

CD38 kao prognostički biljeg u kroničnoj limfocitnoj leukemiji

Prisuda, Sonja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:799326>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

Sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Sonja Prisuda

**CD38 KAO PROGNOŠTIČKI BILJEG U KRONIČNOJ
LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

**CD38 KAO PROGNOŠTIČKI BILJEG U KRONIČNOJ
LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI**

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek

Mentor rada doc.dr.sc. Vatroslav Šerić, mag. med. biochem., spec. med. biokemije

Rad ima 38 listova, 4 tablice i 11 slika.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću, mag. med. biochem., spec. med. biokemije na suradnji i pomoći u radu i tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ljubici Glavaš-Obrovac na organizaciji Diplomskog studija medicinsko laboratorijske dijagnostike radi unapređivanja i promicanja naše struke.

Zahvaljujem Blaženki Dobrošević, mag. med. biochem., spec. med. biokemije i Barbari Vuković, mag. med. biochem., spec. med. biokemije na velikoj pomoći u izradi rada.

Zahvaljujem Štefici Klisurić, bacc. med. lab. diagn. i svim kolegicama na razumijevanju i potpori.

Zahvaljujem svojoj obitelji, djeci Ivanu i Ines na strpljenju, pomoći i potpori.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Limfocitne leukemije i limfomi	1
1.2. Podjela neoplazmi limfocita B (SZO, 2016)	1
1.3. B-kronična limfocitna leukemija	2
1.3.1. Definicija	2
1.3.2. Epidemiologija	4
1.3.3. Etiologija	4
1.3.4. Klinička slika	4
1.3.5. Dijagnoza	5
1.3.6. Klasifikacija B-kroničnih limfocitnih leukemija	5
1.3.7. Prognostički biljezi u B-KLL	6
2. HIPOTEZA	12
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
4. MATERIJALI I METODE	14
4.1. Ispitanici	14
4.2. Ustroj studije	14
4.3. Metode određivanja	14
4.3.1. Izražaj CD38 biljega na klonalnim stanicama B-KLL-a	14
4.3.2. Određivanje aktivnosti LDH	16
4.3.3. Određivanje koncentracije β 2-mikroglobulina	16
4.3.4. Određivanje koncentracije leukocita	17
4.4. Statističke metode	18
5. REZULTATI	19
5.1. Ispitanici po spolu i dobi	19
5.2. Vrijednosti analita u odnosu na referentni raspon	19
5.3. Usporedba CD38 s LDH, B2M, apsolutnim brojem i postotkom limfocita	19
5.4. Usporedba postotka CD38 između dvije skupine	20
6. RASPRAVA	25
7. ZAKLJUČAK	27

8. SAŽETAK.....	28
9. SUMMARY	29
10. LITERATURA.....	30
11. ŽIVOTOPIS	32

POPIS KRATICA

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

KLL – kronična limfocitna leukemija

CD – klaster diferencijacije

MBL – monoklonalna B-stanična limfocitoza

LML – limfom malih limfocita

LČ – limfni čvor

ZAP-70 – proteinska tirozin-kinaza

B2M – β 2-mikroglobulin

LDH – laktat-dehidrogenaza

ADP – adenzin-difosfat

MHC – glavni sustav tkivne snošljivosti

NK stanice – prirodno ubilačke stanice

Hb – hemoglobin

PLT – trombociti

NAD – nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrogenaza

1. UVOD

1.1. Limfocitne leukemije i limfomi

Limfocitne leukemije i limfomi heterogena su skupina bolesti koju karakterizira zloćudno, klonalno bujanje stanica limfocitne loze.

Na osnovi ishodišne stanice limfocitne neoplazme dijelimo na nezrele ili neoplazme prekursora limfocita te zrele ili neoplazme perifernih limfocita.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) podjela neoplazmi limfocitne loze temelji se na histološkim obilježjima tumora u kombinaciji s kliničkim, imunološkim i genskim obilježjima. Na osnovi toga zloćudne tumore limfocitne loze dijelimo u tri osnovne skupine, a to su tumori limfocita B, tumori limfocita T i NK stanica te Hodgkinovu bolest.

Više je od 80 % limfocitnih neoplazmi B-staničnog podrijetla, dok manji udio čine neoplazme porijeklom od T-stanica i NK stanica.

1.2. Podjela neoplazmi limfocita B (SZO, 2016)

Prema posljednjim ažuriranjima iz 2016. godine za aktualne entitete i dodatke novih napravljena je revizija za klasifikaciju limfnih neoplazmi (1)

1. Neoplazme prekursora B-stanica
 - a) B-limfoblastična leukemija/ limfom
2. Periferne („zrele“) B-neoplazme
 - a) Kronična limfocitna leukemija/ limfom malih limfocita (CLL/SLL)
 - b) Monoklonalna B-stanična limfocitoza (MBL)
 - c) B-prolimfocitna leukemija (B_PLL)
 - d) Limfoplazmocitni limfom (LPL)
 - e) Limfom zone plašta („Mantle“ MCL)
 - f) Folikularni limfom (FL)
 - g) Limfom marginalne zone (MZL)
 - slezenski
 - nodularni/ pedijatrijski nodularni

- ektranodularni – limfom limfatičnog tkiva pridruženog sluznicama (MALT)

h) leukemija vlasastih stanica (HCL)

i) difuzni velikostanični limfom (DLBCL)

j) Burkittov limfom

k) monoklonska gamopatija neutvrđenog značaja (MGNZ)

l) plazmocitom/ multipli mijelom

m) plazmoblastični limfom

n) B-velikostanični limfom bogat T-limfocitima/ histiocitima

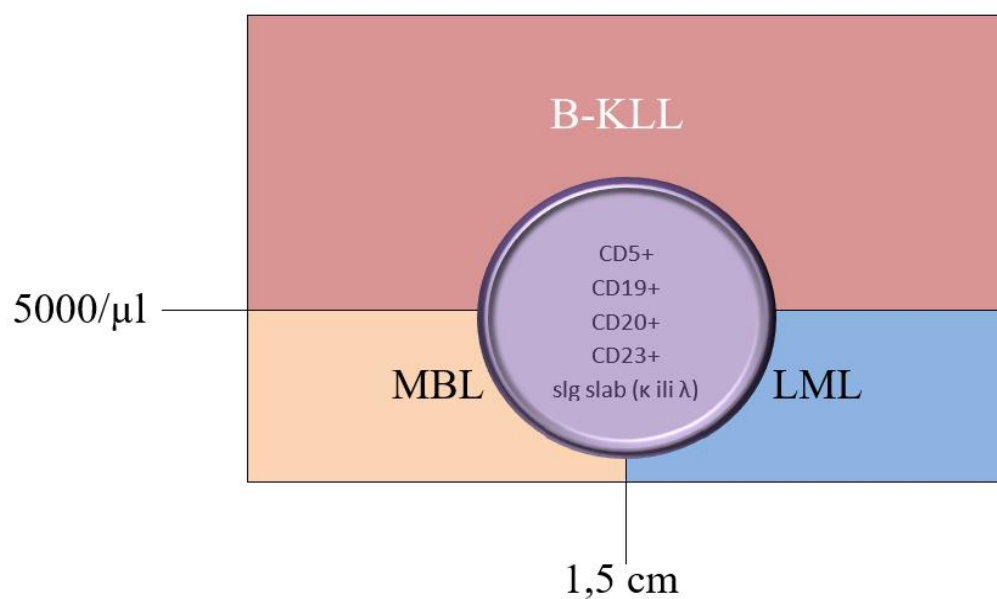
1.3. B-kronična limfocitna leukemija

1.3.1. Definicija

B-kronična limfocitna leukemija (B-KLL) zloćudni je tumor zrelih B-limfocita. Bolest je obilježena progresivnim nakupljanjem malih limfocita monoklalnog podrijetla u koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnim čvorovima (2). Tumorsko tkivo sastoji se od morfološki naizgled zrelih limfocita, ali su oni funkcionalno manje vrijedni. Mehanizam nastanka bolesti nije do kraja poznat. Bolesti prethodi monoklorna B-stanična limfocitoza, a dodatna genska promjena ili promjena mikrookoliša dovest će do nastanka B-KLL-a. Do nakupljanja stanica dolazi zbog nemogućnosti njihova uklanjanja procesom apoptoze.

