Passweg J, Hess U, et al. Proposal of a morphologic bone marrow response score for imatinib mesylate treatment in chronic myelogenous leukemia. *Hum Pathol*. 2005; 36(1): 91-100.
48. Srinivas BH, Paul TR, Uppin SG, Uppin MS, Jacob RT, Raghunadharao D. Morphologic changes in the bone marrow in patients of chronic myeloid leukemia (CML) treated with imatinibmesylate. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2012; 28(3): 162-9.
49. Hidalgo-López JE, Kanagal-Shamanna R, Quesada AE, Gong Z, Wang W, Hu S, et al. Bone marrow core biopsy in 508 consecutive patients with chronic myeloid leukemia: Assessment of potential value. *Cancer*. 2018; 124(19): 3849-55.
50. Thiele J, Kvasnicka HM, Fischer R. Bone marrow histopathology in chronic myelogenous leukemia (CML)- Evaluation of distinctive features with clinical impact. *Histology and Histopathology*. 1999; 14(4): 1241-56.
51. Eliacik E, Isik A, Aydin C, Uner A, Aksu S, Sayinalp N, et al. Bone marrow fibrosis may be an effective independent predictor of the 'TKI drug response level' in chronic myeloid leukemia. *Hematology*. 2015; 20(7): 392-6.
52. Kimura A, Katoh O, Hyodo H, Kuramoto A, Satow Y. Platelet derived growth factor expression, myelofibrosis and chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*. 1995; 18(3-4): 237-42.
53. Lamba A, Dey P, Kumari S, Marwaha N. Prognostic significance of the histomorphometric features of bone marrow trephine biopsies in patients with chronic myeloid leukemia. *Anal Quant Cytol Histol*. 2007; 29(6): 370-6.
54. Čojbašić I, Mačukanović-Golubović L, Mihailović D, Vučić M, Čojbašić Ž. The significance of angiogenesis for predicting optimal therapeutic response in chronic myeloid leukaemia patients. *Polish J Pathol*. 2017; 68(3): 241-51.
55. Korkolopoulou P, Viniou N, Kavantzas N, Patsouris E, Thymara I, Pavlopoulos PM, et al. Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: A morphometric study. *Leukemia*. 2003; 17(1): 89-97.
56. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999; 59(22): 5830-5.
57. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortelezzi A, Ferrucci PF, et al.

- Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*. 1999; 81(8): 1398–401.
58. Briere J, Kiladjian JJ, Peynaud-Debayle E. Megakaryocytes and platelets in myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol*. 1997; 10(1): 65-88.
 59. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006; 355(23): 2408-17.
 60. Dybko J, Jazwiec B, Haus O, Urbaniak-Kujda D, Kapelko-Słowik K, Wróbel T, et al. The Hasford Score May Predict Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia Patients: A Single Institution Experience. *Dis Markers*. 2016; 4(1): 1-5.
 61. Dybko J, Haus O, Jazwiec B, Lonc T, Sawicki M, Kuliczkowski K. Hasford Score Is Correlated with 18 Month Molecular Response for Chronic Myeloid Leukemia Patients Treated with Second Generation Tyrosine Kinase Inhibitors and It May be Useful to Differentiate Low and Intermediate Risk Patients: A Single Institution Exp. *Blood*. 2015; 126(23): 5163.
 62. Dybko J, Medras E, Haus O, Jazwiec B, Wrobel T, Kuliczkowski K. The Hasford Score Correlates with the Long-Term Molecular Response to Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia Patients and May be Useful for Differentiating Low and Intermediate Risk Patients: A Single Institution Experience. *Blood*. 2014; 124(21): 3152.
 63. Ganguly S, Lakshmaiah KC, Jacob LA, Babu S, Dasappa L, Govind Babu KS. Performance of Sokal and Eutos Scores for Predicting Cytogenetic and Molecular Response in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia-Chronic Phase Patients on Imatinib. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2017; 33(1): 82-6.
 64. Tiribelli M, Bonifacio M, Calistri E, Binotto G, Maino E, Marin L, et al. EUTOS score predicts long-term outcome but not optimal response to imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2013; 37(11): 1457–60.

10. Životopis

Martina Murković rođena je 1. rujna 1995. u Ogulinu. Pohađala je osnovnu školu u Osnovnoj školi Luke Perkovića Brinje od 2002. do 2010. godine. Daljnje obrazovanje nastavlja u Srednjoj školi Otočac 2010. godine gdje pohađa smjer Opće gimnazije koji završava 2014. godine s odličnim uspjehom.

Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij medicine Medicinskog fakulteta u Rijeci upisuje 2014. godine. Kroz četvrtu, petu i šestu godinu studija obavlja dužnost demonstratora na Katedri za opću patologiju i patološku anatomiju. Krajem pete godine studija postaje voditelj demonstratora na Katedri za opću patologiju i patološku anatomiju. Tijekom studija aktivno sudjeluje na nekoliko studentskih kongresa, u izradi znanstvenih radova te na stručnoj razmjeni na Odjelu sudske medicine i medicinskog prava u Češkoj Republici.