Prema SZO B-kronična limfocitna leukemija definirana je tipičnim fenotipom:

1. Izražaj B-limfocitnih površinskih biljega: CD19+, CD20+, CD23+
2. Dokaz klonalnosti – restrikcija površinskog izražaja lakog lanca imunoglobulina (kapa ili lambda)
3. Koekspresija T-limfocitnog biljega CD5+
4. Ekspresija CD23
5. Niski izražaj CD20, CD79b, negativan CD10–
6. Preporučeni dijagnostički panel: CD19, CD20, CD5, CD23, CD10, kapa/ lambda laki lanci.



Slika 1. Razvrstavanje u nozološke entitete

Današnja klasifikacija na osnovi kombinacije imunološkog fenotipa i apsolutnog broja limfocita (tj. veličine tumorske mase) razlikuje tri entiteta (slika 1).

B-KLL: B-kronična limfocitna leukemija

MBL: monoklonalna B limfocitoza

LML: limfom malih limocita

Na ordinati se nalazi razdjelnica s apsolutnim brojem klonalnih limfocita, na apscisi je razdjelnica na temelju veličine limfnog čvora (3).

1.3.2. Epidemiologija

B-KLL je najčešća leukemija odrasle dobi u razvijenim zemljama (3 – 4 novooboljela na 100 000 stanovnika u godini). Obolijeva starija populacija. Medijan dobi oboljelih od ove bolesti jest 68 godina, no tijekom posljednjih godina broj mlađih oboljelih intenzivno raste. Najčešća je u osoba bijele rase. Muškarci oboljevaju češće nego žene, u omjeru 2 : 1 (4).

1.3.3. Etiologija

Uzrok nastanka bolesti nije poznat. Jedna je od rijetkih malignih bolesti kod koje nije dokazana povezanost s izloženosti toksičnim agensima, ionizirajućim zračenjem, alkilirajućim agensima, retrovirusnim infekcijama (4, 5, 6).

1.3.4. Klinička slika

U ranoj fazi nema simptoma koji bi ukazivali na bolest, dok u uznapredovaloj fazi dolazi do njihove pojave. Javlja se umor, pojačano noćno znojenje, temperatura bez znakova infekcije, gubitak na težini, sve su to takozvani „B“ simptomi. Jedna je od glavnih karakteristika bolesti limfadenopatija, koja zahvaća cervikalne, supraklavikularne i aksilarne regije. Otkriva se pri fizikalnom pregledu i ima je više od 50 % oboljelih. Povećani limfni čvorovi bezbolni su, čvrsti i pomični. Bolest prati i splenomegalija, a nešto rjeđe hepatomegalija. Kod progresije bolesti dolazi do pojave infekcije bakterijske, virusne, ponekad i gljivične (2). Prisutna je hipogamaglobulinemija, dolazi do znatnog deficita stanične imunosti.

Navedeni simptomi nastaju kao posljedica nagomilavanja leukemijskih stanica, koje suprimiraju normalnu hematopoezu, a posljedica su anemija, neutrofilija i trombocitopenija.

Tijek bolesti vrlo je različit s obzirom na razlike u kliničkoj slici koje se mogu uočiti pri samoj dijagnozi. Kod većine pacijenata tijek je bolesti stabilan, no bolest može napredovati do agresivnih oblika, a može prijeći i u akutnu leukemiju (7). Progresija bolesti poznata je pod nazivom Richterov sindrom, javlja se kod 10 % bolesnika s B-KLL-om. Riječ je o preobrazbi B-KLL-a u difuzni limfom velikih B-stanica ili u prolimfocitnu leukemiju (2).

1.3.5. Dijagnoza

U svrhu postavljanja dijagnoze potrebno je osim fizikalnog pregleda učiniti laboratorijske testove koji uključuju biokemijske i hematološke parametre, morfološku analizu stanica, imunofenotipizaciju stanica i molekularnu dijagnostiku.

Za dijagnozu je potrebno da je u koštanoj srži prisutno više od 30 % limfocita i da je njihov broj u perifernoj krvi veći od $5 \times 10^9 / L$. Dijagnoza se temelji na imunofenotipu limfocitnih stanica koji se određuje metodom protočne citometrije.

Uzorci koji se analiziraju jesu periferna krv, koštana srž, uzorak limfnih čvorova i drugih tkiva koja sadrže stanice.

1.3.6. Klasifikacija B-kroničnih limfocitnih leukemija

Proširenost bolesti određuje i prognozu B-KLL-a. Ovisno o lokalizaciji tumora, proširenosti i zahvaćenosti drugih organa možemo ju podijeliti prema klasifikaciji po Raiu i Binetu koja je prihvaćena u kliničkoj praksi (10, 11).

RAI

Razlikujemo četiri stadija.

0. – limfocitoza u perifernoj krvi i koštanoj srži

1. – limfocitoza + povećani LČ

2. – limfocitoza + povećana slezana ili jetra +/- LČ

3. – limfocitoza + anemija ($Hb < 100 \times 10^9 / L$)

4. – limfocitoza + trombocitopenija ($PLT < 100 \times 10^9 / L$) +/- anemija ili povećana slezana, jetra ili LČ.

BINET

A. – zahvaćene do dvije regije LČ

B. – zahvaćene tri ili više regija LČ

C. – prisutnost anemije (Hb < g/L) ili trombocitopenije (PLT < 100 x 10⁹ /L)

Prognostička ljestvica:

Povoljna prognoza (Rai < 3, Binet A i B), nizak rizik

Nepovoljna prognoza (Rai 3 i 4 , Binet C) visoki rizik

Prognoza i tijek bolesti osim po Raiu i Binetu procjenjuje se danas nizom prognostičkih čimbenika.

1.3.7. Prognostički biljezi u B-KLL

Tijek bolesti kod oboljelih od B-kronične limfocitne leukemije vrlo je različit. Dokazano je da preživljenje korelira s kliničkim stadijem bolesti u vrijeme dijagnoze. Rai i Binet dvije su najčešće primjenjivane metode za određivanje stadija bolesti u B-kroničnoj limfocitnoj leukemiji. Na osnovi kliničkog stadija pacijenti se mogu svrstati u tri skupine: niskog, srednjeg i visokog rizika. Iako te metode predviđaju preživljenje, problem je što one ne mogu predvidjeti koji će pacijenti u ranom stadiju bolesti imati progresivniji tijek bolesti i trebati terapiju.

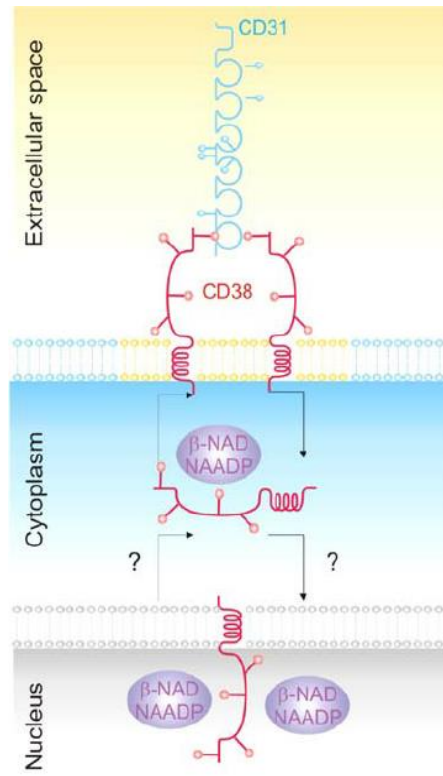
Tradicionalno, procjena rizika definira se kliničkim stadijem, infiltracijom koštane srži stanicama B-KLL-a, vremenom udvostručenja broja limfocita, određivanjem LDH i β2-mikroglobulina. Svi su oni korisni, ali ne mogu točno predvidjeti progresiju bolesti. Danas je istraživanje prognostičkih čimbenika pomaknuto s kliničkih na biološke čimbenike kao što su status mutiranosti IgVH gena, izraženost CD38 i ZAP-70 na klonalnim limfocitima, vrijednosti topljivog CD23 i vrijednosti serumske timidin kinaze.

Prema brojnim autorima (12) mutiranost IgVH gena trenutno je najrealniji prediktor ishoda bolesti u KLL-u. Molekularnim tehnikama mogu se na osnovi mutacije IgHV-a definirati dvije različite skupine bolesnika s klinički i biološki relevantnim razlikama. Oko 45 % slučajeva nema mutirane varijabilne dijelove gena za teški lanac imunoglobulina, dok je u 55 % slučajeva prisutna somatska mutacija. Bolesnici s prisutnom mutacijom IgVH-a imaju slabije signaliziranje preko B-receptora i slabije izraženu proliferaciju te bolju prognozu

bolesti. Molekularne tehnike za određivanje statusa mutiranosti IgVH gena skupe su i analitički složene, pa su predloženi surogat markeri ZAP-70 i CD38.

ZAP-70 jest proteinska tirozin-kinaza inicijalno detektirana na T-limfocitima kao dio T-staničnog receptora. Aktivacijom T-staničnog receptora dolazi do pokretanja aktivacijske kaskade od strane ove tirozin-kinaze. ZAP-70 nije inicijalno detektiran na B-limfocitima, ali je otkrivena njegova ekspresija na malignim B-limfocitima bolesnika s B-KLL-om. Stanice koje eksprimiraju ZAP-70 osjetljivije su na vezanje antigena, osobito IgM klase, čime započinje sa syk-kinazom aktivacijska kaskada. Nađeno je da je ZAP-70 neovisan marker loše prognoze i dobar surogat marker za IgVH, a određuje se protočnom citometrijom (13). Njegovo određivanje nije rutinsko, ponajprije jer je smješten unutar stanice, kao i zbog visoke ekspresije na T-limfocitima koji su prisutni u uzorcima bolesnika s B-KLL-om. Također, iako se metode za njegovo određivanje stalno usavršavaju, postoje još uvijek izvjesni problemi sa standardizacijom metoda.

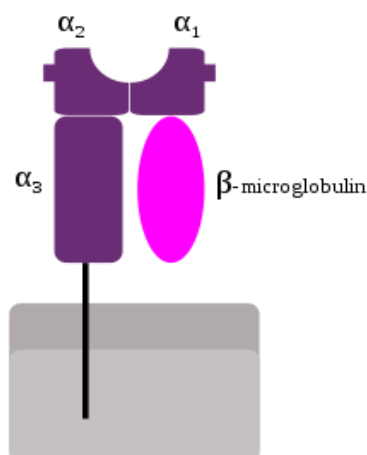
CD38 jest transmembranski glikoprotein tip 2 (45 kDa), koji se nalazi na većini imunskih stanica. Sastoji se od kratkog citoplazmatskog repa, kratkog transmembranskog dijela i dugačke vanstanične domene (slika 2). CD38 ima ulogu ektoenzima koji katalizira sintezu i hidrolizu c ADP riboze i receptora koji omogućuje utok kalcija u stanicu (13). Nađeno je da aktivacija CD38 na površini B-limfocita inducira proliferaciju, inhibira apoptozu i dovodi do sekrecije citokina. Ekspresija CD38 na B-limfocitima bolesnika s B-KLL-om povezana je s proliferacijom malignog klona i lošijom prognozom (2). CD38 nalazi se na površini stanica i rutinski se određuje metodom protočne citometrije.



Slika 2. Molekula CD38

β 2-mikroglobulin

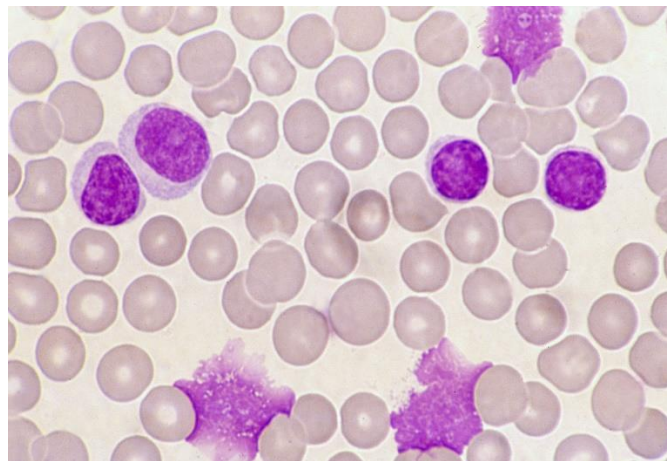
β 2-mikroglobulin (B2M) jest polipeptid male molekularne mase (11,6 kDa) koji se veže na alfa-lanac MHC-I molekula. On je strukturna podjedinica koja stabilizira terciarnu strukturu MHC-I molekule na staničnoj površini (slika 3). Metabolizam i razgradnja HLA dovode do disocijacije B2M od teškog lanca i njegovo otpuštanje u vanstaničnu tekućinu u slobodnoj formi i kao takvog ga možemo mjeriti imunokemijskim tehnikama (12). Polovica količine B2M u plazmi potječe od limfocita. Cirkulirajući B2M filtrira se kroz glomerul, većim se dijelom zatim resorbira i katalizira u stanicama proksimalnog tubula (13).



Slika 3. MHC-I molekula

Laktat-dehidrogenaza (LDH) jest enzim koji se nalazi u citoplazmi svih stanica organizma, pa tako i u hematopoetskim stanicama. Katalizira reverzibilnu oksidaciju laktata u piruvat. U tkivima je 500 puta veća koncentracija tog enzima nego u plazmi, tako da i najmanje oštećenje tkiva može izazvati porast LDH u serumu. Povišene vrijednosti nalazimo između ostalog i kod malignih procesa zbog propadanja tkiva. S obzirom da u B-KLL dolazi do proliferacije malignih, klonskih limfocita, očekivano dolazi i do porasta aktivnosti tog enzima.

Ukupan broj leukocita, odnosno apsolutni broj limfocita i postotak limfocita kod B-KLL-a od iznimne je važnosti jer je pokazatelj veličine cirkulirajuće tumorske mase. Bolest karakterizira nagomilavanje zrelih limfocita koji dulje preživljavaju zbog poremećenih apoptotičkih mehanizama. Klinička slika i tijek bolesti posljedica su neravnoteže proliferacije i apoptoze. Vrijednosti koncentracije leukocita i apsolutnog broja limfocita vrlo su bitni u ranom stadiju bolesti, zbog utvrđivanja samog tijeka bolesti i prognoze. Stanice kod B-KLL-a su maleni, naizgled zreli limfociti, koje lako prepoznajemo u razmazu periferne krvi ili koštane srži. Kod pripreme razmaza periferne krvi dolazi do morfoloških abnormalnosti, pojave stanica poput sjene (Gumprechtove sjene). Razlog je tome povećana osjetljivost limfocita na mehaničke sile *in vitro*. Gumprechtove sjene znak su apoptoze, njihov veći broj prati i veću limfocitozu, a to ujedno znači i lošiju prognozu bolesti (16).



Slika 4. Slika razmaza periferne krvi kod B-KLL-a

Protočna citometrija

U dijagnostici leukemija i limfoma, protočna citometrija ima ulogu u utvrđivanju stanične loze, određivanje stupnja diferencijacije malignih stanica, detekciji klonalnosti i određivanju minimalne ostatne bolesti, budući da je protočna citometrija visoko osjetljiva tehnologija

kojom se istodobno mjere fizičke (veličina i zrnatost) i imunološke (izražaj specifičnih biljega) osobine stanica.

Protočni citometar sastoji se od tri povezana sustava: protočnog, optičkog i elektroničkog.

Protočni sustav čini pokretačka tekućina koja je nosač stanične suspenzije. Stanice u staničnoj suspenziji pojedinačno, laminarnim protokom, putuju kroz sustav uskih kapilara te dolaze do snopa laserskog svjetla. Lasersko svjetlo obasjava svaku pojedinačnu stanicu i raspršuje se na njezinoj površini. Pokazatelj fizičkih osobina stanice jest stupanj raspršenja laserskog svjetla. Imamo mali kut raspršenja FSC (prema engl. *forward scatter*), koji je pokazatelj veličine stanice i pravi kut raspršenja svjetla SSC (prema engl. *side scatter*), koji daje podatak o gustoći, tj. zrnatosti stanice. Dodatno, stanice su obilježene monoklonalnim protutijelima na koja su vezane fluorescentne boje, fluorokromi. Fluorokrom obasjan laserskom svjetlošću emitira svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti. Uz pomoć specifičnih osjetnika emitirana se svjetlost detektira, a potom elektronički sustav svjetlosne signale pretvara u digitalne koji se prenose u računalo i analiziraju. Ciljne stanične populacije definiraju se postavljanjem ograde (engl. *gate*) u citogramu veličine i zrnatosti (FSC X SSC) nakon čega slijedi analiza specifičnih fluorescentnih signala.

Imunofenotipizacija je tehnika uz pomoć koje dvostrukim, trostrukim ili četverostrukim bojenjem određujemo specifične biljege na površini ili u unutrašnjosti stanice (citoplazma, jezgra). Monoklonalna protutijela obilježena fluorokromima vežu se na stanične biljege ili CD antigene (CD – engl. *Cluster of Differentiation*) specifične za staničnu lozu, stupanj diferencijacije ili aberantna svojstva stanica (19, 20).

2. HIPOTEZA

Stanični biljeg CD38 kao prognostički biljeg kod B-kronične limfocitne leukemije u usporedbi s vrijednostima klasičnih prognostičkih biljega pokazatelj je lošije prognoze bolesti.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi su ovoga istraživanja:

- a) usporediti vrijednosti biomarkera CD38 s vrijednostima aktivnosti enzima laktat-dehidrogenaze (LDH), koncentracijom β 2-mikroglobulina, te apsolutnog broja limfocita i postotka limfocita u perifernoj krvi
- b) razdvojiti ispitanike na osnovi vrijednosti CD38 u dvije skupine s različitom prognozom i usporediti s vrijednostima ostalih prognostičkih biljega.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

Za 36 ispitanika koji su obrađeni u ovom radu rabili su se podatci iz baze podataka Laboratorijskog informacijskog sustava (LIS-a). Protokol i postupci ispitivanja odobreni su od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinskog fakulteta Osijek (ur.broj 2158-61-07-18-114)

Ispitanicima u dobi od 41 do 83 godine, pri postavljanju dijagnoze učinjeni su potrebni laboratorijski testovi. Ispitivanje uključuje 23 osobe muškog i 13 osoba ženskog spola, što i odgovara omjeru opisanom u literaturi (2:1). Za ovo istraživanje od posebnog su značaja stanični biljeg CD38 koji je rađen na protočnom citometru, metodom imunofenotipizacije, aktivnost enzima LDH na analizatoru za biokemijske pretrage, koncentracija β 2-mikroglobulina na nefelometru i broj leukocita te apsolutni broj i postotak limfocita na hematološkom analizatoru i mikroskopskim pregledom periferne krvi.

4.2. Ustroj studije

Ovo presječno istraživanje odnosi se na razdoblje od dvije godine (2016./2017. godina) i obuhvaća 36 ispitanika kojima je u tom razdoblju dijagnosticirana B-KLL.

4.3. Metode određivanja

4.3.1. Izražaj CD38 biljega na klonalnim stanicama B-KLL-a

Izražaj CD38 biljega na površini klonalnih stanica B-KLL-a određen je imunofenotipizacijom.

Korištena je metoda trostrukog bojenja direktnim imunofluorescentnim testom a rezultati su izmjereni na protočnom citometru FACSCalibur (Becton Dincinson, San Jose, CA, laser 488 nm).

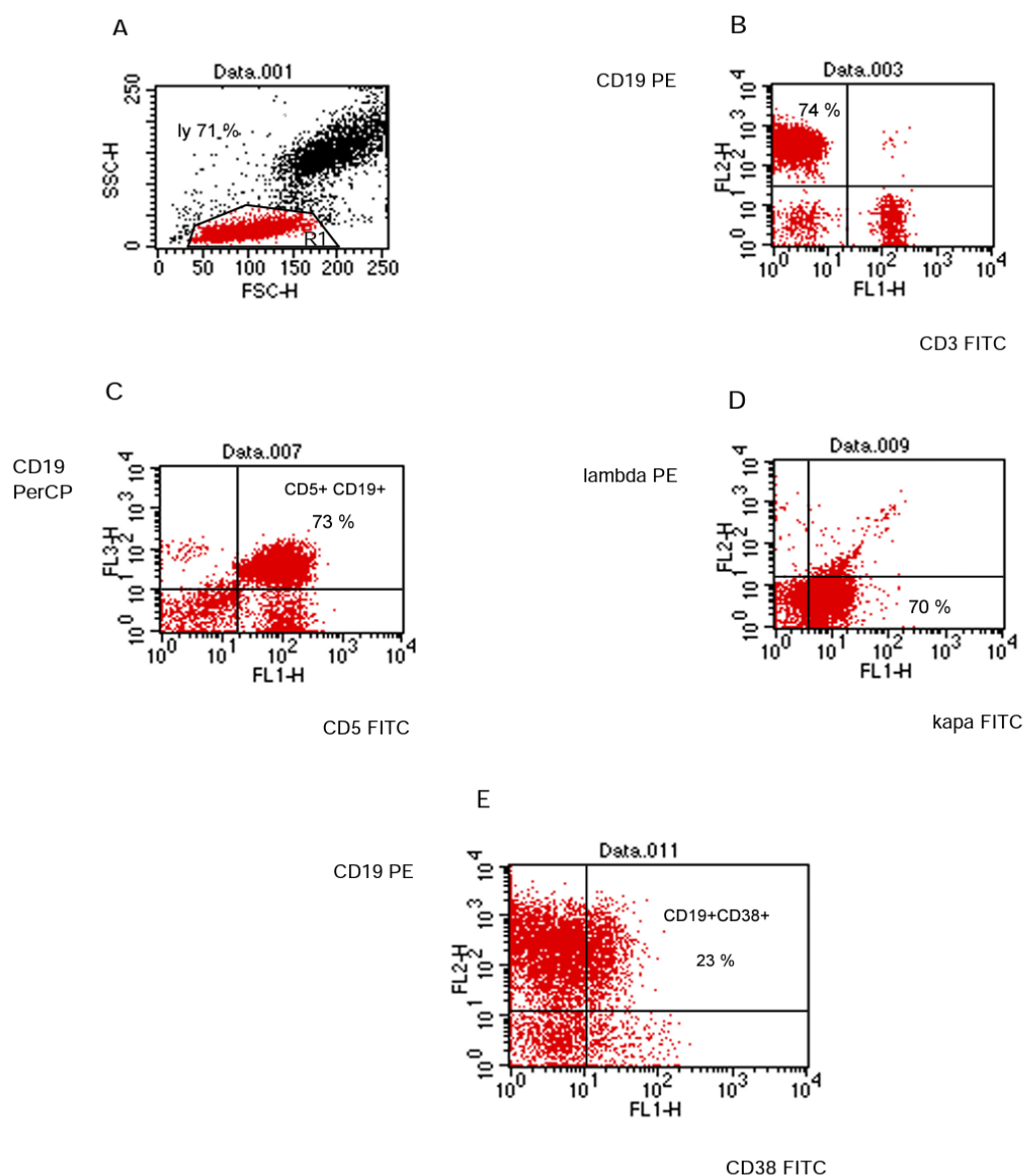
U testu su korištena protutijela direktno obilježena fluorokromom: anti-CD5PerCP, anti-CD19 PE i anti- CD38 FITC (Becton Dincinson, San Jose, CA).

Uzorak pune krvi inkubiran je 20 minuta na sobnoj temperaturi u mračnoj komori sa optimalnom koncentracijom svakog protutijela. Potom su lizirani eritrociti pomoću otopine FACSlyse (Becton Dincinson, San Jose, CA) i uzorci isprani PBS-om da se ukloni lizirajući

reagens i suvišak protutijela.

Obojani uzorci su analizirani na protočnom citometru. Prikupljano je 10000 stanica po uzorku i analizirano u Cellquest programu (Becton Dickinson, San Jose, CA). Na grafičkom prikazu veličine i zrnitosti (FSCxSSC) postavljena je ograda na populaciju limfocita. Unutar populacije limfocita analizom fluorescencija za biljege CD5 i CD19 izdvojena je populacija CD5+ CD19+ tj. klonalni B-limfociti. Daljnjom analizom na ovoj populaciji stanica određen je izražaj CD38, a rezultati su izraženi u postotku stanica pozitivnih na CD38.

Pozitivan rezultat je izražaj CD38 na klonalnim stanicama $\geq 20\%$.



Slika 5. Primjer imunofenotipizacije uzorka periferne krvi bolesnika s B-KLL-om metodom protočne citometrije

- A) Točkasti dijagram odnosa veličine (FSC) i znatosti (SSC) stanica, postavljena ograda na populaciju limfocita koja nam je od interesa.
- B) Dvodimenzionalni prikaz ekspresije biljega CD3 i CD19, odnosno T- i B-limfocita.
- C) Prikaz koekspresije biljega CD5 i CD19, odnosno aberantnog izražaja biljega CD5 na B-limfocitima.
- D) Izražaj kapa lakih lanaca na CD19+ B-limfocitima, odnosno dokaz monoklonalnosti B-limfocita.
- E) Izražaj prognostičkog biljega CD38 na monoklonskim B-limfocitima.

4.3.2. Određivanje aktivnosti LDH

Aktivnost LDH određivana je na biokemijskom analizatoru AU 680 (Beckman Coulter) spektrofotometrijski, kinetičkim UV testom. Upotrebljavana je metoda bazirana na preporukama IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) u kojoj LDH katalizira pretvorbu laktata u piruvat i redukciju NAD⁺ u NADH pri pH 9,4 i temperaturi 37 °C. Povećanje NADH mjeri se na 340 nm (tzv. optički UV test) . Referentni raspon > 20 godina < 241 U/L

4.3.3. Određivanje koncentracije β 2-mikroglobulina

Koncentracija β 2-mikroglobulina određuje se na SIEMENS BN ProSpec imunonefelometru. Reagens koršten u radu je (*Siemens N Latex B₂ Microglobulin/OQ WU15 reagent*). Princip je metode da proteini sadržani u humanom serumu stvaraju imunološke komplekse sa specifičnim protutijelima na kojima se raspršuje svjetlost. Intenzitet raspršenog svjetla ovisi o koncentraciji β 2-mikroglobulina u uzorku. Izmjereni intenzitet raspršenog svjetla uspoređuje se sa standardnom krivuljom dobivenom mjerenjem poznatih koncentracija. Uzorak se pomiješa sa stalnom koncentracijom protutijela i nastaje kompleks koji lebdi u otopini. Vrijednosti za β 2-mikroglobulin izmerene su na nefelometru (*Siemens Healthcare Diagnostics, Newark, USA*)

Referentni raspon za koncentraciju β 2-mikroglobulina u serumu je 0.8 – 2.4 mg/L.

4.3.4. Određivanje koncentracije leukocita

Koncentracija leukocita te apsolutni broj i postotak limfocita određeni su na automatiziranom hematološkom brojaču preporučenim metodama, po načelu impedancije i optičke protočne citometrije. Metoda impedancije s hidrodinamskim fokusiranjem temelji se na mjerenju promjene električnog otpora koji nastaje prolaskom krvnih stanica suspendiranih u elektrolitskoj otopini kroz mjerni otvor protočnice. Svaka analizirana krvna stanica daje jedan mjerni signal. Broj mjernih signala u jedinici vremena razmjernan je koncentraciji stanica u uzorku. Veličina mjernog signala razmjerna je volumenu stanice.

Metodom optičke protočne citometrije, analizirani su leukociti. Leukociti u struji izotonične otopine prolaze protočnicu gdje stanice obasjava laserski snop svjetla. Sustav za detekciju mjeri raspršenost svjetla na površini stanice, unutarnjoj strukturi te fluorescenciji nukleinskih kiselina stanice. Detektori postavljeni pod određenim kutovima pretvaraju zrake u električne impulse, pri čemu nastaje karakterističan „otisak“ za svaku stanicu. Svjetlo raspršeno pod malim kutom daje informaciju o veličini stanice. Bočno raspršeno svjetlo govori o strukturi stanice, granuliranosti i lobuliranosti. Bočno raspršeno fluorescentno svjetlo daje podatak o sadržaju nukleinskih kiselina u stanici. Suma svih podataka daje jedinstven grafički prikaz, sketergram. Računalno analiziran sketergram daje podatak o koncentraciji i vrsti leukocita, apsolutnom broju i postotku limfocita.

Referentni raspon za koncentraciju limfocita u apsolutnom broju jest $1.19- 3.35 \times 10^9/L$, a u postotku 20–46 % limfocita.

Razmaz periferne krvi koji se mikroskopira posebno je nakon sušenja na zraku obojiti metodom po Pappenheimu (May-Grunwald Giemsa; MGG). Obojeni razmaz mikroskopiramo pod povećanjem $\times 1000$ i diferenciramo 100 leukocita, vrijednosti se izražavaju u postotku.

4.4. Statističke metode

Kategorijski podatci prikazani su samo apsolutnim frekvencijama ($n = 36$). Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona (IR) jer ne slijede normalnu raspodjelu. Normalnost raspodjele testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0.05$. Za statističku analizu korišten je statistički program Med Calc (11.1.0.0, MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija). Razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U-testom jer svi rezultati odstupaju od normalne raspodjele.

Povezanost varijabli učinjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije ρ (rho) jer svi rezultati odstupaju od normalne raspodjele.

5. REZULTATI

5.1. Ispitanici po spolu i dobi

Svi rezultati prikazani su tablično i točkastim dijagramom (engl. *Dot plot*) i dijagramom pravokutnika. U istraživanje je uključeno 36 pacijenata s dijagnozom B-KLL-a. U odnosu na spol bilo je 23 muških i 13 ženskih ispitanika. Medijan ispitanika u vrijeme dijagnoze jest 68 godina (41–83 godine).

5.2 Vrijednosti analita u odnosu na referentni raspon

Za sve ispitanike prikupljene su vrijednosti postotka limfocita, apsolutnog broja limfocita, ekspresije CD38 izražene u postotku pozitivnih klonalnih stanica, aktivnosti LDH u U/L i koncentracije β 2-mikroglobulina izražene u mg/L. Kako je prikazano u Tablici 1. vrijednosti su izražene kao medijan i interkvartilni raspon, jer ne slijede normalnu razdiobu.

Tablica 1. Vrijednosti analita u odnosu na referentni raspon

Analit, n = 36	Medijan, (IR)	n povišenih vrijednosti analita u odnosu na referentni raspon
Limfocit (%)	87,5 (47,5–96,0)	36/36
Limfociti x 10 ⁹ /L	45,0 (4,5–335,6)	32/36
CD38 (%)	5,5 (0,3–76,4)	11/36
LDH (U/L)	215,0 (136,5–517,7)	15/36
B2M (mg/L)	3,9 (1,7–7,5)	29/36

U vrijeme dijagnoze svi ispitanici imali su povišene vrijednosti limfocita u apsolutnim ili relativnim vrijednostima. Trećina pacijenata imala je povišen udio CD38 na klonalnim limfocitima. Manje od polovice pacijenata imalo je povišene vrijednosti LDH, dok je povišen β 2-mikroglobulin nađen u gotovo svih pacijenata.

5.3 Usporedba CD38 s LDH, B2M, apsolutnim brojem i postotkom limfocita

Uspoređene su za sve ispitanike izmjerene vrijednosti biomarkera CD38 s izmjerenim vrijednostima LDH, B2M, apsolutnim brojem limfocita (#Ly) i postotkom limfocita (%Ly). Povezanost varijabli izražena je Spermanovim koeficijentom korelacije ρ (rho) jer svi rezultati

odstupaju od normalne raspodjele (Tablica 2.).

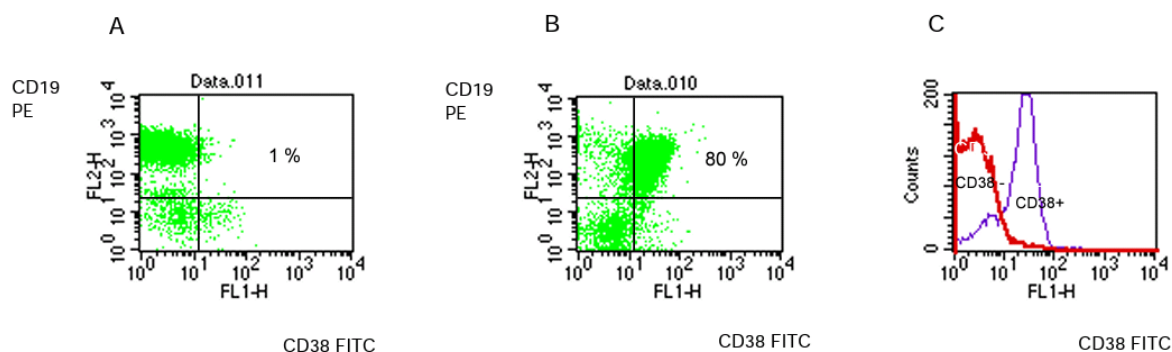
Tablica 2. Usporedba CD38 s LDH, B2M, apsolutnim brojem limfocita i postotkom limfocita

CD38	Rho	95% CI	p*
LDH	0,251	-0,084-0,535	0,137
B2M	0,351	0,025-0,609	0,038
Limfociti x 10 ⁹ /L	-0,006	-0,334-0,323	0,97
Limfociti %	-0,158	-0,471-0,191	0,37

Vrijednosti CD38 u usporedbi s vrijednostima β 2-mikroglobulina pokazuju slabu pozitivnu korelaciju ($\rho = 0,351$) koja je statistički značajna ($P = 0,038$). Ostale varijable ne pokazuju statistički značajnu korelaciju.

5.4. Usporedba postotka CD38 između dvije skupine

Prema podacima dosadašnjih kliničkih studija utvrđeno je da je KLL klon pozitivan na CD38 ako se više od 20 % CD19+ i CD5+ KLL stanica oboji pozitivno anti-CD38 protutijelom (22). Vrijednost CD38 ≥ 20 % smatra segraničnom vrijednosti na osnovi koje je moguće razdvojiti ispitanike u dvije skupine s različitom prognozom i ishodom bolesti. Skupina ispitanika s pozitivnim CD38 karakterizirana je lošim kliničkim tijekom, lošijim odgovorom na kemoterapiju i kraćim preživljenjem, dok pacijenti s negativnim CD38 uglavnom ne trebaju terapiju i imaju dulje preživljenje.



Slika 6. Izražaj prognostičkog biljega CD38 na monoklonskim B-limfocitima bolesnika s B-KLL-om

- A.) Prikaz točkastim dijagramom klonskih B-limfocita negativnih na CD38– izražaj CD38 < 20 %
- B.) Prikaz točkastim dijagramom klonskih B-limfocita pozitivnih na CD38– izražaj CD38 > 20 %
- C.) Histogramski prikaz CD38 negativnih (crveno) i CD38 pozitivnih (ljubičasto) klonskih B-limfocita

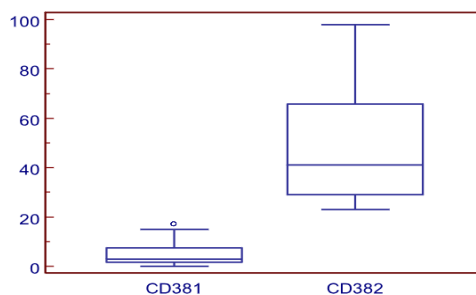
Stoga su ispitanici podijeljeni u dvije skupine na osnovi pozitivnosti na CD38 biljega. CD38 negativnih kojima je CD38 < 20 % bilo je 25 ispitanika od 36, dok je CD38 pozitivnih gdje je CD38 \geq 20 % bilo je 11 ispitanika od 36. Rezultati istraživanja izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon jer ne slijede normalnu razdiobu (Tablica 3).

Tablica 3. Usporedba CD38 % između dvije skupine

	CD38 %		
	CD38 < 20 %	CD38 \geq 20 %	
Broj ispitanika n	25	11	
% CD38 Medijan Interkvartilni raspon	3,0 (1,8–7,5)	41,0 (29,0–5,8)	P < 0,0001 *

* Man-Whitney U test, P < 0.05

Vrijednosti ekspresije CD38 na klonskim stanicama značajno se razlikuju između skupine pozitivnih ispitanika i skupine negativnih ispitanika, P < 0,0001.



Slika 7. Usporedba postotka CD38 (CD38 %) između dvije skupine.

Kod ove dvije skupine ispitanika uspoređene su vrijednosti LDH, β 2-mikroglobulina, postotka limfocita i apsolutnog broja limfocita. Rezultati su izraženi kao medijan i interkvartilni raspon jer ne slijede normalnu razdiobu i prikazane u tablici 4. i na slikama 7, 8, 9 i 10.

Tablica 4. Usporedne vrijednosti LDH, β 2-mikroglobulina, postotka limfocita i apsolutnog broja limfocita između dvije skupine.

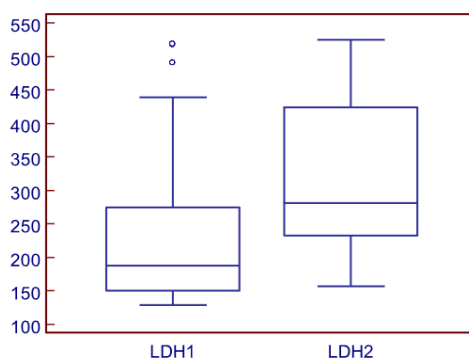
	CD38 %		P*
	CD38 < 20 %	CD38 > 20 %	
LDH	188,0 (150,0–274,5)	281,0 (232,5–423,5)	0,03
BM2	3,3,0 (2,3–4,8)	5,0 (4,3–6,6)	0,01
Limfociti %	89 (76–93)	85 (76–93)	0,93
Limfociti x 10 ⁹ /L	44,2 (14,8–104,9)	45,9 (27,8–92,0)	0,90

* Man-Whitney U-test, $P < 0,05$

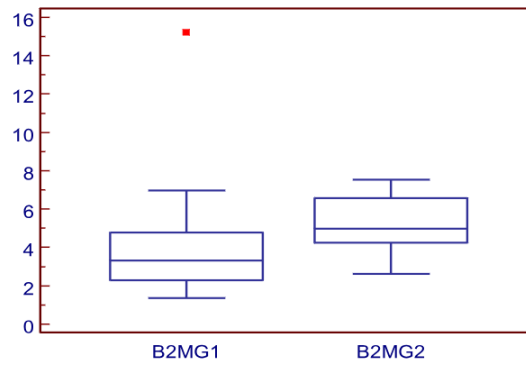
Izmjerene vrijednosti katalitičke aktivnosti LDH značajno se razlikuju između skupine pozitivnih ispitanika i skupine negativnih ispitanika, $P < 0,03$.

Izmjerene koncentracije β 2-mikroglobulina značajno se razlikuju između skupine pozitivnih ispitanika i skupine negativnih ispitanika, $P < 0,01$.

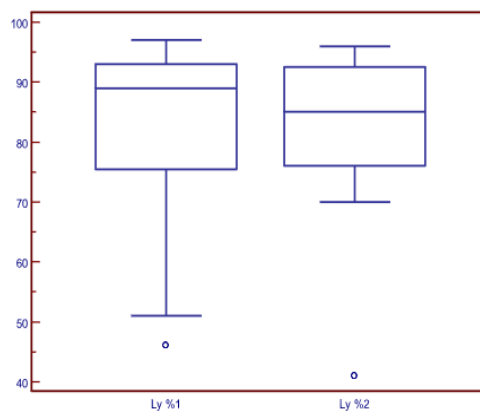
Usporedbom vrijednosti postotka limfocita i apsolutnog broja limfocita između dvije skupine nisu dobivene statistički značajne razlike.



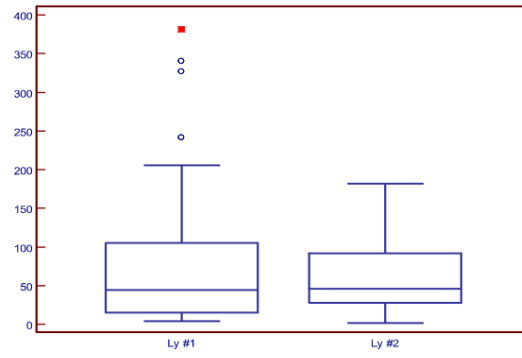
Slika 8. Usporedba aktivnosti LDH između dvije skupine.



Slika 9. Usporedba koncentracije β 2-mikroglobulina između dvije skupine.



Slika 10. Usporedba limfocita u postotku između dvije skupine.



Slika 11. Usporedba apsolutnog broja limfocita između dvije skupine

6. RASPRAVA

U ovoj retrospektivnoj studiji obuhvaćeno je 36 ispitanika kojima je u prethodne dvije godine dijagnosticiran KLL na Odjelu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Osijek. U studiju su uključeni oni pacijenti kojima je u vrijeme dijagnoze bilo određivano sljedećih pet prognostičkih parametara: apsolutni i relativni broj limfocita, aktivnost enzima LDH, koncentracija β -2-mikroglobulina i udio CD38 pozitivnih klonalnih B-limfocita. Za klasificiranje stadija bolesti koriste se klasifikacije Rai (bazirana na limfocitozi) i Binet (bazirana na anemiji i zahvaćenosti limfoidnih tkiva) kojima se pokušava procijeniti prognoza, odnosno medijan preživljenja (10, 11), ali se konstantno traga za boljim prognostičkim biljezima, kojima bi se u ranijim stadijima bolesti moglo bolje procijeniti individualno stanje bolesti i rizik od progresije. U posljednjih nekoliko godina mnoge studije navode biljeg CD38 na površini klonalnih B-limfocita kao jedan od najpouzdanijih prognostičkih parametara za B- KLL (12). Njegova aktivacija na površini B-limfocita inducira proliferaciju, inhibira apoptozu i dovodi do sekrecije citokina, stoga se ekspresija CD38 kod bolesnika s KLL-om povezuje s proliferacijom malignog klona i lošijom prognozom (14). Problem je određivanja CD38 standardizacija metode, jer se ekspresija tog biljega određuje metodom protočne citometrije koja nije standardizirana. Također, problem je i granična vrijednost udjela CD38-pozitivnih klonalnih stanica koja će biti dovoljno osjetljiva i specifična da jasno razdvoji bolesnike s lošijom i boljom prognozom. U literaturi se se mogu pronaći različito postavljene granične vrijednosti visine udjela CD38-pozitivnih klonalnih stanica od 5, 10, 20 ili čak 30 % (22). U ovom istraživanju odabrana je granična vrijednost CD38+ \geq 20 % kao najčešće upotrebljavana vrijednost za određivanje prognoze. Rezultati su pokazali da gotovo trećina naših ispitanika ima izmjerene vrijednosti CD38 iznad granične vrijednosti, stoga smo ispitanike podijelili u dvije skupine s obzirom na pozitivnost na CD38, gdje ispitanici s CD38 < 20 % (CD38 negativni) imaju bolju prognozu, a oni s CD38 \geq 20 % (CD38 pozitivni) imaju lošiju prognozu. Uspoređivane su vrijednosti medijana ostalih prognostičkih biljega (LDH, β 2 mikroglobulina, relativnog i apsolutnog broja limfocita) između te dvije skupine.

Rezultati su pokazali da se vrijednosti aktivnosti enzima LDH značajno razlikuju kod dvije skupine bolesnika, s obzirom na pozitivnost CD38. Kod CD38 pozitivnih pacijenata (pacijenata s lošijom prognozom) vrijednosti aktivnosti LDH su gotovo 50 % više od onih u CD38 negativnih pacijenata (tablica 4).

Ovakav rezultat može se objasniti činjenicom da se enzim LDH nalazi u citoplazmi svih stanica pa tako i stanica hematopoeze. Dolazi do povećanja njegove aktivnosti uslijed klonalnog bujanja hematopoeznog tkiva, što je slučaj u B-KLL-u.

Kod pacijenata s KLL-om aktivnost LDH rutinski se određuje kako bi im se procijenila funkcija koštane srži, jetre, bubrega i imunološkog sustava, odnosno stadij i progresija bolesti (17.). Aktivnost LDH se kao prognostički parametar uvrštava u izračun Međunarodnog prognostičkog indeksa (IPI), koji se koristi već dva desetljeća za procjenu aktivnosti i prognozu bolesti (17.).

U ovom istraživanju dokazano je da je čak 80 % ispitanika imalo povišene vrijednosti koncentracije β 2-mikroglobulina u vrijeme postavljanja dijagnoze, i to čak šest puta više od gornje granice referentnog raspona. Koncentracija β -2-mikroglobulina značajno je viša u CD38 pozitivnoj skupini ispitanika nego u CD38 negativnoj (tablica 4). Razlog tome je da je povišena koncentracija β -2-mikroglobulina u serumu prisutna u brojnim hematološkim bolestima, uključujući leukemije, limfome, mijelodisplastični sindrom i multipli mijelom. Također se smatra da njegova koncentracija u serumu bolesnika korelira s veličinom tumorske mase (22.) Prognostička vrijednost β -2-mikroglobulina leži u činjenici da mu je koncentracija niska u ranoj fazi bolesti dok je tumorska masa još uvijek mala (15.). Stoga se preporuča odrediti koncentraciju β -2-mikroglobulina kod svih novodijagnosticiranih bolesnika s B-KLL-om (24.).

Apsolutni broj klonalnih B-limfocita pokazatelj je cirkulirajuće tumorske mase u B-KLL-u koja nastaje zbog poremećenih apoptotičkih mehanizama uslijed maligne proliferacije, odnosno klonalnog bujanja zrelih, funkcionalno oslabljenih limfocita. Također, bujanje klonalnih limfocita potiskuje ostale stanične loze u koštanoj srži, što dovodi do anemije i trombocitopenije, koje su također loš prognostički znak (2). Kod svih ispitanika u ovom istraživanju apsolutni i relativni broj limfocita bio je iznad gornje granice referentnog intervala (tablica 4). Između CD38 pozitivne i CD38 negativne skupine nije bilo značajne razlike u broju limfocita, zato što iako je broj limfocita pokazatelj veličine tumorske mase i smatra se prognostičkim biljegom, u daljnjem tijeku bolesti nema značaj kod postavljanja dijagnoze (10, 11) kao što su potvrdili i naši rezultati.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- CD38 u usporedbi s β 2-mikroglobulinom, u ukupnoj populaciji ispitanika, pokazuje slabiju korelaciju, dok s LDH, apsolutnim i relativnim brojem limfocita ne korelira.
- Podjela na CD38 pozitivne i CD38 negativne ispitanike donosi značajnu razliku. Vrijednosti LDH i β 2-mikroglobulina su znatno više kod CD38 pozitivnih ispitanika.
- Pri usporedbi CD38 s apsolutnim i relativnim brojem limfocita ne nalazimo razlike među skupinama. Iako je broj limfocita pokazatelj veličine cirkulirajuće tumorske mase, nema značaj kao rani prognostički biomarker.
- CD38 dobar je rani prognostički biomarker i treba biti uključen u rutinski panel za dijagnozu B-KLL-a protočnom citometrijom.
- CD38 treba određivati u ranoj fazi bolesti i u kombinaciji s drugim prognostičkim biomarkerima, osobito LDH i β 2-mikroglobulinom.
- Potrebno je u budućnosti uključiti veći broj ispitanika kako bi se dobili relevantniji podatci.

8. SAŽETAK

Uvod: B-kronična limfocitna leukemija zloćudni je tumor zrelih B-limfocita. Bolest je obilježena progresivnim nakupljanjem malih limfocita monoklonalnog podrijetla u koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnim čvorovima. Medijan preživljenja kod ove je bolesti različit. Konstantno se traga za prognostičkim biljezima kojima bi se u ranijim stadijima bolesti moglo što bolje procijeniti individualno stanje bolesti i rizik od progresije.

Cilj: Cilj je ovog istraživanja bio usporediti vrijednosti CD38 s vrijednostima prognostičkih biljega: LDH, β 2-mikroglobulina, apsolutnog broja limfocita i limfocita u postotku. Zatim razdvojiti ispitanike u dvije skupine na osnovu pozitivnosti CD38 te svaku skupinu usporediti s ostalim navedenim prognostičkim biljezima.

Metode: Izražaj CD38 biljega na klonalnim stanicama B-KLL-a određen je metodom direktnog imunofluorescentnog testa i izmjeren je na protočnom citometru.

Rezultati: Kod usporedbe CD38 pokazuje slabu korelaciju s β 2-mikroglobulinom, dok s ostalim parametrima ne korelira. Vrijednosti ekspresije CD38 na klonalnim stanicama značajno se razlikuju između skupine CD38 pozitivnih i CD38 negativnih ispitanika. Dobivena je značajna razlika između tih dviju skupina za parametre LDH i β 2-mikroglobulin.

Zaključak: CD38 rani je prognostički biomarker koji se pokazao kao osobito dobar u kombinaciji s LDH i β 2-mikroglobulinom.

Ključne riječi: B-kronična limfocitna leukemija, CD38, LDH, β 2-mikroglobulin, protočna citometrija

9. SUMMARY

Introduction: B-chronic lymphocytic leukemia is a malignant tumor of mature B lymphocytes. The disease is characterized by progressive accumulation of small lymphocytes of monoclonal origin in the bone marrow, peripheral blood and lymph nodes. Median survival of people suffering from this disease is difficult to determine because the survival is different for every individual. Prognostic markers are consistently researched in order to better assess the individual state of the disease and the risk of progression in earlier stages of the disease.

Objective: The aim of this study was to compare CD38 values with prognostic markers: LDH, β 2-microglobulin, absolute lymphocytes and the percentage of lymphocytes. Then, the examinees were separated into two groups based on the CD38 positivity, and each group was compared with the prognostic markers mentioned above.

Methods: The expression of CD38 markers on clonal B-KLL cells was determined by the direct immunofluorescent assay method and measured by flow cytometry.

Results: The comparison of CD38 shows poor correlation with β 2-microglobulin, while with it does not correlate at all with other parameters. CD38 expression values on clonal cells differ significantly between the CD38 positive and CD38 negative subjects. A significant difference was found between these two groups for LDH and β 2-microglobulin parameters.

Conclusion: CD38 is an early prognostic biomarker, which proved to be particularly good biomarker in combination with LDH and β 2-microglobulin.

Keywords: B-chronic lymphocytic leukemia, CD38, LDH, β 2-microglobulin, flow cytometry

10. LITERATURA

1. Swerdlow SH i suradnici The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 217 (20): 2375—90
2. Labar B, i suradnici, *Hematologija, Školska knjiga, Zagreb, 2017.*
3. Jakšić B, Pejša V, Kardum-Skelin I, Bašić-Kinda S, Korać P, Vrhovac R, i suradnici, Kronična limfocitna leukemija, Bilten KROHEMA, Vol2., br.1., Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti, svibanj, 2010.
4. Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with CLL Cancer 1999; 86: 684–692
5. Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familiar CLL *Hematol Oncol ClinNorth Am* 2004; 18: 783
6. Caligaris-Cappio F and Hamblin TJ. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia:A Bird of a Different Feather. *JCO.*1999;17(1):399–408
7. Nabhan C, Raca G, Wong YL. Predicting Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Contemporary Era, *JAMA Oncol.* Listopad 2015; 1(7); 965.
8. Labar B, Hauptmann E, i suradnici, 4, *Hematologija, Školska knjiga, Zagreb, 2007.*
9. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet.* 2008;371(9617):1017–1029
10. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975;46(2):219–234
11. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, i sur. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* Lipnja 1981; 1;48(1):198–206
12. Matrai Z, CD38 as a prognostic marker in CLL, *Hematology*,10 (1), 39-46, 2005.
13. AU – Yeung BB, Shah NH, Shen L, Weiss A. ZAP-70 in Signaling, Biology, and Disease. *Annual Reviews Immunology*, 2018;36:127-156
14. Chuan He, Zhigang Liu, Jie Ji, Huanling Zhu, Prognostic significance of CD38 for chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis. *International Journal Clinical Experimental-Medicina*, 2017;10(3):4305-4312.
15. Lothar Thomas, *Clinical Laboratory Diagnostic, Use and Assessment of Clinical Labaratroy Results, Frankfurt-Main, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998*

16. Kardum-Skelin I, Planinc-Peraica A, Ostojić-Kolonić S, Radić-Krišto D, Milas M, Vrhovac R i suradnici, Klinički i laboratorijski prognostički pokazatelji korničnih i leukemijskih limfoproliferativnih bolesti, *Acta Med Croatica*, 62 (2008) 351–364
17. Aurer I, Hematološki maligniteti, *Medicinska / internistička onkologija*, Sarajevo: Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu, 2014. str. 35–69
18. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Ann Rev Immunol*. 2003;21:841—894
19. Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haem* 2002;24:1–13.
20. Osborn M, Domagala W. Immunocytochemistry. U: Bibbo M. Ur. *Comprehensive Cytopathology*. 2. izd. Philadelphia: WB Saunders Company, 1997:1033–1074
21. Čvorišćec D, Čepelak I, Štrausova Medicinska biokemija, 3, Medicinska naklada, Zagreb 2009.
22. Montserrat E. New prognostic marker sin CLL, *Hematology* 2006: 279–284
23. McKenzie S.B. *Clinical Laboratory Hematology*. New Jersey; Pearson Prentice Hall; 2004.
24. Moreno C, Montserrat E, New prognostic marker sin chronic lymphocytic leukemia, *Blood Reviews* (2008) 22, 211–219

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Sonja Prisuda

Datum i mjesto rođenja: 14. kolovoza 1965., Sokolovac

Telefon: 095 577 0795

E-mail : sonja.prisuda@gmail.com

Obrazovanje:

Sanitarno laboratorijski stručni radnik,

Školski centar „Ruđer Bošković“, Osijek, 1980.–1984. godine,

Sveučilišna prvostupnica medicinsko laboratorijske dijagnostike,

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet osijek, 2011.–2014. godine

Radno iskustvo:

1984.–1986. godine, Dom zdravlja, Beli Manastir

1986.–1987.godine, Medicinski centar Našice

6. travnja 1987. godine do danas, KBC Osijek, Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku