# Morfometrijski i kinetički parametri kao dijagnostički i prognostički čimbenici leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti

**Kardum-Skelin, Ika**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2008**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:360404

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-18**

*Repository / Repozitorij:*

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

**Središnja medicinska knjižnica**

**Kardum-Skelin, Ika (2008)** ***Morfometrijski i kinetički parametri kao dijagnostički i prognostički čimbenici leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti.*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/827

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

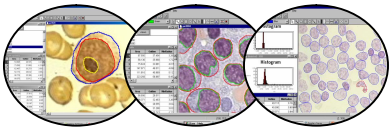
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

**Ika Kardum-Skelin**

# Morfometrijski i kinetički parametri kao dijagnostički i prognostički čimbenici leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti

DISERTACIJA

**Zagreb, 2008.**



**Rad je izrađen u Laboratoriju za citologiju i hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KB „Merkur“.**

**Voditelj rada: prof. dr. sc. Branimir Jakšić**

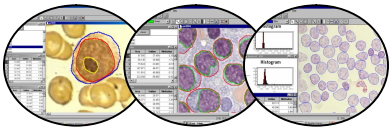

Najiskrenije se zahvaljujem svima koji su mi pomogli savjetima, podrškom ili na bilo koji drugi način, tijekom izrade rada:

- *prof. dr. sc. Branimiru Jakšiću, dr. med. koji je dio svoje znanstvene znatiželje i istraživačkog duha prenio i na mene, poticao me na rad i vjerovao da će ovi rezultati jednog dana izići na svjetlo dana. Ne sputavajući me u izražavanju vlastitih misli i ideja, uspješno je modelirao i usmjeravao tijek razmišljanja logičnim slijedom,*
- *prof. dr. sc. Ingi Črepinko, dr. med. koja me zarazila „virusom“ citologije, od koje sam naučila tajne ove prelijepe struke i shvatila zašto je Lopez Cardozo rekao „Love it or leave it“,*
- *dr. sc. Ozrenu Jakšiću, dr. med. koji mi je omogućio proniknuti u tajne statistike,*
- *dr. sc. Mariani Mirjani Kardum Paro, dipl. ing. biok. na vrijednim savjetima oko statističke literature,*
- *svim članovima Odjela za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KB „Merkur“ na dostupnosti kliničkih podataka, posebno doc. dr. sc. Ani Planinc-Peraica i prof. dr. sc. Slobodanki Ostojić Kolonić,*
- *svim članovima Laboratorija za citologiju i hematologiju KB „Merkur“ jer bez njihove pomoći ovaj rad ne bi bio moguć, mr. sc. Iris Fabijanić, dr. med., Biljani Jelić-Puškarić, dr. med., Veroniki Anić, Gordani Knežević i Katici Hrgović,*
- *posebno Dunji Šušterčić, dr. med. koja mi je bila moralna podrška u kriznim trenucima i koja je uvijek bila na pravom mjestu u pravo vrijeme,*
- *dr. sc. Ani Borovečki, dr. med., Biserki Križaj, ing. i Katarini Parigos u prikupljanju i obradi podataka,*
- *mr.sc. Ireni Seili-Bekafigo, dr. med. s kojom sam sredinom 90-tih uvodila statičku DNA citometriju, mučila početničke brige, izmjenjivala literaturu,*
- *prim. mr. sc. Vesni Mahovlić, dr. med. koja nam se pridružila na zajedničkoj problematici izrazito zahtjevne interpretacije DNA analize, naročito u dugim telefonskim konzultacijama,*
- *svim vrijednim članovima tvrtke VAMSTEC iz Zagreba na čelu s Adilom Đuburom, dipl. ing. koji su mi pomagali u svladavanju prepreka koje sam nailazila tijekom kompjuterske obrade te uvažavanjem mojih primjedbi i ideja omogućili svrsishodnije korištenje cijelog sistema,*
- *svojim roditeljima koji su vjerovali u mene,*
- *posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji na podršci i razumijevanju.*

*Mojim najdražima*

*Ivi, Matku i Vladi*

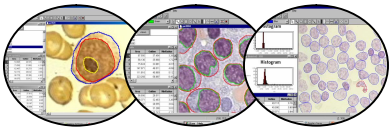
*za sve uskraćene zajedničke trenutke*



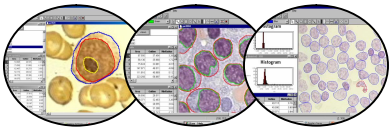
# SADRŽAJ


**1. UVOD**……..……....1
1.1. KRONIČNE LIMFOPROLIFERATIVNE BOLESTI…… ….....1
*1.1.1. DEFINICIJA*…….. …….....1
*1.1.2. HISTOGENEZA B i T-LIMFATIČNOG SUSTAVA KAO OSNOVA ZA RAZUMIJEVANJE NASTANKA MALIGNIH ENTITETA*……..……...1
*1.1.3. SZO KLASIFIKACIJA ZRELIH B i T-LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLESTI*…...…….....5
1.1.3.1. Zrele T-limfoproliferativne bolesti..……..…....5
1.1.3.2. Zrele B-limfoproliferativne bolesti…….....7
*1.1.3.2.1. Predominantno diseminirane zrele B-limfocitne neoplazme*….....….....7
*1.1.3.2.2. Primarno ekstranodalni B-limfomi*…….....…...7
*1.1.3.2.3. Predominantno nodalni B-limfomi*…….....8
*1.1.4. BIOLOŠKO PONAŠANJE ZRELIH B-LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLESTI*…….....8
*1.1.5. DISEMINIRANE (LEUKEMIJSKE) ZRELE B-LIMFOPROLIFERATIVE BOLESTI*…….....……....9
1.1.5.1. B-kronična limfocitna leukemija /B-limfom malih limfocita (KLL/MLL)…....10
*1.1.5.1.1. Definicija i stanično podrijetlo*…….....10
1.1.5.1.2. *Epidemiologija i klinička slika*…….…….....10
*1.1.5.1.3. Morfologija*…….....14
*1.1.5.1.4. Imunofenotip*…….....15
*1.1.5.1.5. Genetika*…….....15
1.1.5.2. B-prolimfocitna leukemija……...16
*1.1.5.2.1. Definicija i stanično podrijetlo*…..……....16
*1.1.5.2.2. Epidemiologija i klinička slika*…….....16
*1.1.5.2.3. Morfologija*…….....…16
*1.1.5.2.4. Imunofenotip*…….....16
*1.1.5.2.5. Genetika*……17
1.1.5.3. Limfoplazmocitoidni limfom - Waldenströmova makroglobulinemija……....17
*1.1.5.3.1. Definicija i stanično podrijetlo*……...…17
*1.1.5.3.2. Epidemiologija i klinička slika*…….....17
*1.1.5.3.3. Morfologija*……....17
*1.1.5.3.4. Imunofenotip*……18
*1.1.5.3.5. Genetika*……....18
1.1.5.4. Splenični limfom marginalne zone (SMZL)……..18
1.1.5.4.1. *Definicija i stanično podrijetlo*…….…....18
*1.1.5.4.2. Epidemiologija i klinička slika*…….……..…..19
*1.1.5.4.3. Morfologija*…….....19
*1.1.5.4.4. Imunofenotip*……19
*1.1.5.4.5. Genetika*……20
1.1.5.5. Triholeukemija (HCL)…….....20
1.1.5.5.1. *Definicija i stanično podrijetlo*……..……20
*1.1.5.5.2. Epidemiologija i klinička slika*……..…..20
*1.1.5.5.3. Morfologija*……20
*1.1.5.5.4. Imunofenotip*……....21
*1.1.5.5.5. Genetika*……..…..21
1.1.5.6. Varijanta triholeukemije...……21
1.1.5.7. T-prolimfocitna leukemija (T-PLL)…….……22
1.1.5.7.1. *Definicija i stanično podrijetlo*……..…..…22
*1.1.5.7.2. Epidemiologija i klinička slika*……..…..…22
*1.1.5.7.3. Morfologija*……22
*1.1.5.7.4. Imunofenotip*…….……....23

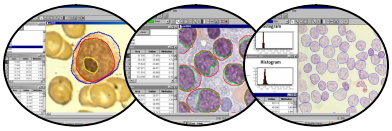
*1.1.5.7.5. Genetika*.....23
1.1.5.8. T leukemija velikih granuliranih limfocita (T-LGL).....23
*1.1.5.8.1. Definicija i stanično podrijetlo*.....23
*1.1.5.8.2. Epidemiologija i klinička slika*.....23
*1.1.5.8.3. Morfologija*.....24
*1.1.5.8.4. Imunofenotip*.....24
*1.1.5.8.5. Genetika*.....24
1.1.5.9. Adultna T-leukemija/limfom (ATLL).....24
*1.1.5.9.1. Definicija i stanično podrijetlo*.....24
*1.1.5.9.2. Epidemiologija i klinička slika*.....25
*1.1.5.9.3. Morfologija*.....25
*1.1.5.9.4. Imunofenotip*.....26
*1.1.5.9.5. Genetika*.....26
*1.1.6. PRIMARNO EKSTRANODALE ZRELE B-LIMFOPROLIFERATIVNE BOLESTI*.....26
1.1.6.1. Ekstranodalni B-stanični limfom marginalne zone – („mucose associated lymphoid tissue“) - MALT.....26
*1.1.6.1.1. Definicija i stanično podrijetlo*.....26
*1.1.6.1.2. Epidemiologija i klinička slika*.....26
*1.1.6.1.3. Morfologija*.....27
*1.1.6.1.4. Imunofenotip*.....27
*1.1.6.1.5. Genetika*.....27
*1.1.7. PREDOMINANTNO NODALNI B-LIMFOMI*.....27
1.1.7.1. Nodalni B-limfomi marginalne zone (NMZL).....28
*1.1.7.1.1. Definicija i stanično podrijetlo*.....28
*1.1.7.1.2. Epidemiologija i klinička slika*.....28
*1.1.7.1.3. Morfologija*.....28
*1.1.7.1.4. Imunofenotip*.....28
*1.1.7.1.5. Genetika*.....28
1.1.7.2. Folikularni limfomi (FC).....29
*1.1.7.2.1. Definicija i stanično podrijetlo*.....29
*1.1.7.2.1. Epidemiologija i klinička slika*.....29
*1.1.7.2.3. Morfologija*.....29
*1.1.7.2.4. Imunofenotip*.....30
*1.1.7.2.5. Genetika*.....30
1.1.7.3. Limfom plaštene zone («mantle cell» limfom - MCL)..... 30
*1.1.7.3.1. Definicija i stanično podrijetlo*.....30
*1.1.7.3.2. Epidemiologija i klinička slika*.....30
*1.1.7.3.3. Morfologija*.....31
*1.1.7.3.4. Imunofenotip*.....31
*1.1.7.3.5. Genetika*.....31
1.1.7.4. Difuzni B-velikostanični limfomi (DLBCL)..... 31
*1.1.7.4.1. Definicija i biološko podrijetlo*.....31
*1.1.7.4.2. Epidemiologija i klinička slika*.....32
*1.1.7.4.3. Morfologija*.....32
*1.1.7.4.4. Imunofenotip*.....33
*1.1.7.4.5. Genetika*.....33
1.2. KOMPJUTERSKA ANALIZA SLIKE.....33
*1.2.1. UVOD*.....33
*1.2.2. SISTEM ZA SLIKOVNU ANALIZU*.....34
*1.2.3. VRSTE I PRIPREMA UZORAKA ZA KOMPJUTERSKU ANALIZU SLIKE*.....35
*1.2.4. MORFOLOŠKI I KINETIČKI KRITERIJI MALIGNITETA STANICE*.....35




*1.2.5. KVANTITATIVNE KOMPJUTERSKE SLIKOVNE TEHNIKE U CITOMORFOLOGIJI I HISTOMORFOLOGIJI*……..37
1.2.5.1. Morfometrija……...…….37
*1.2.5.1.1. Faktori koji utječu na morfometrijsku analizu*……...…….....37
*1.2.5.1.2. Morfometrijski pokazatelji*……...…....38
1.2.5.2. Regija nukleolarnog organizatora – AgNOR……...……....39
*1.2.5.2.1. Uvod*…….....39
*1.2.5.2.2. Prikazivanje AgNOR-a*……40
*1.2.5.2.3. AgNOR strukture i konfiguracije u normalnim i patološkim stanicama*……40
*1.2.5.2.4. Faktori koji utječu na točnost*……43
*1.2.5.2.5. Interpretacija rezultata*……43
1.2.5.3. Statička („image“) DNA citometrija……...44
*1.2.5.3.1. Uvod*…….....44
*1.2.5.3.2. Stanični ciklus*……...…..44
*1.2.5.3.3. Određivanje sadržaja DNA (ploidije) u malignim stanicama*……..…45
*1.2.5.3.4. Metode za određivanje sadržaja DNA*……...45
*1.2.5.3.5. Uzorci za statičku DNA citometriju*……....47
*1.2.5.3.6. Bojenje za statičku DNA citometriju*……...47
*1.2.5.3.7. Diploidna interna kontrola*……48
*1.2.5.3.7. Standardizacija metode*……48
*1.2.5.3.9. Interpretacija sadržaja DNA i određivanje ploidije*……..…..48
*1.2.5.3.10. DNA indeks*……....49
*1.2.5.3.11. Diploidija (euploidija, 2N, 2C)*……....49
*1.2.5.3.12. Aneuploidija*……..…49
*1.2.5.3.14. Koeficijent varijacije*……49
*1.2.5.3.15. Interpretacija histograma*……..….....50
*1.2.5.3.16. Osnovni ciljevi dijagnostičke DNA citometrije*…….....51
**2. CILJEVI**…….....53
**3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE**…….....…54
3.1. ISPITANICI…….....54
3.2. METODE……...56
*3.2.1. KOMPJUTERSKA ANALIZA SLIKE*……...…56
3.2.1.1 Morfometrijska analiza stanice i jezgre……..56
3.2.1.2. Analiza AgNOR-a……...……...…….....57
3.2.1.3. Statička DNA citometrija……...…….....59
*3.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA*……...…….....62
3.3.1. Opis varijabli……...……..…....62
3.3.2. Analiza povezanosti……....…62
3.3.3. Analiza preživljenja……...……..62
**4. REZULTATI**……63
4.1. ISPITANICI……...…63
4.2. REZULTATI MEĐUSOBNOG ODNOSA ISPITIVANIH POKAZATELJA……..…...…65
*4.2.1. MEĐUSOBNI ODNOS POKAZATELJA MORFOMETRIJSKE ANALIZE, ANALIZE AgNOR-a I STATIČKE DNA CITOMETRIJE*……..……....65
4.2.2. *RAZLIČITI ODJELJCI DISTRIBUCIJE TUMORSKE MASE*……...…66
4.2.2.1. Koštana srž i periferna krv……..…….....66
4.2.2.2. Koštana srž i limfni čvor……...…67
4.2.2.3. Periferna krv i limfni čvor……....68
*4.2.3. VELIČINA TUMORSKE MASE I POKAZATELJI DOBIVENI KOMPJUTERSKOM ANALIZOM*……..…70
4.2.3.1. Klinički stadij bolesti po Binet-u……..…70

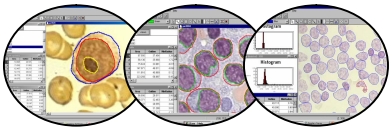



4.2.3.2. Klinički stadij bolesti po Rai-u……..…72
4.2.3.3. Povećanje limfnih čvorova……..……...73
4.2.3.4. Ukupna (totalna) tumorska masa po Jakšiću……..73
*4.2.4. BIOLOŠKO PONAŠANJE/PROGRESIJA BOLESTI I POKAZATELJI DOBIVENI KOMPJUTERSKOM ANALIZOM*……75
4.2.4.1. Udvostručenje tumorske mase u mjesecima……..…..……75
4.2.4.2. Udvostručenje apsolutnog broja limfocita u mjesecima……..……77
*4.2.5. POVEZANOST ISPITIVANIH POKAZATELJA S DOBI I SPOLOM*……..……79
4.3. PROGNOSTIČKA EVALUACIJA……..…... ..81
*4.3.1. KLINIČKI POKAZATELJI*…….....81
*4.3.2. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE LIMFATIČNIH STANICA I TIP INFILTRACIJE U KOŠTANOJ SRŽI*……..……...85
*4.3.3. LABORATORIJSKI POKAZATELJI*…….....……87
4.3.3.1. Hematološki pokazatelji……...……87
4.3.3.2. Biokemijski pokazatelji……..……..89
*4.3.4. POKAZATELJI DOBIVENI KOMPJUTERSKOM ANALIZOM SLIKE*……..……...92
4.3.4.1. Morfometrijska obilježja…….....……92
4.3.4.2. Osobine regije nukleolarnog organizatora……..……....……97
4.2.4.3. Osobine statičke DNA citometrije……....……104
4.4. PROLIFERACIJKO-KINETIČKI INDEKS ZA KLLPB I B-KLL+V……..……..108
**5. RASPRAVA**……....……111
5.1. TEORIJA „ZAČARANOG KRUGA“ TE HIPOTEZA «SINGLE» I „MULTIPLIH“ PROGRAMIRANIH STOPOVA U NASTANKU TIPIČNIH OBLIKA LEUKEMIJA I LIMFOMA TE SUBAKUTNIH I SUBKRONIČNIH LEUKEMIJA…….....……125
**6. ZAKLJUČCI**……129
6.1. OBILJEŽJA ISPITIVANIH BOLESNIKA S LEUKEMIJSKIM OBLICIMA KRONIČNIH LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLESTI….....…129
6.2. PROGNOSTIČKI POKAZATELJI……129
6.3. INOVATIVNI PRISTUP ANALIZI DIPLOIDNOG TIPA HISTOGRAMA TE ZNAČENJE NOVOOPISANIH TIPOVA REGIJE NUKLEOLARNE ORGANIZACIJE U BOLESNIKA S KLLPB……..…130
6.4. MEĐUSOBNA POVEZANOSTI POKAZATELJA DOBIVENIH KOMPJUTERSKOM ANALIZOM SLIKE……131
6.5. RAZLIČITI ODJELJCI TUMORSKE MASE……..…131
6.6. PROLIFERACIJSKO-KINETIČKI INDEKS (PKI)……..…132
**7. SAŽETAK**……...133
**8. SUMMARY**……....……..…135
**9. LITERATURA**……....……..136
**10. ŽIVOTOPIS**…….....160
**11. PRILOZI**

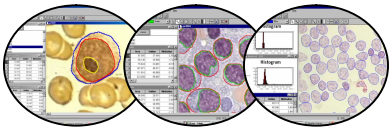


# POPIS SKRAĆENICA I POJMOVA

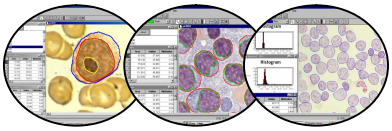
| | |
|---|---|
| *AgNOR* | *srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije* |
| *AIL* | *angioimunoblastični T-limfom* |
| *ALB* | *vrijednost albumina u serumu* |
| *ALCL* | *anaplastični limfom velikih stanica* |
| *$ALFA_2$* | *$alfa_2$ frakcija globulina* |
| *$ALFA_1$* | *$alfa_1$ frakcija globulina* |
| *ALK* | *ALK protein* |
| *AML-M7* | *megakarioblastična leukemija* |
| *AP* | *alkalna fosfataza u serumu* |
| *APSATLY* | *apsolutni broj atipičnih limfocita $x10^9$/L* |
| *APSLY* | *apsolutni broj limfocita $x10^9$/L* |
| *ATIP LY* | *ukupan postotak atipičnih limfatičnih stanica* |
| *ATLL* | *adultna T-limfocitna leukemija* |
| *TLL* | *T-stanična leukemija/limfom* |
| *ATLY* | *postotak svih atipičnih limfocita* |
| *B-KLL* | *B-kronična limfocitna leukemija* |
| *B-NHL* | *B-Ne-Hodkinov limfom* |
| *BETA* | *beta frakcija globulina* |
| *BI* | *bilirubin* |
| *BROJ-L* | *broj leukocita* |
| *Ca* | *kalcij* |
| *CD* | *klasifikacija staničnih biljega (engl. cluster of designation)* |
| *CHOP* | *terapijska shema: ciklofosfamid, adriamicin, onkovin i prednison* |
| *CIg* | *citoplazmatski imunoglobulin* |
| *CNS* | *središnji živčani sustav* |
| *Cu* | *bakar* |
| *CV* | *koeficijent varijacije* |
| *DI* | *difuzni tip infiltracije u bioptatu kosti* |
| *DLBCL* | *difuzni B-velikostanični lifmom* |
| *DNA* | *deoksi nukleinska kiselina* |
| *DTL-MJ* | *vrijeme udvostručenja broja limfocita u perifernoj krvi u mjesecima* |
| *DTM-MJ* | *vrijeme udvostručenja tumorske mase u perifernoj krvi u mjesecima* |
| *E* | *broj eritrocita $x10^{12}$/L* |
| *EBV* | *Epstein-Barrov virus* |
| *EMZL/MALT* | *ekstranodalni limfom marginalne zone tipa MALT* |
| *FAB* | *Francusko-Američko-Britanska klasifikacija akutnih leukemija* |
| *FAMP* | *terapijska shema: fudarabin* |
| *FC* | *Ne-Hodgkinov limfom folikularnog tipa* |
| *FC I* | *folikularni limfom I stupnja* |
| *FC II* | *folikularni limfom II stupnja* |
| *FCM* | *analiza na protočnom citometru (engl. flow cytometry)* |
| *FDC* | *folikularne dentritične stanice* |
| *Fe* | *željezo* |
| *FF* | *faktor pravilnosti (engl. form factor)* |
| *FFI* | *faktor izduženosti jezgre ili stanice* |
| *FISH* | *fluorescentna in situ hibridizacija* |
| *FNA* | *citološka punkcija (engl. fine needle aspiration)* |
| *$G_1$* | *presintetska faza staničnog ciklusa* |
| *GAMA* | *gama frakcija globulina* |
| *$G_o$* | *faza mirovanja staničnog ciklusa* |
| *$G_o/G_1$* | *zajednička presintetska i faza mirovanja staničnog ciklusa* |



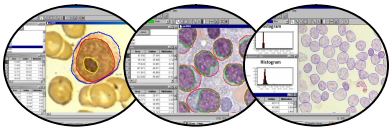
| | |
|---|---|
| *GPM* | *gigantski pravilni mjehurići* |
| *GRAN* | *postotak granulocita u koštanoj srži ili perifernoj krvi* |
| *GUMP* | *broj Gumprechtovih «sjena»/100 leukocita u perifernoj krvi* |
| *HB* | *količina hemoglobina* |
| *HCL* | *triholeukemija (engl. hairy cell leukaemia)* |
| *HCV* | *hepatitis C virus* |
| *HIPER* | *obilan celularitet koštane srži* |
| *HIPO* | *slab celularitet koštane srži* |
| *HL* | *Hodgkinov limfom* |
| *hpf* | *veliko mikroskopsko povećanje (engl. high-power microscopic field)* |
| *HTLV-1* | *HTLV-1 virus* |
| *I* | *intersticijski tip infiltracije u bioptatu kosti* |
| *I+N* | *intersticijski i nodularni tip infiltracije u bioptatu kosti* |
| *IA* | *kompjuterska ("image") analiza* |
| *IAgNOR* | *kompjuterska ("image") analiza AgNOR-a* |
| *ICM* | *kompjuterska analiza DNA - "image" DNA citometrija* |
| *Ig* | *imunoglobulin* |
| *IgD* | *D klasa imunoglobulina* |
| *IgG* | *G klasa imunoglobulina* |
| *IgM* | *M klasa imunoglobulina* |
| *IL* | *interleukin* |
| *IM* | *kompjuterska ("image") morfometrija* |
| *IOD* | *integrirani optički denzitet* |
| *JETRA-CM-RL* | *veličina jetre ispod desnog rebranog luka* |
| *K* | *kalij* |
| *KAPPA* | *izražaj lakog lanca kappa* |
| *KLL* | *tipična B-kronična limfocitna leukemija* |
| *KLL/IMC* | *kronična limfatična leukemija, varijanta s limfoplazmocitoidnom difernecijacijom* |
| *KLL/PLL* | *miješana varijanta - kronična limfocitna leukemija/prolimfocitna leukemija* |
| *KLL/MLL* | *kronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita* |
| *KLL+V* | *B-kronična limfocitna leukemija s njenim varijantama KLL/PLL i KLL/IMC* |
| *KLLPB* | *leukemijski oblik kronične limfoproliferativne bolesti* |
| *KREATIN* | *vrijednost kreatinina u serumu* |
| *KS-%ATLY* | *postotak atipičnih limfocita u koštanoj srži* |
| *KS-%ATLYUK* | *postotak ukupnih atipičnih limfocita u koštanoj srži* |
| *KS-%CB* | *postotak centroblasta u koštanoj srži* |
| *KS-%CC* | *postotak centrocita u koštanoj srži* |
| *KS-%ERITRO* | *postotak stanica eritrocitnog reda u koštanoj srži* |
| *KS-%GRAN* | *postotak stanica granulocitnog reda u koštanoj srži* |
| *KS-%LY* | *postotak limfocita u koštanoj srži* |
| *KS-%LYPL* | *postotak limfoplazmocitoidnih u koštanoj srži* |
| *KS-%LYUK* | *ukupni postotak limfatičnih stanica u koštanoj srži* |
| *KS-%PROLY* | *postotak prolimfocita u koštanoj srži* |
| *KS-%TROM* | *postotak stanica trombocitnog reda u koštanoj srži* |
| *KS-%ZARLY* | *postotak zarezanih limfatičnih stanica u koštanoj srži* |
| *KSAGBHOM* | *broj homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGBHOMINH* | *broj homogenih i inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGBHOMPR* | *broj homogenih i prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGBINH* | *broj inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGBPR* | *broj prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGBPRINH* | *broj prstenastih i inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGBUKUP* | *ukupni broj AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGINH/J* | *omjer površine inhomogenih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica koštane srži* |
| *KSAGMAHOM* | *najveća površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži* |



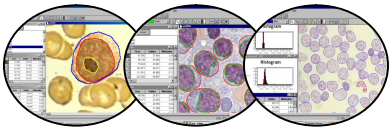
| | |
|---|---|
| KSAGMAINH | najveća površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGMAPR | najveća površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGMIHOM | najmanja površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGMIINH | najmanja površina inhomogenih AgNOR-ca limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGMIPR | najmanja površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGPHOM | prosječna površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGPINH | prosječna površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGPPR | prosječna površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSHOM | površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSHOM/J | omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSINH | površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSINH/J | omjer površine inhomogenih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSPR | površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSPR/J | omjer površine prstenastih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSUKUP | ukupna površina svih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži |
| KSAGSUKUP/J | omjer površine svih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica koštane srži |
| KS-CEL | celularitet koštane srži |
| KSDNA%>4N | % stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica s 4N koštane srži |
| KSDNA%S<P | % stanica s manjom količinom DNA od stanica u vršku DNA histograma koštane srži |
| KSDNA%S>P | % stanica s većom količinom DNA od stanica u vršku DNA histograma koštane srži |
| KSDNA%SFC | % limfatičnih stanica koštane srži u S-fazi staničnog ciklusa |
| KSDNA%SPIK | % stanica u vršku DNA histograma limfatičnih stanica koštane srži |
| KSDNADI | DNA indeks limfatičnih stanica koštane srži |
| KSHV | Kaposi sarcoma herpes virus |
| KSMAJ | površina jezgara limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMAS | površina limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMBS | širina limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMCAJ | konveksitet površine jezgara limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMCAS | konveksitet površine limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMFFIJ | faktor izduženosti jezgara limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMFFIS | faktor izduženosti limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMFFJ | faktor pravilnosti (engl. form factor) jezgre limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMFFS | faktor pravilnosti limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMLS | duljina limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMLJ | duljina jezgara limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMMAJ | najveća površina jezgara limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMMARS | najveći polumjer limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMMIJ | najmanja površina jezgara limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMMIRS | najmanji polumjer limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMOJ | opseg jezgre limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMOS | opseg limfatičnih stanica koštane srži |
| KSMSUMJ | ukupna površina jezgara limfatičnih stanica koštane srži |
| KSN/C | omjer jezgre i citoplazme limfatičnih stanica koštane srži |
| L | broj leukocita $x10^9$/L |
| LAMBDA | ekspresija lakog lanca lambda |
| LCAGBHOM | broj homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGBHOMINH | broj homogenih i inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGBHOMPR | broj homogenih i prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGBINH | broj inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGBPR | broj prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGBPRINH | broj prstenastih i inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGBUKUP | ukupni broj svih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGMAHOM | najveća površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |
| LCAGMAINH | najveća površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora |



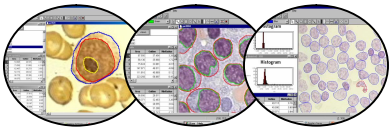
| | |
|---|---|
| *LCAGMAPR* | *najveća površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGMIHOM* | *najmanja površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGMIINH* | *najmanja površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGMIPR* | *najmanja površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGPHOM* | *prosječna površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGPINH* | *prosječna površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGPPR* | *prosječna površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSHOM* | *površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSHOM/J* | *omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSINH* | *površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSINH/J* | *omjer površine inhomogenih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSPR* | *površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSPR/J* | *omjer površine prstenastih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSUK/J* | *omjer površine svih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCAGSUKUP* | *površina svih AgNOR-a limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LC-CM-AKSILA* | *veličina aksilarnog limfnog čvora* |
| *LC-CM-AMDOM* | *veličina abdominalnog limfnog čvora* |
| *LC-CM-INGV* | *veličina ingvinalnog limfnog čvora* |
| *LC-CM-VR* | *veličina limfnog čvora na vratu* |
| *LCDNA%S<P* | *% stanica s manjom količinom DNA od stanica u vršku DNA histograma limfnog čvora* |
| *LCDNA%S>4N* | *% stanica s većom količinom DNA od stanica s 4N* |
| *LCDNA%S>P* | *% stanica s većom količinom DNA od stanica u vršku DNA histograma limfnog čvora* |
| *LCDNA%SFC* | *% stanica u S fazi staničnog ciklusa limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCDNA%SPIK* | *% limfatičnih stanica u vršku DNA histograma limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCDNADI* | *DNA indeks limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMAJ* | *površina jezgre limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMARS* | *najveća površina limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMAS* | *površina limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMBJ* | *širina jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMBRJ* | *broj jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMBS* | *širina limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMCAJ* | *konveksitet površine jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMCAS* | *konveksitet površine limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMFFIJ* | *faktor izduženosti jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMFFIS* | *faktor izduženosti limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMFFJ* | *faktor pravilnosti jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMFFS* | *faktor pravilnosti limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMLS* | *duljina limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMLJ* | *duljina jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMMARJ* | *najveći polumjer jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMMIRJ* | *najmanji polumjer jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMMIRS* | *najmanji polumjer limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMOJ* | *opseg jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMOS* | *opseg limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMSUMAJ* | *ukupna površina jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LCMN/C* | *odnos površine jezgra/citoplazma limfatičnih stanica limfnog čvora* |
| *LC-REG-UKUP* | *broj regija s povećanim čvorovima* |
| *LDH* | *vrijednost laktat dehidrogenaze u serumu* |
| *LPL* | *limfoplazmocitoidni limfom* |
| *Max* | *najveća vrijednost* |
| *MCL* | *Limfom plaštene zone (engl. mantle cell lymphoma)* |
| *Med* | *medijan* |
| *MGG* | *bojenje po May- Grűnwald Giemsi* |
| *MIN* | *najmanja vrijednost* |



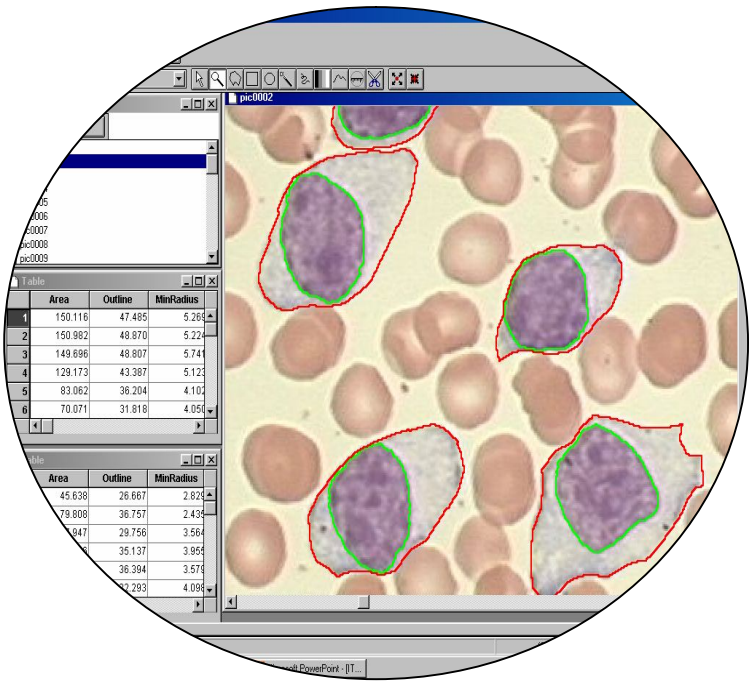
| | |
|---|---|
| *M* | *ispitanici muškog spola* |
| *MJ* | *mjeseci* |
| *M-KOMP* | *monoklonalna komponenta u elektroforezi proteina* |
| *MNM* | *mali nepravilni mjehurići (tip AgNOR-a)* |
| *MLL* | *limfom malih limfocita* |
| *MO* | *postotak monocita u perifernoj krvi* |
| *MPM* | *mali pravilni mjehurići (tip AgNOR-a)* |
| *MT* | *male točkice (tip AgNOR-a)* |
| *N* | *broj* |
| *N+D* | *nodularni i difuzni tip infiltracije u bioptatu kosti* |
| *NA* | *vrijednosti natrija* |
| *NHL* | *Non-Hodgkinov limfom* |
| *NK* | *podtip limfocita prirodnih ubojica* |
| *NK/T* | *NK/T limfom* |
| *Nly* | *broj limfocita* |
| *nl* | *nanolitar* |
| *NMZL* | *nodalni limfom marginalne zone* |
| *Ne-B-KLL* | *leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti kad se izdvoji tipična KLL* |
| *Ne-KLL+V* | *ostali leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti kad se izdvoje KLL+V* |
| *NORMO* | *uredan celularitet koštane srži* |
| *NOS* | *oni koji nisu pobliže označeni (engl. no other specified)* |
| *PC* | *protočni citometar* |
| *KLON* | *klonalnost limfatičnih stanica* |
| *PCL* | *plazma stanična leukemija* |
| *PCR* | *lančana reakcija polimeraze (engl. polimerase chaine reaction)* |
| *PDN* | *prednison* |
| *PK-%ATIPLY* | *postotak atipičnih limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PK-%ATLYUK* | *ukupni postotak atipičnih limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PK-%CB* | *postotak centroblasta periferne krvi* |
| *PK-%CC* | *postotak centrocita periferne krvi* |
| *PK-%GRAN* | *postotak granulocita periferne krvi* |
| *PK-%LY* | *postotak limfocita periferne krvi* |
| *PK-%LYPL* | *postotak limfoplazmocitoidnih stanica periferne krvi* |
| *PK-%LYUK* | *ukupni postotak limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PK-%MON* | *postotak monocita periferne krvi* |
| *PK-%PROLY* | *postotak prolimfocita periferne krvi* |
| *PK-%ZARLY* | *postotak zarezanih limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGBHOM* | *broj homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGBHOMINH* | *broj homogenih i inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGBHOMPR* | *broj homogenih i prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGBINH* | *broj inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGBPR* | *broj prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGBPRINH* | *broj inhomogenih i prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGBUKUP* | *ukupni broj svih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGMAHOM* | *najveća površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGMAINH* | *najveća površina inhomogenih AgNOR- limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGMAPR* | *najveća površina prstenastih AgNOR- limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGMIHOM* | *najmanja površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGMIINH* | *najmanja površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGMIPR* | *najmanja površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGPHOM* | *prosječna površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGPPR* | *prosječna površina prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGSHOM* | *površina homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi* |
| *PKAGSHOM/J* | *omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica periferne krvi* |



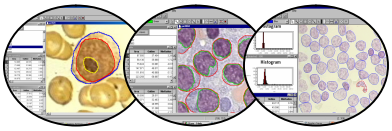
| | |
|---|---|
| PKAGSHOMINH | površina homogenih i inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKAGSINH | površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKAGSINH/J | omjer površine inhomogenih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKAGSPR | površina prstenastih AgNOR- limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKAGSPR/J | omjer površine prstenastih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKAGSUK/J | omjer površine svih AgNOR-a i jezgre limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKAGSUKUP | ukupna površina svih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi |
| PK-APSATLY | apsolutni broj atipičnih limfatičnih stanica u perifernoj krvi |
| PK-APSLY | apsolutni broj svih limfatičnih stanica u perifernoj krvi |
| PKDNA%S<P | % stanica s manjom količinom DNA od stanica u vršku DNA histograma periferne krvi |
| PKDNA%S>4N | % stanica s većom količinom DNA od limfatičnih stanica sa sadržajem DNA od 4N |
| PKDNA%S>P | % stanica s većom količinom DNA od stanica u vršku DNA histograma periferne krvi |
| PKDNA%SFC | % stanica u S fazi staničnog ciklusa limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKDNA%SPIK | postotak stanica u vršku DNA histograma periferne krvi |
| PKDNADI | DNA indeks limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKI | proliferacijsko-kinetički indeks |
| PKMAJ | površina jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMAS | površina limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMBJ | širina jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMBRJ | broj jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMBS | širina limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMCAJ | konveksitet površine jezgara limfatičnih stanica u perifernoj krvi |
| PKMCAS | konveksitet površine limfatičnih stanica u perifernoj krvi |
| PKMFFIJ | faktor izduženosti jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMFFIS | faktor izduženosti limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMFFJ | faktor pravilnosti jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMFFS | faktor pravilnosti limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMLS | dužina limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMLJ | dužina jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMMARJ | najveći polumjer jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMMARS | najveći polumjer limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMMIJ | najmanja površina jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMMIRJ | najmanja površina jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMMIRS | najmanja površina limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMN/C | odnos jezgra/citoplazma limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMOJ | opseg jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMOS | opseg limfatičnih stanica periferne krvi |
| PKMSUMAJ | ukupna površina jezgara limfatičnih stanica periferne krvi |
| PL | plazmocitom |
| PROT | proteini |
| rDNA | ribosomalna DNA |
| RNA | ribonukleinska kiselina |
| RTC | broj retikulocita/1000 eritrocita |
| SAL | subakutna leukemija |
| SD | standardna devijacija |
| SE | sedimentacija |
| SG | standardna greška |
| SGOT | aspartat-aminotranferaza |
| SGPT | alanin-aminotranferaza |
| SIg | površinski imunoglobulin |
| SKL | subkronična leukemija |
| SL- RL | veličina slezene u cm ispod rebranog luka |
| SLEZ-CM-UZV | veličina slezene u cm mjerena ultrazvukom |
| SMZL | splenični limfom marginalne zone |



| | |
|---|---|
| *SL-UZV* | *veličina slezene u cm mjerene ultrazvukom* |
| *SLVL* | *splenični limfom s viloznim limfocitima* |
| *ST* | *srednje točkice (tip AgNOR-a)* |
| *SZO* | *Svjetska zdravstvena organizacija* |
| *T-LP* | *T-limfoproliferativna bolest* |
| *TCR* | *T-stanični receptor* |
| *TdT* | *terminalna deoksinukleotidil transferaza* |
| *TIA-1* | *T-intracelularni protein* |
| *T-LGL* | *T-granularna limfocitna leukemija* |
| *TM 2* | *promjer najvećeg palpabilnog čvora u cm* |
| $TM_1$ | *drugi korjen iz apsolutnog broja limfocita u krvi* |
| $TM_3$ | *veličine jetre ili slezene ispod rebranog luka u cm* |
| *T-PLL* | *T-prolimfocitna leukemija* |
| *TR* | *trombociti* |
| *TRAP* | *tartarat rezistentna kisela fosfataza* |
| *TTM* | *ukupna tumorska masa* |
| *UIBC* | *slobodni transferin u serumu* |
| *UK-PROT* | *ukupni proteini* |
| *UREA* | *urea* |
| *VAD* | *terapijska shema: vinkristin, adriamicin i deksametazon* |
| *VNM* | *veliki nepravilni mjehurići (tip AgNOR-a)* |
| *VPM* | *veliki pravilni mjehurići (tip AgNOR-a)* |
| *VT* | *velike točkice (tip AgNOR-a)* |
| *X* | *aritmetička sredina* |
| *Ž* | *ispitanici ženskog spola* |


pic0002
Table
Area
Outline
MinRadius
150.116
47.485
150.982
48.870
149.696
48.807
129.173
43.387
83.062
36.204
70.071
31.818
Area
Outline
MinRadius
45.638
26.667
79.808
36.757
29.756
35.137
36.394

# 1. UVOD



## 1.1. KRONIČNE LIMFOPROLIFERATIVNE BOLESTI

### *1.1.1. DEFINICIJA*

Limfoproliferativne bolesti su zloćudne bolesti limfocitnog sustava koje zahvaćaju neku od staničnih linija limfocitnog sustava sa zastojem u sazrijevanju i posljedičnom akumulacijom klonalnih patoloških limfatičnih stanica u organima uključenim u limfatični sustav.[1]

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) njihovo razvrstavanje moguće je na osnovu kliničkih, morfoloških, laboratorijskih, imunoloških, citogenetskih, molekularnih i kinetičkih parametara.[2] Po tipu raspodjele tumorske mase mogu se svrstati u leukemije i limfome.[3] Prema stupnju malignosti te morfološkim karakteristikama u visoko maligne (akutne leukemije i velikostanične limfome) te niskomaligne (kroničnu limfocitnu leukemiju i limfome malih stanica). Postoje međutim, brojni prijelazni oblici u svim pravcima. U jednom slučaju od leukemija prema limfomima i obrnuto: s različitim stupnjevima infiltracije koštane srži, periferne krvi i limfatičnih organa. U drugom slučaju postoje prijelazni oblici što se tiče malignosti: od akutnih prema kroničnim limfocitnim leukemijama, odnosno malignim limfomima niskog do visokog stupnja malignosti.[4]

Izuzevši akutnu limfatičnu leukemiju, svi ostali limfocitni leukemijski oblici svrstavaju se u kronične leukemijske limfoproliferativne bolesti (KLLPB) odnosno diseminirane oblike zrelih B ili T-limfocitnih neoplazmi, kao izrazito heterogenu grupu varijabilne kliničke slike.[5,6,7,8,9] Ako uzmemo u obzir da abnormalne limfoidne stanice cirkuliraju u perifernoj krvi i koštanoj srži u bolesnika s Ne-Hodgkin limfomima (NHL), češće niskog, ali i visokog stupnja malignosti s različitim stupnjevima infiltracije koštane srži, periferne krvi i limfnih čvorova te različitu morfološku sliku u različitim odijelcima tumorske mase, nameće se pitanje brižljive evaluacije parametara kako bi se tip bolesti što preciznije definirao što je preduvjet za racionalan terapijski pristup.

### *1.1.2. HISTOGENEZA B i T-LIMFATIČNOG SUSTAVA KAO OSNOVA ZA RAZUMIJEVANJE NASTANKA MALIGNIH ENTITETA*

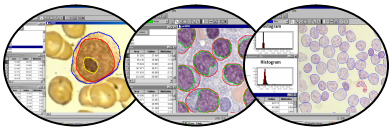
Naziv limfocit se najčešće upotrebljava sa značenjem imunološki (imunopoetski) usmjerene stanice, jer velika većina stanica limfoidne morfologije pripada histogenetski imunopoezi. Isto se tako izvedeni pojmovi limfoidni (sličan limfocitu), limfatični ili limfocitni sustav često upotrebljavaju u širem značenju te označavaju imunopoezu,

imunološki sustav i organe koji pretežno pripadaju imunološkom sustavu. Iako većina imunopoetskih stanica ima limfocitnu morfologiju u mirovanju, stanice koje proliferiraju odgovaraju blastima. Dok prethodnici T i B-stanica, zrele T i B-stanice, T i B-stanice s pamćenjem kao i funkcionalno aktivne T-stanice imaju u mirovanju morfologiju limfocita, funkcionalno aktivne B-stanice su plazma-stanice. Prema tome, imunopoetske stanice mijenjaju morfologiju ovisno o proliferativnom statusu, diferencijacijskoj usmjerenosti i stupnju sazrijevanja. Povijesno gledano, dugo se smatralo da su limfociti krajnje diferencirane, inertne stanice nepoznate funkcije, a imunologija se razvijala bez znanja o staničnoj podlozi imunoloških reakcija.[3,10]

Zrele B neoplazme imitiraju stupnjeve normalne B-stanične diferencijacije te se podrazumijeva da su normalni stanični stadiji baza njihove klasifikacije i nomenklature.[11] Normalna B-limfatična diferencijacija počinje s prekusorskim B-limfoblastom, koji se diferencira u zrele površinske imunoglobulin (engl. *surface immunoglobulin* - SIg) pozitivne naivne B-stanice klase M (IgM) i klase D (IgD).[12] Naivne B stanice su mali limfociti u mirovanju koji cirkuliraju u krvi, ulaze u primarne limfoidne folikle i plaštenu zonu folikla (takozvani recirkulirajući B limfociti).[13] Tumori sastavljeni od ovih stanica su uglavnom morfološki nisko maligni, klinički indolentni, raširenі i leukemični, sastavljeni od cirkulirajućih limfocita sličnim normalnim naivnim B-stanicama. Dvije najčešće neoplazme koje korespondiraju s CD5 pozitivnim B-stanicama su B-KLL i većina slučajeva limfoma plaštene zone.[14,15]

U doticaju s antigenom naivne B-stanice podliježu blastičnoj transformaciji, proliferaciji i sazrijevanju u IgG ili IgA protutijela-secernirajuće plazma stanice i limfocite s pamćenjem (engl. *memory lymphocytes*).[16,17] Blastične stanice nastale od naivnih B-limfocita koje su došle u doticaj s antigenom ulaze u primarne centre klijanja i zajedno s folikularnim dentritičnim stanicama (FDS) formiraju germinativne centre. Transformirane blastične stanice koje se nazivaju centroblastima u većini slučajeva nemaju SIg, prestaju izražavati BCL2 protein (inhibitor apoptoze) te tako njihovi progeni postepeno umiru kroz apoptozu. Centroblasti izražavaju CD10 i BCL6 protein („nuclear zinc-finger“ transkripcijski faktor) kao i centrociti (ali ne i naivni B-limfociti, limfociti s pamćenjem, limfociti plaštene zone i plazma stanice).[18]

U germinativnom centru, somatske mutacije zbivaju se u imunoglobulin promjenljivoj (engl. *immunoglobulin variable - IGV*) regiji gena, koje promijene afinitet za reakciju antigen-antitijelo.[19] To rezultira intraklonalnom raznolikošću u populaciji stanica nastalih



od svega nekoliko prekursora. Neke stanice skreću iz IgM u IgG ili IgA produkciju. *BCL6* gen također podliježe somatskoj mutaciji u germinativnom centru.[20] Genska mutacija *IGV* gena s intraklonalnom raznolikošću je obilježje stanica centra folikla, a obje mutacije *BCL6* i *IGV* regije gena služe kao biljezi stanica koje su prošle germinativni centar. Većina velikostaničnih limfoma je sastavljena od stanica koje imaju dijelom karakteristike centroblasta i imaju mutaciju *IGV* regije i često *BCL6* gena u skladu s deriviranim stanicama koje su bile izložene germinativnom centru. Stanice Burkittova limfoma su pozitivne na *BCL6* i imaju mutaciju *IGV* gena kao i germinativne blastične stanice. I Burkittov limfom i difuzni B-velikostanični limfom (engl. *diffuse large B cell lymphoma* - DLBCL) odgovaraju proliferativnim stanicama s tendencijom klinički agresivnih tumora.

Neke zrele B neoplazme imaju karakteristične genetske abnormalnosti koje su važna obilježja biološke slike i mogu se koristiti u diferencijalnoj dijagnozi. To su t(11;14) u limfomu plaštene zone, t(14;18) u folikularnim limfomima, t(8;14) u Burkittovu limfomu i t(11;18) u MALT (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*) limfomu. Prva tri stanična proonkogena kontrolirani su od imunoglobulinskog promotora na kromosomu 14q, a rezultiraju u konsekutivnoj aktivaciji gena, dok t(11;18) rezultira fuzijskim proteinom. U limfomima centra folikla (FC) i MALT limfomima ta translokacija rezultira posljedičnom ekspresijom apoptotičnih gena (*BCL6* ili $API_2$), a kod limfoma plaštene zone i Burtittovom limfomu ekspresijom gena udruženih s proliferacijom (cyclin D1 ili *MYC*).[2]

Diferencijacija u smjeru razvitka T-limfocitnog sustava započinje pro-T-stanicom koštane srži. Te su stanice TdT (terminalna deoksinukleotidil transferaza) pozitivne, CD34+, CD7+ i izražavaju CD3ε protein u citoplazmi CD3/T-staničnog receptora. Ulaskom u timus pod utjecajem mikrookoliša i timusnih hormona pro-T-stanice proliferiraju te sazrijevaju od stupnja ranog timocita, preko timocita, do stupnja zrelog timocita, neovisno o antigenu.[1]

Zreli T-stanični limfomi izražavaju imunofenotipske karakteristike posttimičnih T-limfocita. Postoje dvije različite klase T-stanica: αβ T-stanice i γδ T-stanice. Razlikovanje je bazirano na strukturi T-staničnog receptora (TCR). αβ T-stanice se dijele u dva glavna podtipa (CD4+ i CD8+). CD4+ stanice ili pomagačke (engl. *helper*) T stanice, a najvažnije su u sekreciji citokina, dok su CD8+ stanice ili citotoksične stanice najviše uključene u citotoksične imune reakcije. CD4 pozitivne stanice se dijele u dva glavna tipa: Th1 stanice koje luče interleukin 2 (IL-2) i interferon γ. Th2 stanice

luče IL-4, 5, 6 i 10. Osim toga Th1 stanice pomažu ostalim T stanicama i makrofagima, dok Th2 stanice pomažu B stanice u njihovoj produkciji antitijela. Njihovi različiti imuni profili još uvijek nisu u relaciji s podtipovima leukemija i limfoma. Postoji svega nekoliko studija gdje subklasifikacija T-limfoma korelira sa specifičnim profilom citokine ili kemokine ekspresije.[2]

Međutim, većina je kliničkih manifestacija T-staničnih limfoma u vezi sa citokinskom ekspresijom malignih stanica [hiperkalcemija udružena s adultnom T-limfocitnom leukemijom (ATLL) je vezana za sekreciju faktora koji aktivira osteoklaste, a hemofagocitni sindrom prisutan u mnogim T i NK neoplazmama je udružen sa sekrecijom i citokina i kemokina]. NK-stanice dijele neke funkcije i biljege s T-stanicama (CD2, CD7, CD8, CD56, CD57), a pozitivne su na ε lanac CD3. NK stanice i citotoksične T-stanice izražavaju citotoksične proteine (perforin, granzim B i T intracelularni protein-TIA-1). Oba antigena se također vide i u neoplastičnim citotoksičnim T i NK varijantama.[2,21,22]

### *1.1.3. SZO KLASIFIKACIJA ZRELIH B i T-LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLESTI*

#### 1.1.3.1. Zrele T-limfoproliferativne bolesti

Zrele T-limfocitne neoplazme potječu od zrelih ili posttimičnih T stanica. Budući su NK-stanice usko povezane i dijele neke imunofenotipske i funkcionalne karakteristike s T limfocitima ove dvije neoplazme razmatraju se zajedno.[23]

SZO klasifikacija T i NK neoplazmi uključuje morfologiju, imunofenotip, genetiku i kliničku sliku. Klinička slika igra važnu ulogu u subklasifikaciji ovih tumora, naročito u odsutnosti specifičnosti ostalih parametara. T-stanični limfomi pokazuju veliku morfološku različitost. Stanični sastav varira od malih limfocita s minimalnom atipijom do velikih stanica anaplastične slike: anaplastični limfom velikih stanica (ALCL), ATLL i nazalni NK/T limfom. Međutim, postoje i preklapanja morfoloških slika između različitih entiteta. Mnogi ekstranodalni citotoksični T limfomi i NK limfomi imaju sličan izgled uključujući prominentnu apoptozu, nekrozu i angioinvaziju.[24] U suprotnosti s B-staničnim limfomima specifični imunofenotip nije udružen s većinom T-staničnih podtipova. Bez obzira što je neki od antigena uobičajeno udružen sa specifičnim entitetom, to ne znači da je tumor-specifičan. CD30 je univerzalna karakteristika ALCL, ali se nalazi i u ostalim T i B limfomima, u Hodgkinovu limfomu (HL) te nekim

embrionalnim tumorima. Slično, CD56 je karakterističan za nazalni tip NK/T limfoma, ali se može naći i u ostalim T limfomima kao i u plazma-staničnim neoplazmama. Isto tako unutar jednog entiteta može se vidjeti varijacija u imunofenotipu (hepatosplenični γδ T fenotip, iako manjina slučajeva mogu eksprimirati αβ T derivaciju). Na kraju, nasuprot B limfomima nema standardnih imunofenotipskih biljega za klonalnost, a nalaz aberantnog imunofenotipa može pomoći u dijagnozi malignosti.[25]

Za sve, klinička slika igra glavnu ulogu u subklasifikaciji T i NK staničnih neoplazmi. Klinički se mogu podijeliti u:[26]

*Leukemijske ili diseminirane T-limfoproliferativne bolesti*

- T-prolimfocitna leukemija, T-PLL
- T-granularna limfocitna leukemija, T-LGL
- agresivna NK leukemija
- adultna T leukemija/limfom, ATLL

*Ekstranodalne T-limfoproliferativne bolesti*

- ekstranodalni NK/T limfom, nazalni tip
- enteropatski T limfom
- hepatosplenični T limfom
- subkutani panikulitisu sličan T limfom

*Kožne T-limfoproliferativne bolesti*

- blastični NK limfom
- mycosis fungoides/Sezary sindrom
- primarni kožni ALCL

*Nodalne T-limfoproliferativne bolesti*

- NOS, periferni T limfom (engl. *no other specified*)
- Angioimunoblastični T limfom, AIL
- Anaplastični limfom velikih stanica, ALCL

Nasuprot nemogućnosti određivanja klonalnosti imunofenotipski, molekularna genetska studija lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) za preuredbu gena za T-stanični receptor (TCR) je važna za određivanje klonalnosti T staničnih proliferacija.[27,28] Specifične genske abnormalnosti nisu nađene za mnoge T i NK neoplazme. Jedan od rijetkih je ALCL, koji je jasno udružen s translokacijom t(2;5). Molekularna patogeneza većine T i NK neoplazmi ostaje za daljnja istraživanja.[2]

Klasifikacija zrelih B-staničnih neoplazmi temelji se na korištenju svih dostupnih informacija koji definiraju pojedine entitete.[29,2] Morfologija i fenotipizacija su dovoljni za dijagnozu u većini slučajeva. Imunofenotipizacija se koristi u diferenciranju limfoma malih stanica: miješane kronične limfocitne i prolimfocitne leukemije (KLL/PLL), FC, MALT limfoma te plazmocitoma (PL) od reaktivnih procesa. Isto tako, koristi se u diferenciranju proliferativnih tipova limfoma kao što su difuzni DLBCL i Burkittov limfom od nelimfoidnih tumora, te subklasifikaciji morfološki sličnih limfoma.[30] Općenito, nema jednog specifičnog biljega za bilo koji entitet. Kombinacija morfološke slike i kombinacije antigena je neophodna za korektnu dijagnozu. U nekim slučajevima osnovna je klinička slika, kao u slučajevima limfoma marginalne zone te medijastinalnog velikostaničnog limfoma. Molekularna genetska analiza i citogenetska analiza te FISH mogu biti od pomoći u diskutabilnim slučajevima, kako u slučajevima određivanja klonalnosti u malostaničnim neoplazmama u razlikovanju prema reaktivnim procesima, tako i u detekciji specifičnih kromosomskih abnormalnosti potrebnih za subklasifikaciju kao npr. t(11;14), t(14;18) i t(8;14).

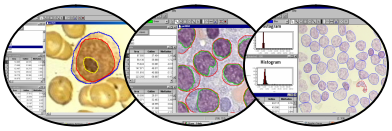
SZO klasifikacija dijeli B-limfocitne neoplazme na osnovu njihovih kliničkih prezentacija na:[2]

#### *1.1.3.2.1. Predominantno diseminirane zrele B-limfocitne neoplazme*

Ovi tumori se uglavnom prezentiraju infiltracijom koštane srži, s/bez infiltracije periferne krvi i solidnih tkiva kao što su limfni čvorovi i slezena. Uključuju kroničnu limfatičnu leukemiju (KLL), limfoplazmocitni limfom/Waldenstrőmovu makroglobulinemiju (LPL), triholeukemiju (engl. *hairy cell leukemia* - HCL), splenični limfom marginalne zone (engl. *splenic marginal zone lymphoma* **-** SMZL) i plazmocitom. Diseminirane zrele B-limfatične neoplazme su uglavnom indolentne.

#### *1.1.3.2.2. Primarno ekstranodalni B-limfomi*

Ovi limfomi se uvijek prezentiraju u ekstranodalnim područjima, a opaža se njihova bliskost normalnim limfoidnim stanicama specifičnim za ekstranodalne imunološke reakcije. U ove B-stanične neoplazme spada ekstranodalni limfom marginalne zone (EMZL/MALT).



*1.1.3.2.3. Predominantno nodalni B-limfomi*

Dvije B stanične neoplazme predstavljaju glavninu nodalnih malostaničnih lifmoma: limfomi centra folikla i limfomi plaštene zone. Rjeđe se susreće treći tip, nodalni marginalne zone B stanični limfom, koji pokazuje sličnost s ostalim indolentnim nodalnim limfomima. Ove se neoplazme tipično prezentiraju kao raširene bolesti infiltrirajući prvenstveno limfni čvor, često koštanu srž, jetru i slezenu, a mogu zahvaćati i ostala ekstranodalna područja kao dio diseminirane bolesti, rijetko kao lokalizirana ekstranodalna bolest.

### *1.1.4. BIOLOŠKO PONAŠANJE ZRELIH B-LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLESTI*

Klinička prezentacija, biološko podrijetlo i odgovor na terapiju zrelih B-limfoidnih neoplazmi je izuzetno heterogeno, te je zbog toga korektna dijagnoza važan preduvjet terapije. Prepoznavanje novih entiteta može biti put za istraživanje terapijskih opcija. Bolesnici s indolentnim limfomima kao KLL/MLL, FC i tinjajući plazma stanični mijelom, mogu se pratiti bez terapije dok ne postanu simptomatski, s medijanom promatranja 5 ili više godina.

Ostali indolentni limfomi, kao MALT tip, koji se razlikuje od ostalih malostaničnih limfoma svojom morfologijom, imunofenotipom i kliničkom slikom, mogu se liječiti lokalnom radioterapijom. Naročito je važno otkriće da je u vezi s *Helicobacter pylori* infekcijom te može biti potencijalno liječiv antibioticima i eradikacijom *Helicobacter pylori*.[31]

Limfom plaštene zone (engl. *mantle cell lymphoma* - MCL), kombinacija je slike indolentnog i agresivnog limfoma, ne odgovara na uobičajenu kemoterapiju, klinički je agresivan te je preživljenje oko 3 godine. Izdvajanje iz skupine malostaničnih limfoma i precizna dijagnoza je važna za traženje novih potencijalno efikasnijih terapija.

Folikularni limfomi predstavljaju 80% nisko malignih limfoma.

Dva agresivna B-stanična limfoma, bilo da se radi o nodalnoj i ekstranodalnoj bolesti, mogu biti lokalizirani ili diseminirani:

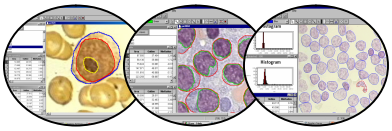
- Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL) je globalno čest limfom, a čini oko 30% svih limfoma. Može zahvaćati limfni čvor ili ekstranodalna područja, tipično se

prezentira kao brzo rastuća masa. Važan klinički podtip DLBCL je primarni medijastinalni (timični) DLBCL, kao agresivni tumor mlađih odraslih s blagom predominacijom u žena. Ostale posebne entitete čini i primarni limfom u izljevima (primarni efuzijski limfom) i primarni intravaskularni limfom. Morfološke varijante DLBCL su: centroblastični, imunoblastični, difuzni B velikostanični limfom bogat T limfocitma i anaplastični, iako je klinička relevantnost diskutabilna. DLBCL su uglavnom heterogeni te se klinički faktori rizika uzimaju kao polazište za terapiju. Oko 40% se liječi agresivnom kemoterapijom. Mnogo se očekuje od molekularne dijagnostike u identifikaciji različitih genskih ekspresija i identifikaciji novih podtipova s različitom prognozom što bi moglo imati i ulogu u pronalaženju novih terapijskih modela. Monoklonalna antitijela protiv B-staničnih površinskih antigena, kao npr. CD20, sve više se koristi u terapiji bolesnika s B-staničnim neoplazmama. Bliska suradnja morfologa i kliničara je ključna za budući napredak u terapiji ovih neoplazmi.

- Drugi visoko agresivni tumor srednje velikih proliferirajućih B stanica je Burkittov limfom s tipičnom translokacijom kao odraz deregulacije c-*MYC* onkogena. Neki limfomi imaju morfološku sliku između tipičnog Burkittovog limfoma i DLBCL ranije nazivan Burkittu sličan limfom. SZO klasifikacija ovu kategoriju smatra kao podtip Burkittovog limfoma: tzv. atipični Burkitt/Burkittu-sličan limfom.[2] Većina kliničkih podtipova ovog limfoma uključuje endemični, sporadični i udružen s imunodeficijencijom.

### *1.1.5. DISEMINIRANE (LEUKEMIJSKE) ZRELE B-LIMFOPROLIFERATIVNE BOLESTI*

Razvojem imunologije 70-tih godina nastaju nova saznanja o imunom sustavu s posljedičnim prepoznavanjem mnogih staničnih tipova. Limfoproliferativne bolesti karakterizira klonalna proliferacija i akumulacija neoplastičnih B limfocita u perifernoj krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima.[32] Nešto rjeđe zahvaćena je i T-stanična populacija. B i T kronične limfoproliferativne bolesti definirane su morfološkim izgledom te membranskim i intracitoplazmatskim fenotipom neoplastičnih stanica.[33,34,35] U obje stanične linije (T i B) dobro su definirani klinički entiteti u kojima se mogu prepoznati infiltracija koštane srži i periferne krvi. Suptilne morfološke i fenotipske različitosti ovih bolesti sa specifičnom kliničkom slikom, staničnom biologijom i podrijetlom nastoje se što preciznije i bolje definirati.[4] Morfološka analiza koštane srži, razmaza periferne krvi i limfnog čvora, upotpunjena fenotipom i citogenetskom analizom može biti baza za



kliničku praksu te daljnja istraživanja. Za razliku od citomorfologije i citokemijskih karakteristika upotrijebljenih za klasifikaciju akutnih leukemija (izuzev AML-M7) reproducibilnost klasifikacije kroničnih B i T leukemija zahtjeva determinaciju membranskog fenotipa neoplastičnih stanica kao i opis njihove morfološke slike.[36]

### 1.1.5.1. B-kronična limfocitna leukemija /B-limfom malih limfocita (KLL/MLL)

#### *1.1.5.1.1. Definicija i stanično podrijetlo*

KLL je limfoproliferativna bolest karakterizirana ekspanzijom malignog klona B-stanica u perifernoj krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima, za razliku od MLL, identičnog morfologijom i fenotipom s KLL, ali bez leukemijske slike. Tipični oblik KLL-a pokazuje morfologiju malih zrelih limfocita u perifernoj krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima, izmiješanih s prolimfocitima i parimunoblastima (pseudofolikli), ekspresiju CD5 i CD23 antigena,[37,38,39,40] te nisko proliferativnu sposobnost.[41,42,43] Manje od 10% B KLL-a su CD5 negativne, za razliku od većine B prolimfocitnih leukemija (B PLL). Mnogi slučajevi KLL predstavljaju naivne pregerminativne B limfocite s imunofenotipom CD5+, CD23+, IgM+, IgD+ koji se nalaze u perifernoj krvi, primarnim foliklima i plaštenoj zoni folikla.[44] Slučajevi koji pokazuju mutacije *IGV* regije mogu korespondirati sa CD5+, IgM+ perifernim postgerminativnim B-limfocitima s pamćenjem.

#### *1.1.5.1.2 Epidemiologija i klinička slika*

B-KLL predstavlja 90% kroničnih limfoidnih leukemija, a 6,7% NHL-a se klasificira kao MLL/KLL.[37] Većina bolesnika su u dobi iznad 50 godina (medijan 65), pretežno su to muškarci (2:1). Kriteriji za dijagnozu B-KLL su infiltracija koštane srži te apsolutna limfocitoza u perifernoj krvi prema većini autora $>5x10^9$/L (prema SZO $>10x10^9$/L). Dijagnoza je moguća uz limfocitozu u perifernoj krvi manju od $10x10^9$/L, ako su morfologija i imunofenotip tipični za B-KLL. Limfni čvorovi, jetra i slezena su tipično infiltrirani, ali mogu biti zahvaćeni i ekstranodalna područja kao koža, dojka itd. Dijagnoza B-MLL (ali ne i B-KLL) je u odsutnosti infiltracije koštane srži i periferne krvi.[1] Većina bolesnika je asimptomatska, ali neki se prezentiraju s autoimunom hemolitičkom anemijom, infekcijama, hepatosplenomegalijom, limfadenopatijom i ekstranodalnim infiltratima. U nekih bolesnika može se naći u elektroforezi imunoglobulina mali monoklonalni vršak, tzv. M-komponenta.[3] Zbog velike

varijabilnosti tijeka bolesti značajni doprinos i prekretnicu u kliničkom istraživanju B-KLL predstavlja klasifikacija u kliničke stadije.[45,46,47]

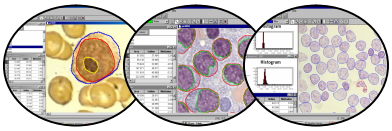
Klasifikacija prema Rai-u i suradnicima iz 1975. godine je jednostavna, lako primjenjiva i pruža prognostičku diskriminaciju među pojedinim skupinama, ali ima i određene slabosti. Klasifikacija je pretežno kvalitativna, bez kvantifikacije pojedinog parametra, pa ne omogućuje procjenu progresivnosti, niti je prikladna za procjenu terapijskog odgovora. Veličinu tumora procjenjuje indirektno preko prisutne insuficijencije mijelopoeze, što onemogućuje da se npr. u terapiji rabi za procjenu terapijskog antitumorskog efekta neovisno o eventualnoj toksičnosti terapije *(tablica 1*).[48]

Tablica 1. Klinička klasifikacija B-KLL u stadije (Rai i sur. 1975)[48]

| **Stadij** | **0** | **1** | **2** | **3** | **4** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Limfocitoza*** | + | + | + | + | + |
| **Limfni čvorovi** | | + | +/- | +/- | +/- |
| **Hepato ili splenomegalija** | | | + | +/- | +/- |
| **Anemija** | | | | + | +/- |
| **Trombocitopenija** | | | | | + |

* *limfocitoza od najmanje $15x10^9$ uz najmanje 40%-tnu infiltraciju koštane srži*

Zbog navedenih ograničenja predložene su i novije klasifikacije koje su također u kliničkoj uporabi. Međutim, klasifikacija u A, B i C-stadij (Binet, 1981) *(tablica 2)* nije nadvladala osnovne nedostatke Raieve klasifikacije, a ne pokazuje prednost u prognostičkoj efikasnosti.



Tablica 2. Klinička klasifikacija B-KLL u stadije (Binet i sur. 1981)[48]

| | |
|---|---|
| **Stadij A** | limfocitoza u krvi (<15x$10^9$/L) uz 40% ili veću limfocitozu u KS. Odsustvo anemije i trombocitopenije i zahvaćenost manje od tri regije čvorova* |
| **Stadij B** | kao gore, s tri ili više zahvaćenih regija limfnih čvorova, slezene ili jetre; odsutnost anemije i trombocitopenije |
| **Stadij C** | kao gore, uz anemiju (HB<110g/L za muškarce ili <100g/L za žene) ili trombocitopenija (<100x$10^9$/L) bez obzira na broj zahvaćenih limfnih regija |

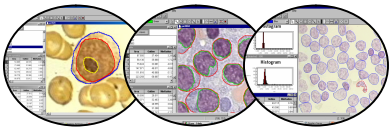
*Legenda: HB - hemoglobin, * svaka cervikalna, aksilarna ili ingvinalna regija bez obzira na jednostranost ili obostranost, slezena i jetra računaju se kao jedno zahvaćeno područje*

Noviju generaciju kliničkih klasifikacija predstavlja određivanje ukupne tumorske mase (TTM), a osniva se na činjenici da je tumorska masa u B-KLL raspoređena u tri osnovna odjeljka: 1. koštanoj srži i perifernoj krvi ($TM_1$), 2. limfnim čvorovima ($TM_2$) i 3. slezeni ($TM_3$). U svakom od odjeljaka veličina tumorske mase može varirati. Zbog toga je za svaki od odjeljaka odabran jednostavan pokazatelj veličine. Kao predstavnik prvog odjeljka izabran je drugi korijen iz apsolutnog broja limfocita u nanolitru (ili broja x $10^9$), za drugi odjeljak predstavnik je promjer najvećeg palpabilnog limfnog čvora u centimetrima, a za treći palpabilna slezena u centimetrima. Zbroj iznosa u sva tri odjeljka predstavlja zbroj ukupne tumorske mase (*tablica 3).*[49]

Tablica 3. Kriteriji za procjenu ukupne tumorske mase (TTM)[48]

| **Odjeljak** | **Predstavnik** | **Veličina** |
|---|---|---|
| **$TM_1$ - koštana srž i periferna krv** | broj limfocita (periferna krv) | √ Nly/nl |
| **$TM_2$ - limfni čvorovi** | promjer najvećeg palpabilnog čvora | cm |
| **$TM_3$ - slezena i jetra** | palpabilna slezena od lijevog rebranog luka | cm |
| **TTM** | | $TM_1$+$TM_2$+$TM_3$ |

*Legenda: Nly - apsolutan broj limfocita; nl – nanolitar; TTM - ukupna tumorska masa*



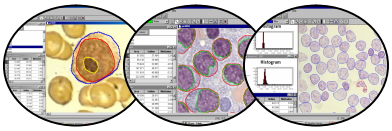
Određivanje ukupne tumorske mase razlikuje se od drugih klasifikacija po tome što:

- mjeri veličinu tumora neovisno o insuficijenciji mijelopoeze
- omogućuje nepristrano procjenjivanje raspodjele tumorske mase u organizmu i
- ima karakter kontinuirane varijable te može poslužiti za procjenu progresije s jedne strane i procjenu terapijskog efekta s druge strane, tj. može se primijeniti i u toku liječenja i neovisno o simptomima insuficijencije mijelopoeze procjenjivati antitumorski učinak terapije. Navedene značajke čine TTM klasifikaciju osobito prikladnom za planiranje i praćenje kliničkih pokusa u KLL te se sve češće rabi u međunarodnim pokusima i rutinskoj praksi.

Klinička slika bolesti je kriterij za terapiju. Bolesnici koji se prezentiraju s uznapredovalim stadijem podliježu kemoterapiji. Prevladava mišljenje kako bolesnici u ranom stadiju bolesti bez evidentne progresije ili simptoma bolesti, treba pošteditи od primjene antitumorske terapije.[50] Han i suradnici[51] uvode termin *benigna monoklonalna B-stanična limfocitoza* za kliničku sliku nultog stadija (0 KLL) bez progresivnosti. Montserrat[52] na temelju prognostičkih faktora: vremena udvostručenja tumorske mase (DTL) i vremena udvostručenja broja limfocita (DTM) za 0 stadij govori o tinjajućoj (engl. smoldering) KLL.

Hipogamaglobulinemija se viđa u više od 50% bolesnika s KLL-om. Najčešće prvo zahvaća imunoglobuline klase A (IgA), zatim klase M (IgM) i klase G (IgG), dok 5-10% bolesnika ima mali monoklonalni vršak (M-komponentu) u gama (y), rjeđe beta (β) frakciji globulina. Paraproteinemija je češća ako je bolest u transformaciji. Povišena razina $\beta_2$ mikroglobulina je udružena s lošijom prognozom. Povišene serumske vrijednosti laktat dehidrogenaze (LDH) se nalaze u manje od 10% bolesnika pri dijagnozi i može biti posljedica autoimune hemolitičke anemije ili transformacije u velikostanični limfom (Richterov sindrom).

Transformacija u visoko maligni limfom se naziva Richterov sindrom. Dešava se u oko 3,5% slučajeva, uglavnom u DLBCL (3%) ali su prisutni i slučajevi slični Hodgkinovu limfomu (HL) u oko 0,5%. KLL može biti i udružen s HL, koji se može prezentirati raspršenim Reed-Sternbergovim stanicama ili njenim varijantama u pozadini KLL ili s diskretnim područjima klasičnog HL ili se pak radi o HL kao varijanti Richterova



sindroma. [53,54] Molekularna genska analiza sugerira da u 50% slučajeva agresivnog malignog limfoma nastaje transformacijom originalnog neoplastičnog klona, ali se ne isključuje niti sekundarna neoplazma koja nije u vezi s osnovnom bolesti.

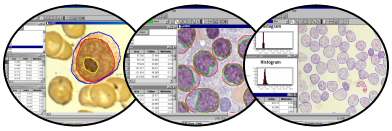
Klinička slika je uglavnom indolentna, medijan preživljenja je do 7 godina. Lošiju prognozu imaju viši klinički stadiji (Rai III-IV, Binet B-C) te visoka ukupna tumorska masa (TTM) te KLL/PLL. Osim toga loši prognostički pokazatelji su i difuzna infiltracija koštane srži, brzo udvostručenje broja limfocita (<12 mjeseci), trisomija 12, delecija 11q22-23, atipični imunofenotip (CD38+), abnormalnost *TP53* gena te prisustvo ZAP-70 proteina.

### *1.1.5.1.3. Morfologija*

U koštanoj srži i perifernoj krvi, stanice KLL-a su mali limfociti grudaste strukture kromatina, oskudne svijetle do blijedo bazofilne citoplazme pravilnih rubova. Nukleoli su slabo vidljivi ili nedostaju. Gumprechtove „sjene“ se tipično vide u razmazu periferne krvi. Udio prolimfocita u tipičnim KLL-ima (veće stanice s prominentnim nukleolima) je uglavnom manja od 2%. Povećani broj je udružen s agresivnijom kliničkom slikom kao i *P53* abnormalnosti i trisomijom kromosoma 12. Varijanta KLL-a s povećanim brojem prolimfocita, miješana kronična limfocitna leukemija i prolimfocitna leukemija (KLL/PLL) je definirana ako ih se nađe 10-55% u perifernoj krvi.[4] Neki tipovi KLL karakterističnog imunofenotipa pokazuju atipičnu morfologiju s različitom proporcijom atipičnih limfocita. Ponekad, male limfoidne stanice pokazuju umjerenu nepravilnost jezgara ili binukleirane limfocite.[55] Diferencijalno dijagnostički problema može biti i prema MCL.[56] Neki slučajevi imaju limfoplazmocitoidnu morfologiju, CD38 pozitivni imunofenotip i agresivniju kliničku sliku.[57]

Infiltracija koštane srži može biti nodularna, intersticijska, difuzna ili kombinirana. Pseudofolikli su rjeđi nego u limfnom čvoru, ali se mogu naći. Tip infiltracije koštane srži korelira s prognozom. Nodularni i intersticijski uzorak se uglavnom nalazi u ranim fazama bolesti, a uznapredovala bolest je udružena s difuznim tipom infiltracije.[58,59]

Povećani limfni čvorovi u bolesnika s KLL-om pokazuju izbrisanu strukturu s psudofolikularnom slikom. Predominantne stanice su male, nešto veće od normalnih limfocita, grudaste strukture kromatina, uglavnom okruglih jezgara. Pseudofolikli su građeni od malih, srednje velikih do velikih stanica. Prolimfociti su srednje velike



stanice, nježnije strukture kromatina i malih nukleola. Paraimunoblasti su srednje do velike stanice, okruglih ili ovalnih jezgara, raspršene strukture kromatina, centralnih nukleola i blijedo bazofilne citoplazme. Veličina pseudofolikla i broj paraimunoblasta varira od slučaja do slučaja. U slezeni je jako infiltrirana bijela, ali je zahvaćena i crvena pulpa, dok se pseudofolikli mogu naći, ali manji nego u limfnom čvoru.

#### *1.1.5.1.4. Imunofenotip*

Tipična KLL izražava slabi ili blijed površinski IgM ili IgD, pozitivna je na CD5, CD19, CD20 (slabo), CD79a, CD23, CD43, CD11c (slabo), dok su CD10 i cyclin D1 negativni. FMC7 i CD79b su u pravilu negativni ili slabo izraženi. Imunofenotip limfocita periferne krvi važan je u diferencijalnoj dijagnozi između KLL i ostalih B-staničnih leukemija.[60] Slučajevi s mutiranom *IGV* regijom gena mogu biti CD38 pozitivni. Citoplazmatski Ig (CIg) se može naći u oko 5% slučajeva. CD23- i cyclin D1+ razlikuje KLL/MLL od limfoma plaštene zone, međutim neki slučajevi KLL su CD23- ili djelomično pozitivni, isto kao što rijetki slučajevi MCL mogu djelomično izražavati CD23. Neki slučajevi tipične KLL morfologije mogu imati odsustvo tipičnog imunofenotipa (CD5- ili CD23-, FMC7+ ili CD11c+ ili snažno sIg+ ili CD79b+). Kako je fenotip danas temelj dijagnoze, ovi slučajevi se izdvajaju iz tzv. „tipične“ B-KLL, ali ostaju unutar sindroma KLL.

#### *1.1.5.1.5. Genetika*

Teški i laki lanci imunoglobulina su preuređeni (engl. *rearranged*). Neki nalazi ukazuju na postojanje dva različita tipa KLL-a definirane mutacijskim statusom *IGV* gena koji imaju prognostičko značenje i različitu kliničku sliku:

- 40-50% ne pokazuju somatske mutacije, a odnose se na naivne pregerminativne B limfocite s imunofenotipom CD5+, CD23+, IgM+, IgD+ koji se nalaze u perifernoj krvi, primarnim foliklima i plaštenoj zoni folikla,[61]
- 50-60% imaju somatske mutacije prisutne kod postgerminativnih B-limfocita, odnosno B-limfocita s pamćenjem.[62]

ZAP70 [70-kD *zeta chain* (TCR)-*associated protein*] je vrlo jaki biljeg *IGV* mutacijskog statusa i snažan prognostički faktor.[63] Prisustvo nemutiranog *IGV* gena jako je udruženo s izražavanjem ZAP-70, koji je snažan prediktor potrebe za terapijom u bolesnika s KLL-om.[64]

U oko 80% slučajeva prisutan je abnormalni kariotip dokazan FISH analizom. Trisomija 12 je nađena u oko 20% slučajeva, delecija 13q14 u preko 50% slučajeva. Slučajevi s trisomijom 12 uglavnom nemaju mutiranu *IGV* regiju gena, dok je kod 13q14 često regija mutirana.[65] Delecija 11q22-23 se nalazi u oko 20% slučajeva, delecija 6q21 ili 17p13 (p53 lokus) u 5-10% slučajeva.[66,67] t(11;14) i $BCL_1$ pregradnja gena je opisana ali u većini slučajeva radi se o leukemijskoj slici limfoma plaštene zone, a ne o tipičnoj B-KLL.[68]

### 1.1.5.2. B-prolimfocitna leukemija

#### *1.1.5.2.1. Definicija i stanično podrijetlo*

B-prolimfocitna leukemija (B-PLL) je bolest B prolimfocita prisutnih u perifernoj krvi (>55%), koštanoj srži i slezeni.[4] Isključeni su slučajevi transformacije KLL i KLL/PLL. Podrijetlo je nepoznatog B staničnog stadija.

#### *1.1.5.2.2. Epidemiologija i klinička slika*

Vrlo je rijetka (1% limfocitnih leukemija), većina bolesnika je starija od 60 godina (medijan 70 g.), češća je u muškaraca (1,6:1).[69] Prezentira se splenomegalijom bez povećanja perifernih limfnih čvorova, hiperleukocitozom (>$100 \times 10^9$/L), anemijom i trombocitopenijom (u oko 50% slučajeva), u nekih bolesnika i malom M-komponentom u serumu. B-PLL slabije reagira na terapiju od B-KLL i ima kraće preživljenje.[55]

#### *1.1.5.2.3. Morfologija*

Većina cirkulirajućih stanica u perifernoj krvi su prolimfociti (>55%, uglavnom >95%), srednje velike (dva puta veće od limfocita), okrugle limfoidne stanice vidljivih nukleola i uglavnom dobro ograničene blijedo bazofilne citoplazme.[4] Koštana srž je difuzno infiltrirana sličnim stanicama kao i crvena i bijela pulpa slezene.

#### *1.1.5.2.4. Imunofenotip*

Prolimfociti snažno izražavaju površinski IgM+/-IgD te B-stanične antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a i b, FMC7), CD5+ u 1/3 slučajeva i CD23 negativne.[33]

*1.1.5.2.5. Genetika*

Ig gen je klonalno preuređen. Citogenetske abnormalnosti zahvaćaju 14q32, u 20% slučajeva prisutna je t(11;14) iako je u tim slučajevima teško reći da li se radi o leukemičnoj slici blastičnog MCL.[70] Delecija 11q23 i 13q14 je također nađena FISH analizom. Abnormalnost *TP53* gena je nađena u 53% slučajeva.[2,71]

1.1.5.3. Limfoplazmocitni limfom - Waldenströmova makroglobulinemija

*1.1.5.3.1. Definicija i stanično podrijetlo*

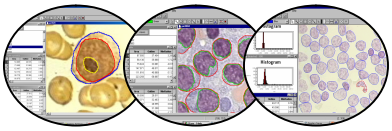
Limfoplazmocitni limfom je neoplazma malih B limfocita, plazmocitoidnih limfocita (limfoplazmocitoidnih stanica) i plazma stanica koje uglavnom infiltriraju koštanu srž, limfne čvorove i slezenu, a periferna krv također može biti zahvaćena. Podrijetla je B-limfocita stimuliranih prema diferencijaciji u plazma stanice (vjerojatno korespondirajući s primarnim imunim odgovorom na antigen) ili B-stanica postgerminativnog centra koje podliježu somatskoj mutaciji.

*1.1.5.3.2. Epidemiologija i klinička slika*

Vrlo je rijedak i predstavlja 1,5% svih nodalnih limfoma, pojavljuje se u odrasloj životnoj dobi (medijan 63 godine) sa slabom predominacijom u muškaraca (53%).[20] Neke studije ga dovode u vezu s hepatitis C virusom (HCV), a opisuje se i regresija nakon antiviralne terapije. Klinička slika je tipično indolentna (medijan preživljenja preko 5 godina). Uznapredovala dob, citopenija, neuropatija i gubitak na težini su loši prognostički pokazatelji, kao i transformacija u DLBCL (koja je izuzetno rijetka).[57] U većini slučajeva prisutna je M-komponenta (IgM>3gm/dl) s hiperviskoznim sindromom i krioglobulinemijom (10-30%).[72] Plazmocitoidne/citne varijante ostalih limfoma su isključene.

*1.1.5.3.3. Morfologija*

Neoplastične stanice čine raniji spomenuti mali limfociti, limfoplazmocitoidne stanice (obilnije bazofilne citoplazme, s jezgrama sličnim limfatičnim stanicama) i plazma stanice s ili bez PAS+ intranuklearnih inkluzija (Ducherova tjelešca). Mogu biti prisutni rijetki imunoblasti, epiteloidne stanice i/ili mastociti. Slezena je difuzno infiltrirana bez



pseudofolikla, koštana srž nodularno i/ili difuzno intersticijalno. Maligne stanice se mogu naći u perifernoj krvi, ali je leukocitoza manja nego kod KLL (često ide s leukopenijom). Mnogi B-stanični limfomi: B-KLL/MLL, MZL i FC pokazuju sazrijevanje u plazmocitoidne ili plazma stanice koje sadrže CIg. Međutim, limfoplazmocitoidnim limfomom (LPL) se smatra samo onaj tumor kojem nedostaje slika ostalih limfoma (pseudofolikli, maligni folikli, stanice marginalne zone ili monocitoidne B-stanice).

*1.1.5.3.4. Imunofenotip*

Stanice imaju površinske i citoplazmatske imunoglobuline, uglavnom $IgM^+$ (ponekad IgG, rijetko IgA), IgD-, pozitivne B-stanične antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a), CD5-, CD10-, CD23-, CD43+/- i CD38+. Odsustvo CD5 i jaka citoplazmatska ekspresija imunoglobulina pomaže u razlikovanju od B-KLL.

*1.1.5.3.5. Genetika*

Prisutna je pregradnja gena za lake i teške lance imunoglobulina s prisutnim somatskim mutacijama u *IGV* regiji gena što sugerira da se radi o B-stanicama nakon antigene stimulacije. Translokacija t(9;14) i pregradnja *PAX-5* gena (specifičnog aktivacijskog gena B-stanične diferencijacije) je prisutna u oko 50% slučajeva kao i u ostalih limfoma s plazmocitoidnom diferencijacijom.[2]

1.1.5.4. Splenični limfom marginalne zone (SMZL)

*1.1.5.4.1. Definicija i stanično podrijetlo*

Predstavlja B neoplazmu sastavljenu od malih limfocita i većih stanica periferne marginalne zone uključujući razbacane transformirane blaste u bijeloj i crvenoj pulpi slezene, spleničnim hilarnim limfnim čvorovima i koštanoj srži, a mogu se naći i u perifernoj krvi kao vilozni limfociti. Predstavljaju limfome postgerminativnog centra nepoznatog diferencijacijskog stadija.

*1.1.5.4.2. Epidemiologija i klinička slika*

Rijetka je bolest (<1% limfoidnih neoplazmi), većina bolesnika je starija od 50 godina s podjednakom zastupljenošću oba spola.[73] Klinički se prezentira splenomegalijom,

rijetko infiltracijom jetre, ali bez povećanja perifernih limfnih čvorova. Ponekad je prisutna autoimuna trombocitopenija ili anemija. Ekstranodalna infiltracija nije uobičajena, 1/3 bolesnika ima malu M-komponentu u serumu bez značajne hiperviskoznosti ili hipergamaglobulinemije.[74] Tijek bolesti je indolentan,[75] transformacija u DLBCL je moguća kao i u ostalim indolentnim B-staničnim neoplazmama. Diferencijalno dijagnostički treba isključiti ostale malostanične B-stanične limfome (KLL, MCL, FC, LPL). Nodularna infiltracija koštane srži isključuje HCL, ali tip infiltracije koštane srži nije dovoljan za isključenje ostalih malostaničnih limfoma, te je imunofenotipizacija ključna u dvojbenim slučajevima bez nalaza viloznih limfocita u perifernoj krvi.[2]

#### *1.1.5.4.3. Morfologija*

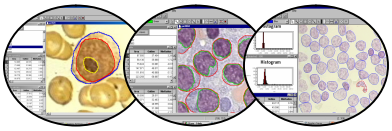
Morfološku sliku čine mali okrugli limfociti i srednje velike stanice, rahlije strukture kromatina i obilnije svjetlije citoplazme, koji odgovaraju stanicama marginalne zone raspršene s transformiranim blastima. Epiteloidne stanice mogu biti prisutne u limfatičnim agregatima, može biti prisutna i plazmocitoidna diferencijacija kao i nakupine plazma stanica u centrima folikla bijele pulpe slezene. U limfnim čvorovima hilusa slezene prisutni su nodularni infiltrati istih stanica bez evidentne marginalne zone, dok je infiltracija koštane srži nodularna i intersticijalna. Ako su limfomske stanice prisutne u perifernoj krvi, često (iako ne uvijek) imaju kratke, polarne izdanke. Neki mogu poprimiti plazmocitoidni izgled.[76]

#### *1.1.5.4.4. Imunofenotip*

Tumorske stanice imaju površinske IgM i IgD, CD20+, CD79a+,CD5-, CD10-, CD23-, CD43-, cyclin D1-.[77,78] Odsustvo CD5 i CD43 pomaže u isključivanju KLL i MCL, odsustvo CD103 u isključivanju HCL, a odsustvo CD10 odvaja ih od FC.

#### *1.1.5.4.5. Genetika*

Prisutna je pregradnja gena za lake i teške lance Ig i mnogi slučajevi imaju somatske mutacije. Gubitak alela kromosoma 7q21-32 opisan je u oko 40% slučajeva. Disregulacija *CDK6* gena lociranog na 7q21 je opisana u nekoliko slučajeva SMZL, dok *BCL2* pregradnja i t(14;18) nije opisana. $BCL_1$ pregradnja, t(11;14) i cyclin D1 su opisani u nekoliko slučajeva, no u tim slučajevima nije jasno da li je isključen MCL.[79]



Trisomija 3 i t(11;18) uobičajena u ekstranodalnim limfomima marginalne zone nije uobičajena u SMZL. Trisomija 3 je opisana u 17% slučajeva SMZL, za razliku od t(11;18) koja nije opisana.[2,80,81]

### 1.1.5.5. Triholeukemija (HCL)

#### *1.1.5.5.1. Definicija i stanično podrijetlo*

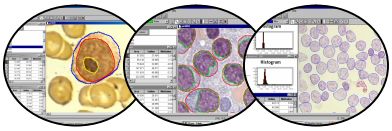
Triholeukemija je neoplazma malih limfoidnih stanica, ovalnih jezgara i obilne vlasaste citoplazme koji difuzno infiltriraju koštanu srž i crvenu pulpu slezene, a nalaze se i u perifernoj krvi u malom broju. Podrijetlo stanica je perifernih B limfocita postgerminativnog centra, nepoznatog stadija.

#### *1.1.5.5.2. Epidemiologija i klinička slika*

Rijetka bolest (2% limfoidnih neoplazmi), predominantno srednje životne dobi prema starijim odraslim (medijan 55 g.) s većom učestalošću u muškaraca (5:1).[82,83] Tumorske stanice mogu infiltrirati jetru, a ponekad limfne čvorove i kožu. Rijetko su prisutni veliki intraabdominalni čvorovi koji govore u prilog transformacije. Klinički se prezentira sa splenomegalijom i citopenijom te malim brojem cirkulirajućih trihocita. Ne reagira na uobičajenu limfomsku terapiju, ali terapija interferonom-alfa 2b, deoxycoformycinom, 2-chlorodeoxyadenosinom ili splenektomija dovodi do dugotrajnih remisija.[84,85]

#### *1.1.5.5.3. Morfologija*

Trihociti (engl. *hairy cell*) su srednje velike stanice ovalnih jezgara, homogene strukture kromatina, a nukleoli ili nedostaju ili su sitni. Citoplazma je obilna, svijetlo plava s vlasastim izdancima, a ponekad sadrži diskretne vakuole. Stanice su izrazito difuzno pozitivne na tartarat rezistentnu kiselu fosfatazu (TRAP). Aspirati koštane srži su hipocelularni zbog fibroze kosti te postoji opasnost od zabune prema aplastičnoj anemiji. Imunocitokemijski dokaz B-limfocita uz DBA.44 i TRAP+ limfocite usmjerava dijagnozu prema HCL. U slezeni je infiltracija prisutna u crvenoj pulpi uz atrofičnu bijelu pulpu, u limfnim čvorovima parakortikalno, a u jetri sinusoidalno.[86,87]



*1.1.5.5.4. Imunofenotip*

Tumorske stanice su Sig+ (M+/-D, G ili A), izražavaju B-antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a, ali ne CD79b), CD5-, CD10-, CD23-, CD11c+(jako), CD25+(jako), FMC7+,CD103+. TRAP+ u većini slučajeva. Nema jednog biljega koji je specifičan za razlikovanje HCL od ostalih B-staničnih leukemija. CD22, CD11c, CD25, FMC7 jednako kao i TRAP mogu biti prisutni i u drugim bolestima osim HCL. Jaka pozitivnost ovih biljega udruženih s CD103, zajedno s karakterističnom morfološkom slikom govori u prilog ovog entiteta.[88]

*1.1.5.5.5. Genetika*

Prisutna je preuredba gena za lake i teške lance imunoglobulina. Iako postoji mali broj studija izgleda da je prisutna i mutacija *IGV* gena udružena s postgerminativnim limfatičnim stanicama. Nisu opisane specifične kromosomske abnormalnosti, cyclin D1 je prisutan u 50-75% slučajeva, ali ne izgleda da je udružen s t(11;14) niti *BCL1* pregradnjom.[2,89]

1.1.5.6. Varijanta triholeukemije

Vrlo je rijetka bolest, sa slikom koštane srži i slezene kao u tipične HCL, ali su cirkulirajući trihociti okruglih ili ovalnih jezgara s prominentnim nukleolima (slično prolimfocitima) i umjereno bazofilnom viloznom citoplazmom. Prisutna je leukocitoza ($50x10^9$/L), stanice su B-fenotipa (uglavnom sIgG), ali bez antigena tipičnih za triholeukemiju, kao npr CD25. Ponekad su i CD103 i TRAP negativni. Diferencijalno dijagnostički treba isključiti SMZL i B-PLL.[90]

1.1.5.7. T-prolimfocitna leukemija (T-PLL)

*1.1.5.7.1. Definicija i stanično podrijetlo*

T-PLL je agresivna T leukemija karakterizirana proliferacijom malih do srednje velikih limfocita, koji infiltriraju perifernu krv, koštanu srž, limfne čvorove, jetru, slezenu i kožu. Nepoznatog podrijetla, T-stanice su zrelog (posttimičnog) imunofenotipa. Jaka pozitivnost CD7, koekspresija CD4 i CD8 te slaba membranska ekspresija CD3 govori

u prilog T-PLL nastale iz T-stanica intermedijalnog stupnja diferencijacije između kortikalnih timocita i perifernih krvnih T-limfocita.

*1.1.5.7.2. Epidemiologija i klinička slika*

Rijetka je (2% slučajeva malostaničnih limfocitnih leukemija u odraslih iznad 30 godine života).[91] Klinički se prezentira splenomegalijom i generaliziranom limfadenopatijom, infiltracijom kože u oko 20% bolesnika (bez eritrodermije), a u malom postotku ide uz izljeve (uglavnom pleuralne). Često je prisutna anemija i trombocitopenija te hiperleukocitoza (>100x$10^9$/L). Serumski imunoglobulini su normalni bez M-komponente. HTLV-1 je uvijek negativan. Bolest je progresivna, medijan preživljenja je manji od jedne godine, iako su opisani i indolentni slučajevi.

*1.1.5.7.3. Morfologija*

U razmazu periferne krvi nalaze se male do srednje velike limfoidne stanice bez granula u bazofilnoj citoplazmi, ovalnih ili blago nepravilnih jezgara i vidljivih nukleola. U 25% slučajeva stanice su male i nukleol nije vidljiv svjetlosnim mikroskopom (varijanta malih limfocita).[92] U malog broja bolesnika (5%) jezgre su izrazito nepravilne, cerebriformne (cerebriformna ili Sezary-like varijanta).[93] Uobičajena morfološka slika je s citoplazmatskim izdancima ili pupovima. Koštana srž je infiltrirana difuzno istim stanicama, ali je dijagnoza teška samo na osnovu histologije koštane srži. U 20% slučajeva prisutni su kožni infiltrati. Pokazuje gustu infiltraciju crvene i bijele pulpe slezene, a limfne čvorove infiltrira difuzno, predominantno u parakortikalnoj regiji. Brojne su endotelijalne venule također infiltrirane malignim stanicama.

*1.1.5.7.4. Imunofenotip*

T prolimfociti su periferne T-stanice TdT-, CD1a-, CD2+, CD3+, CD7+, membranska ekspresija CD3 može biti slaba. U 60% bolesnika stanice su CD4+, CD8-, u 25% je prisutna koekspresija CD4+ i CD8+, dok su 15% CD4- a CD8+. *TCR γ* i *β* su klonalno preuređeni.

*1.1.5.7.5. Genetika*

Vrlo česta kromosomska abnormalnost u T-PLL je inverzija kromosoma 14 q21 i q32 (80%), a u 10% slučajeva t(14;14)(q11;q32). Abnormalnosti kromosoma 8, t(8;8)(p11-

12;q12) i trisomija 8q nađene su u 70-80% slučajeva.[94] Nađene su i druge kromosomske abnormalnosti: del 12p13, del 11q23, t(X;14)(q28;q11), također je zahvaćen *TCRαβ* lokus na 14q11 s MTCP1 genom koji je homolog s *TCL1* na Xq28.[95] *MTCP1* i *TCL1* imaju onkogena svojstva i oba mogu inducirati T leukemiju (CD4-CD8+) u transgeničnih miševa nakon 15 sati inkubacije.[2,96]

### 1.1.5.8. T leukemija velikih granuliranih limfocita (T-LGL)

#### *1.1.5.8.1. Definicija i stanično podrijetlo*

Leukemija predstavlja heterogenu bolest karakteriziranu nalazom (>6 mjeseci) povišenog broja velikih granuliranih limfocita u perifernoj krvi, uglavnom između 2-20x$10^9$/L bez jasno prepoznatog uzroka. Predstavljaju T periferne limfocite, CD8+ tipa, podtipa Tγδ- limfocita koji vrlo rijetko izražavaju (TCR)γδ.

#### *1.1.5.8.2. Epidemiologija i klinička slika*

T-LGL predstavlja 2-3% svih malostaničnih limfatičnih leukemija. Osim periferne krvi zahvaća koštanu srž, jetru i slezenu, a vrlo rijetko limfne čvorove. Većina slučajeva ima indolentnu kliničku sliku. Umjerena neutropenija s/bez anemije je česta pojava, 60% bolesnika je bez simptoma kod dijagnoze.[97] Blaga anemija može biti posljedica aplazije crvene loze. Umjerena splenomegalija je glavni fizikalni nalaz iako se može naći reumatoidni artritis, prisustvo autoprotutijela, cirkulirajući imuni kompleksi i hipergamaglobulinemija.[98]

#### *1.1.5.8.3. Morfologija*

Predominantne stanice u perifernoj krvi i koštanoj srži su veliki limfociti obilne citoplazme sa sitno zrnatim azurofilnim granulama. Granule imaju karakterističnu ultrastrukturnu sliku i sadrže brojne proteine koji igraju ulogu u citolizi kao perforin i granzim B. Nema slaganja o nivou limfocitoze u perifernoj krvi. Reaktivna limfocitoza je obično <5x$10^9$/L, dok leukemija predstavlja apsolutnu limfocitozu >5x$10^9$/L.[99] Međutim, kod dijagnoze T-LGL, limfocitoza se kreće između 2-20x$10^9$/L, a infiltracija koštane srži je varijabilna: uglavnom intersticijska, rijetko nodularna, a limfociti često čine manje od 50% celularnih elemenata.

*1.1.5.8.4. Imunofenotip*

Slučajevi morfološki slični T-LGL ali s NK imunofenotipom (CD3-, TCRαβ-) se klasificiraju u NK bolesti. LGL ima zreli T imunofenotip. Prema predominantnim biljezima mogu se klasificirati u: uobičajenu varijantu (80%) slučajeva: CD3+, TCRαβ+, CD4-, CD8+ te rijetke varijante (CD3+, TCRαβ+, CD4+,CD8-; CD3+, TCRαβ+, CD4+ i CD8+ te CD3+, TCRαβ+ dok CD4 i CD8 ekspresija nije dobro definirana). [100] CD11b, CD56 i CD57 su različito izraženi: CD57 je uglavnom izražen u uobičajenom tipu.

*1.1.5.8.5. Genetika*

TIA-1 je uglavnom pozitivan. Prisutna je klonalna preuredba *TCR* gena,[101] većinom je preuređen *TCRβ* gen ali može biti preuređen i *TCRγ*.[102] Nema unikatne kariotipske abnormalnosti iako se mogu naći translokacije u malom broju slučajeva.[103] LGL izražava Fas (CD95) i Fas ligande. Fas ligandi se nalaze na visokoj razini u serumu bolesnika. LGL stanice su međutim rezistentne na Fas induciranu apoptozu što je posljedica defekta CD95 apoptotičnog puta.[104]

1.1.5.9. Adultna T-leukemija/limfom (ATLL)

*1.1.5.9.1. Definicija i stanično podrijetlo*

ATLL je periferna T neoplazma sastavljena od visoko pleomorfnih limfoidnih stanica. Predstavljaju periferne T CD4+ limfocite različitih stadija aktivacije.

*1.1.5.9.2. Epidemiologija i klinička slika*

Bolest je obično diseminirana. Većina bolesnika se prezentira s infiltracijom limfnih čvorova i periferne krvi. Broj cirkulirajućih malignih stanica ne korelira sa stupnjem infiltracije koštane srži što sugerira kako se leukemijske stanice regrutiraju iz drugih organa, kao npr. kože. Kako je to sistemska bolest, osim slezene zahvaća i ekstranodalna područja: kožu (>50%), pluća, jetru, gastrointestinalni i centralni živčani sustav.[105] Klinički se prezentira u nekoliko oblika: akutni, kronični i tinjajući.[106] Progresija kronične i tinjajuće varijante je u oko 25% slučajeva, ali uglavnom nakon dužeg perioda. Pretežno je to bolest odraslih (medijan 55 g.), s nešto većom učestalosti u muškaraca (1,5:1). HTLV-1 je uzročno povezan s ATLL ali sam nije

dovoljan da uzrokuje malignu transformaciju.[107] Međutim, dodatne genetske alteracije sticane kroz vrijeme, rezultiraju pojavom leukemije. Geografska distribucija bolesti je usko vezana za prevalenciju HTLV-1 u populaciji (Japan, Karibi i dijelovi Centralne Afrike).

#### *1.1.5.9.3. Morfologija*

U akutnom i limfomatoznom podtipu neoplastične limfoidne stanice su srednje do velike prisutnog nuklearnog pleomorfizma. Kromatin je grubo grudast, s distinktnim a samo ponekad prominentnim nukleolima. Neoplastične stanice su uglavnom polilobulirane i ponekad izgledaju poput cvijeta, izrazito bazofilne citoplazme. Gotovo uvijek se nađe mali udio stanica poput blasta s transformiranim jezgrama raspršenog kromatina. Mogu biti prisutne izrazito velike, gigantske stanice konvolutnih ili cerebriformnih jezgara. Rijetki slučajevi mogu biti sastavljeni od malih atipičnih limfocita izraženog nuklearnog pleomorfizma. Veličina stanica ne korelira s kliničkom slikom.[108] Limfni čvorovi u nekim slučajevima mogu imati leukemijski uzorak infiltracije s nalazom malignih stanica u dilatiranim sinusima. Upalna pozadina je rijetka uz prisustvo eozinofilije.[109] U kroničnoj i tinjajućoj varijanti neoplastične stanice su uglavnom male s minimalnom citološkom atipijom. Reed-Sternberg-nalik stanice i velike stanice lobuliranih ili konvolutnih jezgara su EBV pozitivni B limfociti koji izražavaju CD30 i CD15 antigene.[2,110]

#### *1.1.5.9.4. Imunofenotip*

Tumorske stanice izražavaju T stanične antigene: CD2+,CD3+,CD5+,CD7-. Većina su CD4+,CD8-, rijetki slučajevi CD4-, CD8+ ili CD4+ i CD8+. CD25+ je prisutan u svim slučajevima. Velike transformirane stanice mogu biti CD30+, ali su uvijek ALK negativne.[111]

#### *1.1.5.9.5. Genetika*

Integrirani HTLV-1 klon je prisutan u svim slučajevima,[112] a *TCR* gen je klonalno preuređen.[113]

Prezentiraju se u ekstranodalnim područjima, a opaža se njihova bliskost normalnim limfoidnim stanicama specifičnim za ekstranodalne imunološke reakcije.

### 1.1.6.1. Ekstranodalni B-limfom marginalne zone (MALT)

#### *1.1.6.1.1. Definicija i stanično podrijetlo*

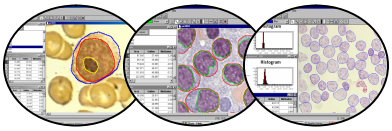
EMZL/MALT-limfomi su ekstranodalni limfomi morfološki heterogenih malih B-stanica koje uključuju stanice marginalne zone (slične centrocitima), stanice monocitoidnog izgleda, male limfocite i pojedinačne imunoblaste ili centroblastima slične stanice. Infiltrati se nalaze u marginalnoj zoni reaktivnih B-staničnih folikla i šire se u interfolikularnoj regiji. U epitelnom tkivu, neoplastične stanice tipično infiltriraju epitel, formirajući limfoepitelne lezije. Podrijetla su postgerminativnog centra, marginalne zone.

#### *1.1.6.1.2. Epidemiologija i klinička slika*

MALT limfomi čine preko 50% primarnih limfoma želudca, pojavljuju se uglavnom u starijih bolesnika s blagom predominacijom u žena. U mnogim slučajevima im je prethodila kronična upala, a često i autoimune bolesti kao odraz akumulacije ekstranodalnog limfatičnog tkiva: kronični gastritis udružen s *Helicobacter pylori*, Sjőgrenov sindrom ili Hashimotov tireoiditis.[114] Tanko i debelo crijevo su tipično zahvaćeni u tzv. imunoproliferativnoj bolesti tankog crijeva. Ostale uobičajene lokalizacije ovog tipa limfoma su: pluća, glava i vrat, orbite, koža, štitnjača i dojka.

#### *1.1.6.1.3. Morfologija*

EMZL/MALT sadrži morfološki heterogene B limfocite uključujući stanice marginalne zone slične centrocitima, stanice monocitoidnog izgleda, male limfocite uz pojedinačne stanice poput centroblasta ili imunoblasta. Ako se velike transformirane stanice tipa centroblasta i imunoblasta nalaze kao solidna proliferacija, tumor se klasificira kao DLBCL na bazi MALT-a. Mogu se naći i plazma stanice. U epitelnim tkivima tipično infiltriraju epitel formirajući limfoepitelne lezije.[115]



*1.1.6.1.4. Imunofenotip*

Tumorske stanice tipično izražavaju IgM, rjeđe IgA ili IgG i pokazuju restrikciju lakih lanca imunoglobulina što je važno u diferencijalnoj dijagnozi prema benignim infiltratima. Imunofenotip im je: CD20+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD23-, CD43+/-, CD11c+/-.

*1.1.6.1.5. Genetika*

Prisutna je preuredba gena za lake i teške lance sa somatskim mutacijama varijabilne regije. U većini slučajeva prisutna je trisomija 3 (60%) i t(11;18) (25-50%). Nedavna analiza t(11;18) pokazuje fuziju apoptoza-inhibitor gena *$API_2$* u nov gen 18q21 nazvan *MLT* gen.[116,117]

*1.1.7. PREDOMINANTNO NODALNI B-LIMFOMI*

Prezentiraju se kao diseminirane bolesti koje primarno infiltriraju limfne čvorove, ali je uobičajena i infiltracija koštane srži, jetre i slezene. Često zahvaćaju ostala ekstranodalna područja kao dio diseminirane bolesti, a vrlo rijetko se pojavljuju kao lokalizirana ekstranodalna bolest. Većina slučajeva otpada na dvije B stanične neoplazme: folikularni limfom i limfom plaštene zone. Treći tip, nodalni marginalne zone B-stanični limfom je rijedak, ali je po prirodi bolesti sličan ostalim indolentnim nodalnim limfomima.

1.1.7.1. Nodalni B limfomi marginalne zone (NMZL)

1.1.7.1.1. *Definicija i stanično podrijetlo*

Primarni NMZL su morfološki slični ekstranodalnim ili spleničnim limfomima, ali bez evidentnog nalaza ekstranodalne ili splenične bolesti. Podrijetla su marginalne zone B-fenotipa nodalnog tipa.

1.1.7.1.2. *Epidemiologija i klinička slika*

Vrlo su rijetki (1.8% svih limfoma). Zahvaćaju periferne limfne čvorove, povremeno koštanu srž i perifernu krv.[118]

*1.1.7.1.3. Morfologija*

Marginalna zona i interfolikularna područja limfnog čvora su infiltrirani postgerminativnim stanicama sličnim centrocitima, monocitoidnim B limfocitima ili malim limfocitima uz nešto stanica sličnih centroblastima i imunoblastima.[119]

*1.1.7.1.4. Imunofenotip*

Većinom su slični ekstranodalnim limfomima marginalne zone iako su opisani i slučajevi IgD+ CD 43-, slično kao splenični MZL.

*1.1.7.1.5. Genetika*

Iako nema dovoljno studija, t(11;18) i trisomija 3 udružena s ekstranodalnim limfomima marginalne zone nije česta.[2,120]

1.1.7.2. Folikularni limfomi (FCL)

*1.1.7.2.1. Definicija i stanično podrijetlo*

Podrijetla su stanica centra folikla (zarezanih stanica tipa centrocita i nezarezanih stanica tipa centroblasta) koji imaju dijelom folikularnu (nodularnu) sliku.

*1.1.7.2.1. Epidemiologija i klinička slika*

Čine oko 35% svih limfoma u odrasloj dobi. Najčešće zahvaćaju limfne čvorove, ali i slezenu, koštanu srž, perifernu krv i Waldeyerov prsten. Zahvaćenost ekstranodalnih područja (gastrointestinalni trakt, meka tkiva, koža) više su posljedica širenja bolesti nego primarna sijela. Često se dijagnosticiraju sa zahvaćanjem koštane srži (40%) i periferne krvi.[121]

*1.1.7.2.3. Morfologija*

Većina limfoma ima predominantno folikularnu sliku. Neoplastični folikli su slabo ograničeni i često nedostaje plaštena zona. Uzorak se opisuje kao folikularni (>75% folikularni), folikularni i difuzni (25-75% folikularni) ili minimalno folikularni (<25%

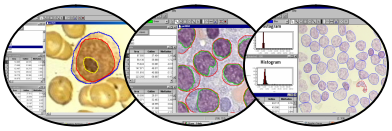
folikularni). Većina limfoma je sastavljena od dva tipa stanica koje se normalno nalaze u germinativnom centru: malih do srednje velikih zarezanih stanica, oskudne citoplazme tzv. centrocita i velikih transformiranih stanica okruglih ili ovalnih jezgara, retikularne strukture kromatina s 2-3 nukleola uz jezgrinu membranu, bazofilne citoplazme tzv. velikih nezarezanih stanica odnosno centroblasta. U nekim slučajevima centroblasti mogu biti hiperkromni, nepravilnih ili lobuliranih jezgara. Tipično, predominantne stanice su centrociti. Centroblasti su uvijek prisutni, ali su često u manjini. Ovisno o broju centroblasta u histološkom uzorku na velikom povećanju – 40x (hpf – engl. *high-power microscopic field*) dijele su u tri stupnja: stupanj I (0-5 centroblasta/hpf), stupanj II (6-15 centroblasta/hpf) i stupanj III (>15 centroblasta/hpf). Opisane su i varijante difuznih limfoma centra folikla sastavljene od centrocita i centroblasta, imunofenotipa tipičnog za limfome centra folikla (FCL – engl. *follicle centre lymphoma*).[2,122]

#### *1.1.7.2.4. Imunofenotip*

Tipičan fenotip je Sig+ (IgM+/-, IgD ili rijetko IgA), Bcl 2+, Bcl 6+, CD10+, CD5-, CD43- uz pozitivne B stanične biljege: CD19, CD20, CD22 i CD79a.[123] BCL2 protein pomaže u razlikovanju neoplastičnih od reaktivnih folikularnih stanica, ali ne i u razlikovanju folikularnih od ostalih tipova nisko malignih B- limfoma koji također izražavaju BCL2 protein.[124] CD10 ekspresija je jača u folikularnim nego interfolikularnim malignim stanicama.[125]

#### *1.1.7.2.5. Genetika*

Prisutna je preuredba gena za lake i teške lance. Svi slučajevi folikularnih limfoma pokazuju citogenetske abnormalnosti. Najčešća je t(14;18) koja uključuje preuredbu *BCL2* gena (70-95%). Rijetki slučajevi imaju t(2;18). U slučajevima s t(14;18), koja je jedina abnormalnost u samo 10% slučajeva, kod ostalih su prisutni dodatni lomovi, a najčešće zahvaćaju kromosome 1, 2, 4, 5, 13 i 17 ili dodatno kromosome X, 7, 12 ili 18. Delecije ili ostale alteracije kromosoma 9p koje zahvaćaju p 15 i p 16 lokuse gena opisuju se u folikularnim limfomima koji se transformiraju u DLBCL.[2,126,127]



### 1.1.7.3. Limfom plaštene zone (MCL)

#### *1.1.7.3.1. Definicija i stanično podrijetlo*

Limfomi plaštene zone su B-stanične neoplazme sastavljene od monomorfnih malih do srednje velikih limfatičnih stanica, nepravilnih jezgara, koji morfološki podsjećaju na centrocite (zarezane stanice centra folikla) ali ipak imaju manje nepravilnu jezgrinu membranu. Podrijetla su B-stanica plaštene zone ali je precizan stanični tip nepoznat.

#### *1.1.7.3.2. Epidemiologija i klinička slika*

Limfomi plaštene zone čine oko 3-10% svih NHL-a.[128] Pri dijagnozi su najčešće prisutni povećani limfni čvorovi, jetra i slezena (često izrazito povećana) i infiltracija koštane srži (50%) te periferne krvi (25%). Ostala zahvaćena ekstranodalna područja su gastrointestinalni trakt (30%) i Waldeyerov prsten.

#### *1.1.7.3.3. Morfologija*

Prevladava slika malih do srednje velikih limfatičnih stanica, nepravilnih jezgara sličnih centrocitima, umjereno raspršenog kromatina. Nisu prisutne neoplastične transformirane stanice slične centroblastima, imunoblastima ili paraimunoblastima. Mogu se naći pojedinačne epiteloidne histiocitarne stanice što može davati sliku zvjezdanog neba, ali i reaktivne plazma stanice. Postoji nekoliko morfoloških varijanti, ali potencijalno kliničko značenje imaju dvije blastične varijante: klasična i pleomorfna.[129]

#### *1.1.7.3.4. Imunofenotip*

Maligne stanice su monoklonalne tipičnog fenotipa: CD5+, CD10-, BCL6-, CD23 negativne do slabo pozitivne, FMC7+.[130,131]

#### *1.1.7.3.5. Genetika*

Prisutna je pregradnja gena za laki i teški lanac. 70-75% slučajeva imaju translokaciju t(11;14).[132] Teoretski, svi slučajevi pokazuju ovu preuredbu FISH analizom.[133] Mnogi

slučajevi pokazuju točkastu mutaciju i/ili deleciju *ATM* (engl. *ataxia telangiectasia mutated*) gena. Manjina slučajeva, posebno blastoidna varijanta i drugi agresivniji slučajevi pokazuju dodatne mutacije, delecije i druge abnormalnosti u regulaciji proteina: TP53, p16 i p18.[134,135] Delecija 13q14, totalna ili parcijalna trisomija +12, 17p delecija i druge abnormalnosti koje se viđaju u kroničnoj limfocitonoj leukemiji su relativno česte i u MCL. U pleomorfnoj blastoidnoj varijanti postoji visoka incidencija tetraploidije bez *BCL2* i *C-MYC* preuredbe gena.[2,136] Svi slučajevi su *BCL2* i cyclin D1 (*BCL$_1$*) pozitivni,[137] uključujući i rijetke slučajeve CD5 negativnih.

### 1.1.7.4. Difuzni B velikostanični limfomi (DLBCL)

#### *1.1.7.4.1. Definicija i biološko podrijetlo*

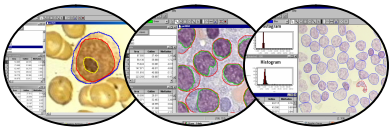
Difuzni B-stanični limfomi predstavljaju difuznu proliferaciju velikih neoplastičnih B-stanica, dva puta većih od normalnih limfocita. Podrijetla su B-limfatičnih stanica i germinativnog i postgerminativnog centra.

#### *1.1.7.4.2. Epidemiologija i klinička slika*

Prisutni su kod 30-40% odraslih bolesnika s NHL-ima. Mogu se javiti kao nodalni i ekstranodalni limfomi.[138] Želudac ili ileocekalna regija su najčešća ekstranodalna sijela iako to može biti bilo koja lokalizacija: koža, CNS, kost, testis, meka tkiva, ženski genitalni trakt, pluća, bubreg, jetra, slezena, žlijezde slinovnice itd. Vrlo rijetko primarno zahvaća koštanu srž i/ili perifernu krv. Kod dijagnoze je obično prisutna brzo rastuća tvorba nodalno ili ekstranodalno, iako se kod određivanja proširenosti nailazi na već diseminiranu bolest. Etiologija je nepoznata. Često nastaju *de novo* kao DLBCL ili transformacijom iz limfoma nižeg stupnja malignosti: KLL/MLL-a, FC, MZL ili nodularne limfocitne predominacije Hodgkinova limfoma. Često mu prethode i imunodeficijentna stanja.[2]

#### *1.1.7.4.3. Morfologija*

Limfni čvorovi su zahvaćeni kompletno, djelomično, interfolikularano ili rjeđe sinusoidalno. Perinodalna meka tkiva su također infiltrirana. DLBCL je limfom velikih transformiranih limfoidnih stanica. Citomorfološki se može podijeliti u nekoliko varijanti, ali bez specifičnih imunofenotipskih i citogenetskih parametara. Srednje do velike



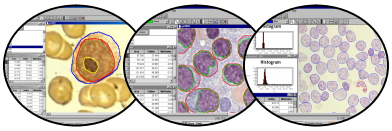
stanice slične centroblastima (okruglih ili ovalnih jezgara, retikularne strukture kromatina s 2-3 nukleola uz jezgrinu membranu i bazofilne citoplazme) čine centroblastičnu varijantu.[139]Imunoblastičnu varijantu čine velike stanice (>90%), s jednim centralnim nukleolom i jako bazofilnom citoplazmom. Može se naći i diferencijacija prema plazmablastima, a broj centroblasta je često manji od 10%. U slučaju plazmablastične diferencijacije klinički i fenotipski se može zamijeniti s ekstramedularnim zahvaćanjem plazmablastične varijante plazmastaničnog mijeloma. U varijanti DLBCL-a bogatom T limfocitima ili histiocitima većina stanica su reaktivni T-limfociti i/ili histiociti, a manje od 10% su maligne velike stanice. Velike stanice mogu nalikovati limfocitnoj i/ili histiocitnoj varijanti Reed-Sternbergove stanice (L&H) u nodularnoj limfocitnoj predominaciji Hodgkinova limfoma, imunoblastima, centroblastima ili tipičnim Reed-Sternbergovim stanicama.[140] Anaplastična varijanta DLBCL karakterizirana je velikim okruglim, ovalnim ili poligonalnim stanicama bizarnih, pleomorfnih jezgara koje mogu sličiti Reed-Sternbergovim stanicama ili imitirati karcinom.[141] Proliferativna aktivnost Ki-67 je >40%, u nekim slučajevima viša od 90%.

#### *1.1.7.5.4. Imunofenotip*

DLBCL izražava pan-B biljege: CD19, CD20, CD22, CD79a (iako neki od njih mogu nedostajati). U 50-75% slučajeva se mogu naći površinski i/ili citoplazmatski imunoglobulini (IgM>IgG>IgA). Citoplazmatski imunoglobulini se naročito nalaze u plazmablastičnoj diferencijaciji.[142] Neke anaplastične (ali i neanaplastične) varijante su CD30 pozitivne, 10% su CD5+, a 25-50% CD10+. CD5+ DLBCL su negativni na cyclin D1 za razliku od blastične varijante limfoma plaštene zone. *BCL2* je pozitivan u oko 30-50% slučajeva, vrlo često i nuklearna ekspresija *BCL6*.

#### *1.1.7.4.5. Genetika*

Ekspresija P53 proteina udružena s *TP53* mutacijom je nađena u malom broju slučajeva.[143]Većina limfoma ima preuredbu gena za lake i teške lance imunoglobulina i pokazuje somatske mutacije u različitim regijama. 20-30% ima t(14;18),[144] više od 30% abnormalnosti 3q27 regije. Mnogi slučajevi imaju kompleksne citogenetske abnormalnosti.[2]



## 1.2. KOMPJUTERSKA ANALIZA SLIKE

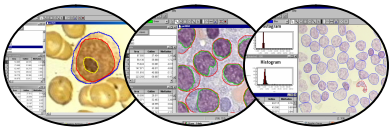
### *1.2.1. UVOD*

Uvođenjem računala u analizu slike omogućena je njena: *obrada, analiza, usporedba, selekcija određenih segmenata slike te pohranjivanje slika s mogućnošću kreiranja baze podataka.*[145]

Kompjuterska analiza slike, u današnje vrijeme, nije samo dobro utemeljena i visoko razvijena metodologija, već postaje široko upotrebljavana i sve više primjenjivana na različitim poljima dijagnostike u kliničkim laboratorijima.

Ona omogućava numeričku objektivizaciju najsuptilnijih promjena nedostupnih vizualnoj inspekciji te umjesto subjektivne procjene dolazi do objektivne kvantifikacije određenih parametara.[146] Kao takva, ima brojne kliničke i istraživačke primjene, naročito predstavlja pomoć u staničnoj morfologiji (citologiji i patohistologiji) u analizi malignih lezija. Brzi napredak u tehnologiji i ovisnost o tzv. „user-friendly“ sistemima zainteresirala je stanične morfologe mogućoj alternativi protočnom citometru, posebno u evaluaciji malih ili hipocelularnih uzoraka.

Većina patoloških dijagnoza u kirurškoj patologiji i citopatologiji, još uvijek, ima svoju osnovu u bazičnoj svjetlosno-mikroskopskoj interpretaciji.[147] Morfološka dijagnoza je bazirana na vizualnoj percepciji[149] ili dijagnostičkim kriterijima za različite tkivne uzorke za koje je potrebna visoka educiranost morfologa.[148] Iako je većina kriterija jasno definirana za svaku bolest, ipak su moguće različite interpretacije. Naime, mnoge studije opisuje prisustvo varijacije u reproducibilnosti (inter- i intramorfologa) kako za različite neoplazme, tako i za upalne bolesti i druga patološka zbivanja. Problem reproducibilnosti postaje i veći ako se uključe i prognostički kriteriji: stupanj diferenciranosti ili gradus, mitotska aktivnost itd. Oni uključuju i problem uzorka: tip, metoda i vrijeme fiksacije itd.[149] Zadnjih godina, međutim, ulažu se napori kako bi se povećala dijagnostička sigurnost i dobile nove prihvatljive informacije samog procesa uvođenjem sofisticiranih kompjuterskih i molekularnih tehnologija. Jednostavan odgovor morfologa, zloćudno ili dobroćudno, nije na duge staze dovoljno za optimalno liječenje. Potrebne su dodatne informacije za izdvajanje bolesnika s tumorom koji povećavaju rizik recidiva ili brze progresije te detekcija recidiva prije kliničkih



manifestacija. Isto tako, identifikacija prekanceroznih lezija u populaciji s visokim rizikom za malignitet može pomoći u planiranju pristupa strategije nadzora.[147]

### *1.2.2. SISTEM ZA SLIKOVNU ANALIZU*

Tipični sistem za slikovnu analizu sastoji se od mikroskopa, visoko rezolutne kamere, kolor monitora, kompjutera (PC-a) i podržavajućeg programa za prihvat i analizu slike. Svjetlosni mikroskop sliku pretvara u analogni električni signal pomoću video kamere. Signal se nakon toga digitalizira u kompjuteru u elemente slike nazvane «pixels». Tamo gdje ljudsko oko može razlučiti 30-40 nivoa sivila,[150] kompjuter može razlučiti 256 nivoa po svakom pixelu. Digitalni signal može se natrag vratiti u anologni signal i prikazati na kolor monitoru.

Mikroskop je temeljni dio sistema. On ne mora biti kompliciran, ali mora imati, stabilni i uniformni izvor svjetla, kvalitetnu optiku i mora biti mehanički stabilan. Automatski mehanički pokretni dio nije obavezan, osim u slučajevima automatskog probira ili automatske analize preparata. Video kamera mora biti visoko kvalitetna i CCD (*Charge Coupled Device*) kamera, s visokom rezolucijom, te fotometrijskom i prostornom linearnošću. Kompjuter mora imati visoko-rezolucijski adapter za prihvat slike ili procesor slike, koji dozvoljavaju izolaciju i selekciju individualnih objekata („pixela“) slike. Spremanje slika zahtjeva dodatni periferni dio za pohranu podataka, kao što je tvrdi disk (engl. *hard disk*), budući iz svake analize proizlazi velika količina podataka. Monitor mora imati dovoljno jaku rezoluciju da može prepoznati detalje od interesa. Kolor monitor je prihvatljiviji ako se koristi kolorimetrija (kao npr. imunoperoksidaza), ali nije neophodan za običnu morfometriju. Konačno, printer služi za pisanje izvješća zbog čuvanja kopija.[151,152]

### *1.2.3. VRSTE I PRIPREMA UZORAKA ZA KOMPJUTERSKU ANALIZU SLIKE*

Različiti tipovi uzoraka su podesni za analizu. Specifičnost uzorka ovisi o tipu analize koja će se primijeniti (jezgra, citoplazma ili oboje) i aparature kojom će se koristiti. Kirurški patološki materijal dobiven biopsijom ili ekscizijom, svi tipovi citoloških uzoraka (izljevi, obrisci, punktati) kao i stanične kulture su mogući uzorci. Što se tiče patohistoloških uzoraka najidealniji su svježi ili smrznuti, iako se mogu upotrijebiti i parafinski rezovi. Svježi uzorci se mogu koristiti za otiske ili pak suspenzije stanica koji se obrađuju kao razmazi ili u citocentrifugi. Cijele se stanice mogu analizirati u svježim

citološkim preparatima (pripremljeni kao razmazi ili u citocentrifugi) isto kao i u smrznutim i parafinskim rezovima. Suspenzije jezgara se mogu pripremiti disagregacijom svježeg ili smrznutih tkiva, citoloških uzoraka, ili parafinskih kalupa u obliku razmaza ili citocentrifugata. Mnogi autori opisuju da se kod disagregacije jezgara uklopljenih u parafin gubi veliki dio jezgara tijekom pripreme suspenzija.[153]

### *1.2.4. MORFOLOŠKI I KINETIČKI KRITERIJI MALIGNITETA STANICE*

Kriteriji maligniteta mogu se podijeliti na: promjene cijele stanice, promjene citoplazme i promjene jezgre i jezgrinih struktura. Promjene cijele *stanice* uglavnom se odnose na poremećaj odnosa jezgre i citoplazme u korist jezgre (povišen nukeo-citoplazmatski omjer - N/C). Tumor pokazuje beskorisno nagomilavanje patoloških stanica pojačanom mitotskom aktivnošću, a samim time i nalazom mitoza. Promjene *citoplazme* očituju se bazofilijom kao odrazom povećanja sinteze proteina, vakuolizacijom (Burkittov limfom) ili stvaranjem granula u citoplazmi (neurosekretorna granula itd). *Interfazna jezgra* u eukariotičnoj stanici ima relativno konstantnu ultrastrukturu ovisno o podrijetlu, stupnju diferencijacije ili funkcionalnoj aktivnosti. Smatra se kako je ona „direktor“ stanice i da su promjene u staničnoj morfologiji[147] ili aktivnosti stanice odraz promjena u jezgri.[154] Malignom alteracijom promjene su i najbrojnije na nivou jezgre: povećanje što rezultira ranije spomenutim povećanjem N/C odnosa; promjene oblika karakteristične za pojedine tipove tumora (intranuklearne inkluzije za papilarni karcinom štitnjače, jezgre poput zrna kave za Brennerov tumor, konvolucija i cerebriformnost za *mycosis fungoides* i *Sezary* sindrom, Dutcher-Fahey-ove inkluzije za limfoplazmocitoidni limfom, zarezanost za folikularne limfome itd.). Važna karakteristika jezgara kod malignog rasta je i izražen pleomorfizam te multinukleacija ili multilobulacija jezgara. Struktura kromatina može pokazivati hipo- ili hiperkromaziju kao odraz abnormalne količine DNA nastale zbog patoloških mitoza, te povećan broj jezgara u sintetskoj fazi pripreme za mitozu. Oba parametra: količina DNA i proliferativna aktivnost reflektiraju se u abnormalnosti stanične funkcije: abnormalna količina DNA karakterizira maligne i premaligne stanice, a značajno povećanje proliferativne aktivnosti udruženo je s neoplazijom te biološkim ponašanjem tumora kao odraz brzine njegova rasta.[147] Unutar jezgre dolazi do povećanja broja i veličine nukleola te promjenama u substrukturi nukleola tzv. regiji nukleolarnog organizatora (NOR-a). Jezgra je i intracelularno sijelo receptora steroidnih hormona (estrogena i progesterona) što se može dokazati imunocitokemijski, a služi u dijagnostičke i prognostičke svrhe kod karcinoma dojke. Proliferacijski antigeni kao Ki 67 izražava se u jezgri tijekom $G_1$, S, $G_2$ i M faze

staničnog ciklusa, a nedetektabilan je u stanicama koje su u stanju mirovanja. Većina proteina produkata onkogena mogu se naći u citoplazmi ili staničnoj membrani. Primjeri su faktori rasta i njihovi receptori. Proteinski produkti ostalih onkogena prisutni su u jezgri. Primjeri su c-MYC onkoprotein koji je udružen sa sintezom DNA naročito u prelasku $G_0$ u $G_1$ fazu staničnog ciklusa. Istraživanje nuklearnih onkoproteina ima potencijalnu rastuću ulogu u razumijevanju molekularne biologije neoplazmi, a mogu imati i prognostički značaj u određenim tipovima tumora. Općenito morfologija jezgre tumorskih stanica važna je iz dva razloga. Prvo, substruktura može biti dijagnostička pomoć u identifikaciji specifičnih tipova tumora. Drugo, abnormalnosti nuklearne morfologije igraju veliku ulogu u stupnjevanju tumora.[147]

### *1.2.5. KVANTITATIVNE KOMPJUTERSKE SLIKOVNE TEHNIKE U CITOMORFOLOGIJI I HISTOMORFOLOGIJI*

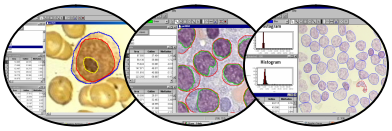
*Morfometrija* je općeniti termin široko upotrebljavan za različite kvantitativne metode uključujući tkivne i stanične analize.[149] *Citometrija* se koristi u nekim studijama kao sinonim morfometriji primijenjenoj na citološke uzorke, nasuprot *histometriji* kao morfometrijskoj tehnici korištenoj za analizu histoloških rezova.[155] Međutim citometrija ima i šire značenje u nekim studijama uključujući mjerenja citokemijskih i imunocitokemijskih analiza kao *in situ* hibridizaciju na stanicama ili tkivima i analizu AgNOR-a.[156,157] *Mikrofotometrija* podrazumijeva kvantitativne tehnike ovisne o intenzitetu boja za specifične svrhe kao: određivanje količine DNA (ploidnost), zvana i *statička DNA citometrija (ICM*) ili kvantifikacija imunocitokemijskih reakcija za hormonske receptore, biljege proliferativne aktivnosti, onkogene itd. [149,158,159]

#### 1.2.5.1. Morfometrija

Morfometrija je kvantitativni opis geometrijskih struktura u svim dimenzijama.[160] Za razliku od drugih morfoloških metoda, omogućava numeričku objektivizaciju opaženog, a kvantitativni pokazatelji su objektivni i reproducibilni.[161] Prednost joj je i u tome što je jeftina i tehnički jednostavna, a može se koristiti standardno obrađeni materijal.[162]

##### *1.2.5.1.1. Faktori koji utječu na morfometrijsku metodu*

Termin *planimetrija* označava mjerenja geometrijskih karakteristika u dvodimenzionalnoj slici, iako te strukture ne moraju biti dvodimenzionalne. Koncept transformacije



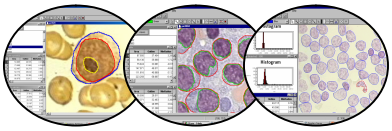
trodimenzionalnih objekata u dvodimenzionalne objekte na histološkim preparatima naziva se redukcija dimenzije. Faktori kao što su ugao i debljina reza rezultira značajnom varijacijom u dvodimenzionalnoj redukcijskoj slikovnoj analizi pod mikroskopom.[149] Tako u histološkim rezovima normalne jetre, debljine 3-7 mikrona, površina jezgara varira više od 15% između rezova, iako je realna razlika mnogo manja. Za patohistološke rezove je važno razumjeti razlike između aktualne veličine i izmjerene vrijednosti stanica, jezgre i nukleola. Morfometrijska mjerenja opisuju dvodimenzionalne slike (opseg, površinu, strukturu) a trodimenzionalne vrijednosti se mogu dobiti stereološkim tehnikama. Nove metode za trodimenzionalnu slikovnu rekonstrukciju za multiple, serijske rezove objekata vizualiziranih makroskopski, mikroskopski, ultrastrukturalno i sa visoko rezolutnim konfokalnim laserskim sistemom direktno kvantificiraju trodimenzionalne strukturne pokazatelje iz staničnih i tkivnih preparata.[163]

Problemi redukcije dimenzije u mjerenjima citoloških uzoraka su manji nego u histološkim uzorcima. Citološki uzorci ne ovise o rezovima (npr. stanice i jezgre u citološkim uzorcima su spljoštene, dvodimenzionalne slike ako faktor povećanja nije jako visok, njihova debljina je zanemariva). Premda je termin planimetrija adekvatniji, studija ovog tipa se također zove i morfometrijska studija.[164] Stereološke metode se ne mogu primijeniti na pojedinačne cijele stanice te se trodimenzionalni podaci ne mogu dobiti iz citoloških preparata.

Makroskopske fotografije, svjetlosno-mikroskopske ili ultrastrukturalne slike mogu se brzo mjeriti stereološkim ili morfometrijskim metodama superponiranjem prozirne maske koja se sastoji od multiplog seta različitih veličina za različite uzorke na objekt koji se mjeri ili pak kalibriranih crta te kontinuiranih i diskontinuiranih linija za precizno mjerne procedure.[149] Označavanje se vrši brzo interaktivnim perifernim sistemom, kao što je kompjuterski miš. Za razliku od automatskog analizatora koji je mnogo skuplji i tehnički ograničen naročito za istraživačke protokole (jer sadrži komercijalni program koji se ne može lako prilagoditi korisniku), interaktivni program je pogodan za rutinu i istraživački rad.

*1.2.5.1.2. Morfometrijski pokazatelji*

Za praktične svrhe stanice se tretiraju kao dvodimenzionalni objekti. Najčešće se koristi metoda interaktivne kompjuterske analize slike, gdje se dijelom automatski, dijelom



ručno, ocrtavaju konture struktura koje želimo mjeriti. Mogu se određivati različiti planimetrijski pokazatelji:[164]

- Jednostavni: površina, opseg, promjer, polumjer, najduža i najkraća os objekta.
- Faktori oblika (engl. *shape factor*)
    - faktor zaokruženosti objekta (engl. *form factor*- FF) ili
    - faktor izduženosti (omjer dužine i širine objekta).
- Kontekstualni pokazatelji: površina nakupine, broj elemenata po nakupini, udaljenost između nakupina, itd.
- Dvofazni pokazatelji: nukleocitoplazmatski omjer (N/C), nukleonukleolarni omjer (N/N) itd.

FF je parametar kojeg je sredinom 80-tih godina u praksu uveo Crocker,[165,166] a mjeri stupanj zaokruženosti objekta. Ima vrijednost 1 za krug, <1 za elipse, i <<1 za jako nepravilne oblike (nepravilni rubovi ili varijabilnost oblika).[167,168]

Morfometrijske analize zbog svojih kontinuiranih kvantitativnih obilježja omogućavaju:

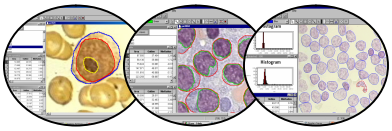
- korelaciju morfometrijskih podataka s tradicionalnom klasifikacijom tumora, koja se temelji na subjektivnoj interpretativnoj histopatologiji, u želji da se potvrdi ta klasifikacija
- veću pouzdanost i reproducibilnost citoloških i patohistoloških dijagnoza.[169]
- reklasifikaciju tumora na temelju morfometrijskih podataka
- korelaciju morfometrijskih podataka sa prognostičkim pokazateljima [170]
- osim planimetrijskih, mogu se određivati i pokazatelji teksture, pokazatelji u vezi sa nivoima sivila, i denzitometrijski pokazatelji[171]

### 1.2.5.2. Regija nukleolarnog organizatora – AgNOR

#### *1.2.5.2.1. Uvod*

Regije nukleolarnog organizatora predstavljaju petlje ribosomalne DNA (rDNA). Nalaze se na kratkim krajevima akrocentričnih kromosoma. Tu dolazi do prepisivanja gena za ribosomalnu RNA uz djelovanje RNA polimeraze I, što je preduvjet za sintezu ribosoma.

NOR-ovi zapravo predstavljaju substrukturu nukleola, iako se mogu naći i kao "satelitske" strukture izvan nukleola.



Maligna transformacija stanica karakterizirana je povećanjem sinteze proteina i bazofilijom citoplazme, povećanjem broja i veličine nukleola što rezultira pojačanom sintezom rRNA zbog povećanih zahtjeva za proteinima u tumoru. Visoko maligne novotvorine imaju brojnije, sitnije Ag-NOR-ove od benignih ili nižeg stupnja malignosti (povezanost s proliferacijskom aktivnosti stanice), te im se pripisuje i dijagnostička i prognostička vrijednost.[172,173,174,175,176,177,178,179,180] Postoji linearna korelacija između broja Ag-NOR-a i ekspresije proliferacijskog antigena - Ki-67[181,182,183,184,185] ili PCNA[186] te između broja AgNOR-ova i %S faze stanica kao parametara stanične proliferacije.[187,188,189,] Međutim neke studije su pokazale dijagnostičku vrijednost AgNOR-a u razlikovanju benignih od malignih bolesti dojke, ali bez značajnosti u diskriminiranju malignih od proliferativnih promjena.[190]

*1.2.5.2.2. Prikazivanje AgNOR-a*

Prikazuju se vezanjem Ag na intranuklearne nehistonske proteine (RNA polimerazu I, C 23 protein-nukleolin i B 23 protein) u obliku crnih točkica u interfaznim jezgrama.[191] Jedna od glavnih prednosti ove metode pred drugim načinima za procjenu proliferativne aktivnosti stanica je mogućnost korištenja arhivskog materijala i time mogućnost izvođenja retrospektivnih studija, kako citoloških, tako i histoloških.

Barsotti i sur.[192] opisuju primjenu AgNOR tehnike na arhivskim citološkim preparatima prethodno obojenima po May-Grünwald Giemsi (MGG) ili Papanicolaou-u, s odličnim rezultatima. Autori smatraju da bi upravo preparate sušene na zraku trebalo koristiti za kvantitativne i morfometrijske analize. AgNOR bojenje preparata sušenih na zraku, je vezano uz činjenicu što je takva fiksacija slična procesu isušivanja tkiva u postupcima zamrzavanja, za koje je poznato da dobro stabiliziraju sulfhidrilne skupine. S dobrim rezultatima na prethodno obojenim arhivskim citološkim preparatima, AgNOR metodu primijenila je i Cardillo na citološkim punktatima slinovnica.[193] Opisane su i tehnike istovremenog bojenja AgNOR-a srebrom te prikazivanja DNA metodom po Feulgenu.[194]

*1.2.5.2.3. AgNOR strukture i konfiguracije u normalnim i patološkim stanicama*

Prema Crockeru[195] svjetlosnim mikroskopom se mogu razlikovati 3 tipa AgNOR-a:

- NOR-ovi potpuno agregirani i tvore solitarnu, zaokruženu argirofilnu strukturu, koja se često naziva AgNOR, ali ispravnije odgovara samom nukleolu. Ova konfiguracija se često vidi u mirujućim limfocitima i drugim stanicama.

- U proliferirajućim stanicama često se unutar nukleola mogu razlikovati pojedini NOR-ovi.
- U stanicama visoko malignih tumora često se vide raspršeni, mali AgNOR-ovi i u nukleoplazmi.

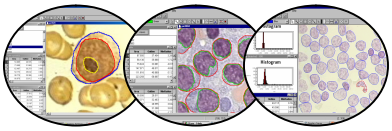
Nikicicz i suradnici razlikuju strukture i konfiguracije AgNOR-a u normalnim stanicama koštane srži *(tablica 4)*.[196]

Tablica 4. AgNOR strukture i konfiguracije normalnih stanica koštane srži

| **AgNOR STRUKTURE** | | |
|---|---|---|
| SKUPINA I (S I) (točkice i krhotine) | PRAVILNE (točkice) | male točkice (MT) |
| | | srednje velike točkice (ST) |
| | | velike točkice (VT) |
| | NEPRAVILNE (krhotine) | krhotine (K) |
| SKUPINA II (S II) (mjehurići) | PRAVILNI | mali pravilni mjehurići (MPM) |
| | | veliki pravilni mjehurići (VPM) |
| | NEPRAVILNI | mali nepravilni mjehurići (MNM) |
| | | veliki nepravilni mjehurići (VNM) |
| **AgNOR KONFIGURACIJE** | | |
| 0 | nema AgNOR-a | segmentirani granulocit |
| JEDNOSTAVNI | S I | limfocit |
| | S II | mijeloblast |
| SLOŽENI (više od jedne strukture koja pripada jednoj grupi) | S I | polikromatofilni eritroblast |
| | S II | promijelocit |
| KOMPLEKSNI (prisustvo struktura koje pripadaju obim skupinama) | S I i II | pronormoblast |

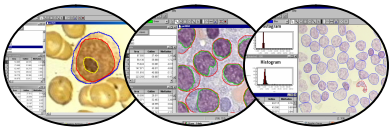
*Legenda: S-skupina*

Isti autori ranije opisane strukture primjenjuju u konfiguracijama limfatičnih stanica KLL i njenih transformiranih oblika *(tablica 5.)*[197]



Tablica 5. AgNOR strukture i konfiguracije kroničnih i transformiranih B-staničnih leukemija

| **AgNOR STRUKTURE** | | | |
|---|---|---|---|
| SKUPINA I<br>(S I)<br>TOČKICE | | male točkice (MT) | |
| | | srednje velike točkice (ST) | |
| | | velike točkice (VT) | |
| SKUPINA II<br>(S II)<br>MJEHURIĆI | PRAVILNI | mali pravilni mjehurići (MPM) | |
| | | veliki pravilni mjehurići (VPM) | |
| | NEPRAVILNI | mali nepravilni mjehurići (MNM) | |
| | | veliki nepravilni mjehurići (VNM) | |
| SKUPINA III<br>(S III) | | gigantski pravilni mjehurici (GPM) | |
| **AgNOR KONFIGURACIJE** | | | |
| JEDNOSTAVNI | S I | mali limfocit KLL (44%) | |
| | S II | srednje veliki do veliki limfociti KLL ili PLL (često) | |
| | S III | limfomske stanice Richterova sindroma (5%) | |
| SLOŽENI<br>(više od jedne strukture koja pripada jednoj grupi) | S I | HCL (4%) | |
| | S II | MNM<br>Richterov sindrom (<0,2%) | |
| | | VPM<br>Richterov sindrom (3%) | |
| | | Richterov sindrom (rijetko) | |
| KOMPLEKSNI<br>(prisustvo struktura koje pripadaju obim skupinama) | S I i II | MNM<br>HCL (<0,1%) | |
| | | VPM<br>Richterov sindrom (2%) | |
| | | VNM<br>Richterov sindrom (<0,5%) | |



U citološkim preparatima regije nukleolarnih organizatora nakon impregnacije srebrom prikazuju se kao manje ili veće tamno smeđe do crne točke u jezgri. One mogu ležati pojedinačno, ili u većim ili manjim nakupinama, unutar kojih se ponekad pojedine točke mogu i razlikovati.

#### *1.2.5.2.4. Faktori koji utječu na točnost*

Predviđa se kako će prikazivanje NOR-a srebrom u bliskoj budućnosti postati rutinska metoda za procjenu malignosti u patologiji tumora.[198] Budući različiti autori[199,200] koriste različite protokole bojenja, a nema ni jasnog dogovora o tome koje strukture unutar jezgre treba brojiti, ostaje problem standardizacije u kvantifikaciji i bojenju AgNOR-ova. Razlike u procesima fiksacije i bojenja srebrom (koncentracija srebra, vrijeme inkubacije, temperatura) dovodi do bolje ili slabije očuvanosti stanica, a rezultat toga su različiti rezultati kod istih tipova tumora. [201,202,203]

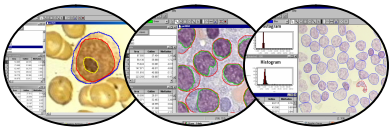
Izražavanjem omjera površine AgNOR-točaka tumorskih stanica i limfocita, kao kontrolnih stanica u istom preparatu (budući mirujući limfociti u velikoj većini imaju samo jednu interfaznu AgNOR točku) može se prevladati varijabilnost rezultata. [204,205,206,207]

Citološki preparati se smatraju bolji u odnosu na histološke rezove, jer se u otiscima točke lakše broje, i lakše se razlikuju individualne točke unutar nukleola. Za razliku od histoloških rezova, u otiscima se vide cijele stanice, pa je broj točaka u njima očekivano veći, nego u histološkim rezovima.[208,209] Ipak se i tako različiti materijali mogu uspoređivati, ako se određuje omjer površine AgNOR-a i jezgre.[210,211] Suprotno tome, postoje i druga mišljenja. Rueschoff[212] smatra da se u citološkim preparatima pojedinačne AgNOR točke preklapaju, te da se ne mogu pouzdano brojiti, ali je parametar ukupne površine koju zauzimaju AgNOR-točke po jezgri originalno opisao koristeći kompjutersku analizu.

#### *1.2.5.2.5. Interpretacija rezultata*

Ne postoji standardizirani protokol za analizu AgNOR točaka, iako se u literaturi susreću 2 osnovna pristupa brojenju AgNOR-točaka:

- Brojenje svih struktura obojenih srebrom, ali ako se nalaze u nakupini (skoro agregirani ili parcijalno disagregirani nukleoli), tretiraju se kao jedna struktura.



- Brojanje svake točke kao posebne, ako se vide odvojeno unutar nukleola, kao i manje AgNOR-e koji se vide izvan nukleola. Ove tehnike nisu međusobno isključive.[195]

Sama analiza AgNOR-a vrši se određivanjem broja i veličine AgNOR-ova ili morfometrijski pomoću digitalne analize slike (koristeći primjerene pokazatelje nabrojene kod morfometrijske analize) što je točnije i brže te omogućava numeričku objektivizaciju površine točkica.[213]

Međutim, većina studija pokazuje za limfatične stanice i njihove maligne entitete vjerodostojno razlikovanje točkica i nakupina svjetlosnim mikroskopom,[42] što je lakše u rutinskom radu budući ne uzima puno vremena, nije ovisno o statičkim sistemima, a reproducibilnost je visoka.

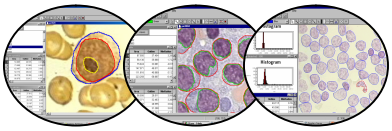
### 1.2.5.3. Statička („image“) DNA citometrija

#### *1.2.5.3.1. Uvod*

Dugo je poznato kako je tumorska geneza često udružena s kromosomskim abnormalnostima, promjenama genoma, mjerljivim razlikama u količini DNA tzv. ploidiji i varijacijama u staničnom ciklusu neoplastičnih stanica.[214] Količina DNA i varijacije staničnog ciklusa mogu se brzo izmjeriti protočnim citometrom te kompjuterskom (engl. *image*) ili statičkom DNA citometrijom.[215,216]

#### *1.2.5.3.2. Stanični ciklus*

Većina normalnih stanica se obnavlja u tkivima u staničnom ciklusu koji uključuje sintezu i mitotsko dijeljenje stanica. U staničnom ciklusu postoje dva perioda, mitotska faza (M) i period mirovanja (interfaza). Većina stanica u tkivima se nalazi u fazi mirovanja ($G_o$) ili presintetskoj fazi ($G_1$). Stanice u $G_o/G_1$ imaju diploidnu (2N) količinu DNA. Stanice iz $G_1$ faze prelaze u sintetsku (S) fazu, kada dolazi do replikacije intracelularne DNA. Tijekom S faze stanice sadrže količinu DNA između 2N i 4N.[217,218] Nakon DNA replikacije stanice ulaze u $G_2$ fazu s 4N količinom DNA. Vrlo brzo stanice iz $G_2$ faze podliježu mitozi (M). Rezultat mitoze su progenitorske stanice dihotomno podijeljene u dvije stanice s diploidnom količinom DNA koje ponovno prelaze ili u $G_1$ fazu ili u stanje mirovanja $G_o$ fazu.[216]



Općenito, tumorske stanice imaju kraći stanični ciklus nego normalne stanice, nalaz koji je često od prognostičke važnosti. Skraćenje staničnog ciklusa se reflektira povećanjem S+$G_2$M faze ili samo frakcije S-faze.[219]

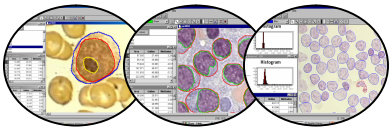
*1.2.5.3.3. Određivanje sadržaja DNA (ploidije) u malignim stanicama*

Količina DNA u stanicama odnosno ploidija može se uzeti kao biljeg kromosomskih abnormalnosti za dijagnozu i prognozu tumora. Maligni tumori često imaju kariotipske abnormalnosti. Određivanje ploidnosti se bazira na pretpostavci da sadržaj DNA u $G_o/G_1$ korelira s brojem kromosoma i ostalim karakteristikama staničnog ciklusa.[220] Količina DNA izmjerena protočnim citometrom ili statičkom DNA citometrijom može detektirati približno 5% promjena u kromosomskom DNA sadržaju, što korespondira s povećanjem ili smanjenjem 1 ili 2 kromosoma po jezgri. Općenito, postoji dobra korelacija između izmjerene količine DNA protočnim citometrom ili statičkom DNA citometrijom i kariotipskih tehnika, premda svaka metoda ima svoja ograničenja. DNA analiza protočnim citometrom ili statičkom DNA citometrijom ne detektira promjene kromosoma kao translokacije, delecije i/ili trisomije malih kromosoma, budući taj broj predstavlja malu proporciju ukupnog DNA sadržaja. Suprotno, protočni citometar može detektirati aneuplodiju u tumoru koji uz maligne stanice sadrži veliku količinu upalnih, aktiviranih, proliferirajućih, nemalignih stanica (npr. leukociti iz jako upalno promijenjene neoplazme).[216]

*1.2.5.3.4. Metode za određivanje sadržaja DNA*

Metodologija određivanja količine DNA se razvila zadnja tri desetljeća. Prije 1970. godine, koristio se mikrospektrofotometar. Metodologija je uključivala pregled histoloških rezova obojenih Feulgenom ili fluorescentnom bojom te kvantifikacijom svake stanice mikrospektrofotometrijski.[216,221,222]

Slijedeća metoda je bila protočni citometar početkom 70-tih godina prošlog stoljeća, koja je svoju kliničku primjenu našla u 80-tim, bazirana na brzoj, sekvencijskoj analizi stanične DNA u suspenziji prolazeći u tekućem mediju kroz kanal koji sadrži fluorescentni senzor.[223,224] Stanična DNA je označena s DNA fluorescentnom bojom kao propidij jodidom i etidij bromidom. Kapacitet protočnog citometra je mjerenje desetaka do stotine stanica u minuti što rezultira visoko rezolutnim histogramima s malim koeficijentom varijacije vrška histograma. Međutim, nije moguća direktna

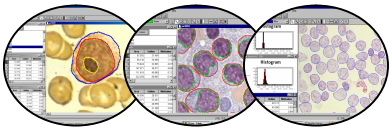


vizualizaciju mjerenih stanica zbog mogućnosti razrjeđenja male populacije tumorskih stanica normalnim stromalnim ili upalnim stanicama i nemogućnosti prepoznavanja gubitka tumorskih stanica tijekom procesuiranja uzorka. Dodatni nedostatak protočnog citometra je neadekvatna analiza hipocelularnog uzorka budući se ne mogu analizirati uzorci manji od 10 000 stanica.[216]

Statička DNA citometrija potječe od 80-tih godina prošlog stoljeća, uzela je maha napretkom mikrokompjuterske tehnike i razvojem programa za digitalnu kompjutersku analizu.[225] Ova metoda uključuje relativno brza, interaktivna, poluautomatska mjerenja stanica u histološkim rezovima ili citološkim preparatima obojenih Feulgenom. Postoje različiti automatski ili poluautomatski sistemi različite opreme i podržavajućeg programa te se podaci dobiveni jednim sistemom ne mogu automatski prevesti u drugi. Statička DNA citometrija je manje zahtjevna od protočne citometrije, za kvantifikaciju je dostatno 100 do 300 stanica po uzorku. Ova metoda nudi jasan napredak direktne stanične vizualizacije i individualne stanične selekcije od strane istraživača što rezultira visoko reprezentativnim DNA histogramom.[226]

Protočni citometar je komparabilan sa statičkom DNA citometrijom u determinaciji DNA indeksa (DI) i identifikaciji abnormalnog vrška histograma. Nekoliko studija opisuju 75-90% slaganja obje metode.[227,228,229,230,231] Statička DNA citometrija je uglavnom senzitivnija u detekciji DNA aneuploidije i DNA tetraploidije budući ima manje razrjeđenje tumorskih stanica normalnim stanicama. Protočna citometrija (engl. *flow cytometry* - FCM) je senzitivnija u detekciji sivih zona prekrivanja DNA aneuploidije uz diploidiju (engl. *near-diploid*) i tetraploidiju (engl. *near-tetraploid*) zbog manjeg koeficijenta varijacije i osiguravanja pouzdanije S-faze, te ima bolju povezanost s prognozom.[216] Nedostatci su joj mali uzorci, lažni diploidni histogrami zbog razrjeđenja tumorskih stanica neneoplastičnim stanicama. Prednost statičke DNA citometrije (engl. *image cytometry* - ICM) je u mogućnosti otkrivanja veće DNA aneuploidne populacije stanica, sa sadržajem DNA i >5c, koje je teško uočiti pomoću FCM.[232,233,234]

Za ICM su bolji citološki preparati nego histološki, jer su u analizu uključene cijele jezgre. Zbog toga su citološki preparati naročito pogodni za kvantitativne analize DNA,[235] a budući su trajni mogu se upotrijebiti za kontrolna mjerenja.[236] Histološki preparati nisu pogodni za DNA citometriju, jer postoji tendencija „stapanja“ tumorskih jezgara, a znatne razlike nađene su i u distribuciji sadržaja DNA u histološkim rezovima i citološkim otiscima istog tumora.[237]



Prisutnost normalnog sadržaja DNA u tumorskim stanicama ne mora uvijek značiti odsustvo kromosomske promjene, što je glavni nedostatak ICM metode.[238]

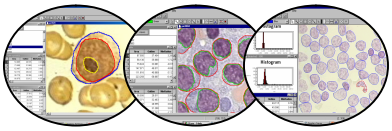
*1.2.5.3.5. Uzorci za statičku DNA citometriju*

Citološki uzorci kao otisci svježeg ili smrznutog tkiva, aspirati uzeti tankom iglom (engl. *fine-needle aspirates* – FNA), razmazi kao i citocentrifugati suspenzija stanica su najbolji izbor za statičku DNA analizu.[216,226,242] Mjerenja se vrše na cijelim, intaktnim stanicama što rezultira histogramima s malim koeficijentom varijacije (CV) te je moguće prikazati i gotovo diploidni (engl. *near-diploid*) vršak. Kao i za standardno bojenje po MGG-u preparati se suše na zraku prije fiksiranja, što dovodi do uniformnog bojenja jezgrinog materijala Feulgenom. Međutim mogu se koristiti i odbojeni arhivirani preparati obojeni bilo po Papanicolaou ili MGG-u i ponovno obojeni po Feulgenu, a preparati mogu biti stari i 20 godina.[239,240]

*1.2.5.3.6. Bojenje za statičku DNA citometriju*

Zasniva se na upotrebi boja koje se vežu stehiometrijski za DNA, a količina vezane boje je proporcionalna količini DNA u jezgri. Metoda specifičnog bojanja tzv. Feulgenova reakcija, koju su uveli Feulgen i Rossenbeck[241] 1924. god, i danas služi kao standard za druge metode. Zasniva se na svojstvu DNA da poslije blage hidrolize kloridnom kiselinom (koja uklanja purinske baze), oslobađa aldehidne skupine iz deoksiriboze, na koje se u drugoj fazi reakcije veže fuksin sulfuroična kiselina iz Schiffovog reagensa.[242] Bezbojni Schiff-ov reagens pretvara se u svoj obojeni oblik, i kovalentno veže za DNA. Prednost pred tehnikom s fluorescentnom bojom akridin narančasto (engl. *acridine orange*) je zbog jednostavnosti izvođenja i mogućnosti korištenja vidljivog spektra, a ne ultravioletnog svijetla. Rutinska bojenja, kao hemalaun-eozin (HE), nisu pogodna za analizu sadržaja DNA, jer se vežu ne-stehiometrijski na DNA te intenzitet obojenja ovisi o koncentraciji boje koja se koristi.

Obzirom na varijabilnost Feulgenove metode i posljedične obojenosti istodobno bojenih različitih preparata, što nije u vezi sa starošću preparata,[243] korištenje internog standarda neophodno je u kvantitativnom uspoređivanju različitih preparata.



*1.2.5.3.7. Diploidna interna kontrola*

Rezultati mjerenja DNA u tumorskim stanicama se izražavaju kao relativne vrijednosti u odnosu na vrijednost unutarnje kontrole (sa definiranom vrijednosti 2N), što nam omogućava određivanje ploidije na arhivskim preparatima jednako efikasno kao i na svježim.[244]

Zbog različitih rezultata pri korištenju vanjskih standarda preporučuju se unutarnji, kao što su leukociti, jer oni podliježu istim utjecajima u preparatu kao i analizirane stanice.[245,246,247,248,249] Za histološke preparate se najčešće koristite stromalne stanice dok su to u citološkim preparatima limfociti i granulociti. Zbog svog gustog, kompaktnog kromatina limfociti primaju i do 10-15% Feulgenove boje manje nego druge stanice, npr. fibroblasti pa su Babiarz i sur.[250] izračunali i faktor korekcije od 10.5%, uspoređujući fibroblaste i limfocite. Prema osobnom iskustvu, Seili [158,159] na punktatima koštane srži kod akutne limfatične leukemije kao kvalitetne kontrolne stanice koristi nesegmentirane granulocite. Morfološki se lako izdvajaju od ostalih stanica, a kromatin im je nešto manje kondenziran nego kod segmentiranih granulocita i limfocita.

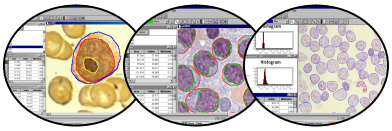
*1.2.5.3.8. Standardizacija metode*

Europsko udruženje za analitičku staničnu patologiju 1995. je objavilo “DNA konsenzus u statičkoj DNA citometriji“ s nadopunama 1997. i 2001. zbog nekomparabilnosti različitih studija, kao posljedica postojanja najrazličitijih protokola bojenja i mjerenja sadržaja DNA.[251,252,253]

Preporuke sadržavaju upute o bojenju (po Feulgenu, uz inkubaciju Schiffovim reagensom kroz 60 min), protokol mjerenja uz referentne stanice (unutarnje ili vanjske) s koeficijentom varijacije manjim od 6%, izračunavanje korektivnog faktora, koji predstavlja omjer modalnih vrijednosti integriranog optičkog denziteta (engl. *integrated optical density* - IOD) između kontrolnih stanica i ne-patoloških stanica u analiziranom uzorku te preporuke o algoritmima za interpretaciju rezultata ICM.[158,251,252,253]

*1.2.5.3.9. Interpretacija sadržaja DNA i određivanje ploidije*

Interpretacija količine DNA se bazira na usporedbi sadržaja DNA tumorskih stanica s $G_o/G_1$ frakcijom normalnih referentnih stanica. Referentne stanice su stanice za koje se



sigurno zna da sadrže diploidnu količinu DNA: limfociti, granulociti, fibroblasti. Pojedini sistemi koriste standardne DNA štakorske hepatocite za kalibraciju.[216]

*1.2.5.3.10. DNA indeks*

DNA indeks (DI) predstavlja odnos između vrijednosti $G_o/G_1$ vrška tumorskih stanica i vrijednosti $G_o/G_1$ vrška normalne diploidne populacije, a izračunava se kao odnos broja stanica vrška DNA u histogramu ($G_o/G_1$) uzorka prema broju stanica vrška ($G_o/G_1$) referentnih stanica.[233,254]

*1.2.5.3.11. DNA diploidija (DNA euploidija, 2N, 2C)*

Ako je $G_o/G_1$ vršak istraživanih stanica na istoj poziciji kao $G_o/G_1$ vršak referentnih stanica, količina DNA se klasificira kao diploidija. Budući značajan udio karcinoma i ostalih neoplazmi imaju diploidiju, ova karakteristika se ne može uzeti za razlikovanje tumorskih i netumorskih procesa. Općenito, diploidni tumori su udruženi s dobrom prognozom.[255]

Auer i sur.[256] smatraju diploidnim tumorima one čiji DI iznosi 0.95-1.05. Smets i sur. [257] međutim, kao hiperdiploidiju uzimaju DNA indeks ≥1.16, a vanVelthoven i sur. [261] za granice diploidnog uzimaju 0.9<DI<1.15, dok Fausel i sur. ne-diploidnim tumorima smatraju one sa DI>1.1.[258]

*1.2.5.3.12. DNA aneuploidija*

Aneuploidni histogram se naziva ako je $G_o/G_1$ vršak ispitivanih stanica različit od $G_o/G_1$ vrška referentnih stanica. Ukoliko je $G_o/G_1$ vršak manji od referentnih stanica naziva se DNA hipodiploidija, suprotno ako je $G_o/G_1$ vršak ispitivanih stanica veći od referentnih stanica opisuje se kao hiperdiploidni, ako se nalazi u tetraploidnoj regiji kao tetraploidni, odnosno multiploidni ako sadrži multiplu aneuploidnu populaciju.[220]

*1.2.5.3.14. Koeficijent varijacije*

Koeficijent varijacije (CV) je mjera preciznosti mjerenja DNA vrijednosti oko $G_o/G_1$ vrška. CV manji od 3% naročito je poželjan za FCM, budući veći može maskirati

gotovo-diploidni aneuploidni vršak i rezultirati nerealnom vrijednosti S-faze. CV se prikazuje u svakoj analizi DNA sadržaja bilo da se radi o FCM ili ICM.[259]

*1.2.5.3.15. Interpretacija histograma*

Najčešće korištena metoda je po Aueru, [260] iz 1980. godine s 4 tipa histograma:

TIP I Jedna jasno definirana modalna DNA vrijednost u diploidnoj ili gotovo diploidnoj regiji normalnih stanica. Samo mali broj stanica odstupa za više od nekoliko postotaka od modalne vrijednosti.

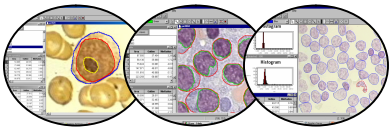
TIP II Tumorske stanice ili imaju jasni vršak u tetraploidnoj ili gotovo tetraploidnoj regiji, ili imaju 2 dobro definirana vrha oko regije 2c i 4c. Postotak stanica u tetraploidnoj regiji mora biti veći od 20%, a manje od 5% stanica se nalazi izvan tetraploidne regije. Vrlo malo ili ništa stanica imaju vrijednosti DNA koje odgovaraju S-fazi normalnih stanica. Samo po koja stanica pada izvan raspona DNA normalne populacije, te obično imaju sadržaj DNA oko 8c.

TIP III Distribucija je unutar populacije normalnih stanica. Obično pokazuje dva vrška, ali se razlikuje od tipa 2 po tome što histogram pokazuje veći broj stanica sa količinom DNA sličnom onoj koju imaju kontrolne stanice u S-fazi (>5%). Pozicija ta 2 vrška se po pravilu razlikuje ponešto od 2c i 4c vrijednosti normalne populacije (<20% stanica u tetraploidnoj regiji).

TIP IV Tumorske stanice pokazuju vrlo naglašenu i nepravilnu aneuploidiju, sa količinama DNA od vrijednosti blizu 2c, pa do >6c, ili čak 8c.

Babiarz[250] opisuje modificiranu Auerovu metodu također s 4 tipa histograma, a Van Velthoven i sur. [261] razlikuju slijedeće DNA tipove histograma:

| | |
|---|---|
| *Diploidni* -TIP I | DI >0,90 <1,15 |
| *Aneuploidni* | |
| • triploidni - TIP II | DI > 1,40 < 1,60 |
| • tetraplodni - TIP III | DI > 1,90 < 2,20 |
| • hiperdiploidni - TIP IV | DI > 1,16 < 1,39 |
| • hipertriploidni - TIP V | DI > 1,61 < 1,89 |
| • polimorfni - TIP VI | sadrži najmanje 2 nediploidna prije opisana tipa |



Svaki Velthovenov histogram je prikazan s 50 klasa vrijednosti IOD-a bez obzira na ploidiju. Diploidni tumor se smatra ako $G_0/G_1$ vrh sadrži najmanje 70% stanične populacije, za razliku od triploidnog, tetraploidnog, hiperdiploidnog i hipertriploidnog tumora za koje je dovoljno 15% jezgara stanica. S-faza predstavlja postotak stanica koje se nalaze između glavnog $G_o/G_1$ vrška, bez obzira na nivo ploidije i $G_2/M$ vrška. Postotak stanica u S-fazi je definiran brojem stanica koje slijede u pet klasa nakon $G_0/G_1$ DNA-vrška diploidnog i hiperdiploidnog tumora, šest klasa kod triploiodnog i hipertriploidnog, odnosno sedam klasa kod tetraploidnog tumora.

Prema Cornelisse i sur. [262] granična vrijednost $G_o/G_1$ faze na desnoj strani histograma određena je preklapanjem lijeve polovine $G_o/G_1$ vrška oko modalne vrijednosti (moda).

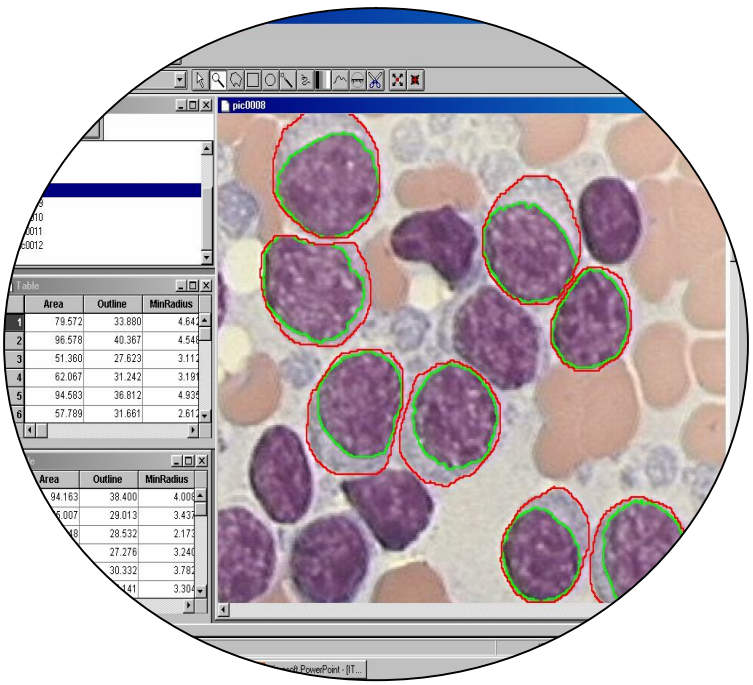
Prema Konsenzusu ESACP-a[253] (European Pathology Assisted by Telematics for Healthcare) tipovi DNA histograma su rezultat dijagnostičke i/ili prognostičke vrijednosti klasifikacije DNA raspodjele. Slijedeći tipovi DNA histograma mogu biti pomoć u prognozi i praćenju solidnih tumora:

- peridiploidni podrazumijeva prisustvo stanične populacije s modalnom vrijednosti DNA između 1.8c i 2.2c
- peritetraploidni je prisutan u slučajevima maligniteta ili DNA aneuploidije, a modalna vrijednost DNA je između 3.6c i 4.4c
- x-ploidni je također prisutan uz malignitet, s jednom populacijom stanica samom ili uz još jednu (peridiploidnu ili peritetraploidnu) modalne vrijednosti DNA izvan gore navedenih vrijednosti (peritriploidna, hipodiploidna)
- multiploidni, kao i prethodna dva prisutan je u neoplazmama, a prikazuje se kao više abnormalnih populacija stanica

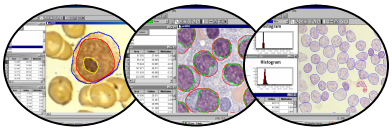
*1.2.5.3.16. Osnovni ciljevi dijagnostičke DNA citometrije*

- identifikacija staničnih populacija koje su izvan euploidnih raspona, na određenom nivou statističke značajnosti
- dobivanje informacije o broju abnormalnih (aneuploidnih) staničnih loza
- prepoznavanje poliploidizacije euploidnih ili aneuploidnih staničnih loza
- određivanje frakcija stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa
- pronalaženje rijetkih stanica s abnormalno visokim sadržajem DNA[158,263]

Dijagnostička vrijednost se temelji na postojanju abnormalne količine DNA,[264] naročito u prekanceroznim stanjima koja implicira neoplazmu.[265] Maligna transformacija dovodi do povećanja proliferacijskog indeksa, a 80-90% solidnih tumora su aneuploidni (sadrže više od diploidne količine DNA), također je primijećena veća aneuploidija u metastatskim tumorima.


pic0008
Table
Area
Outline
MinRadius
79.572
33.880
96.578
40.367
51.360
27.623
62.067
31.242
94.583
36.812
57.789
31.661
94.163
38.400
29.013
28.532
27.276
30.332

# 2. CILJEVI



2.1. Ustanoviti kliničke (dob, spol, podtip bolesti, stadije bolesti po Rai-u i Binet-u, veličinu tumorske mase, vrijeme udvostručenja tumorske mase i broja limfocita) i laboratorijske (hematološke, biokemijske i morfološke) prognostičke pokazatelje kroničnih leukemijskih oblika limfoproliferativnih bolesti i njenih podskupina.

2.2. Usporediti pokazatelje dobivene komjuterskom analizom slike s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima kod bolesnika s KLLPB.

2.3. Ocijeniti dužinom preživljenja prognostičku vrijednost morfometrijskih pokazatelja stanice i jezgre, obilježja regije nukleolarne organizacije te pokazatelje statičke DNA citometrije limfatičnih stanica dobivenih kompjuterskom analizom slike.

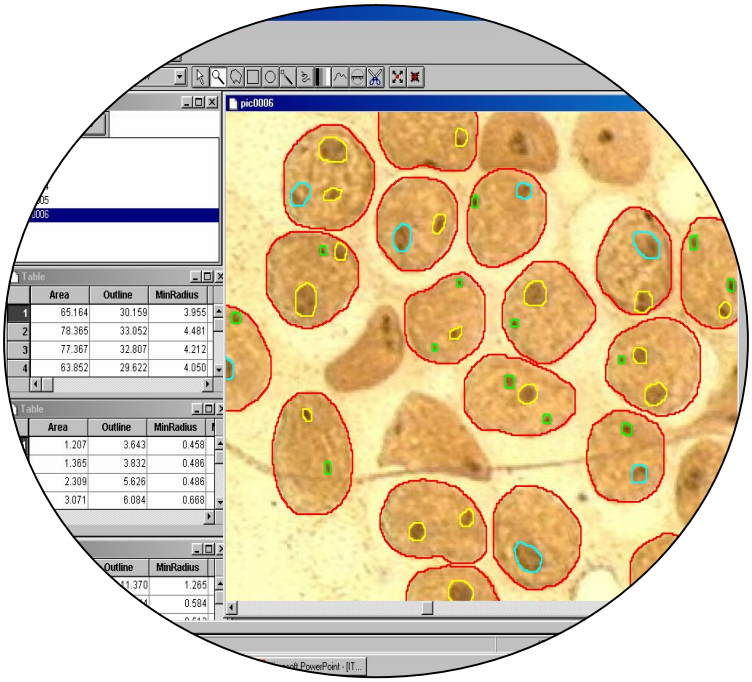
2.4. Pronaći nove pokazatelje diploidnog tipa histograma i regije nukleolarne organizacije u svrhu izdvajanja prognostičkih podskupina unutar diploidnih (nisko malignih) tumora te boljeg definiranja kliničkih i morfoloških entiteta.

2.5. Na osnovu proliferacijskih i kinetičkih parametara ocijeniti pokušaj obrazloženja podrijetla i distribucije malignih limfatičnih stanica u različitim kliničkim i morfološkim entitetima te ocijeniti njihov doprinos mogućoj novoj kliničkoj subklasifikaciji KLLPB.

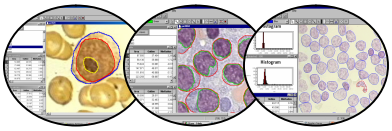
2.6. Usporediti međusobnu povezanost morfometrijskih parametara stanice i jezgre, obilježja regije nukleolarne organizacije te parametara DNA limfatičnih stanica u različitim odjeljcima tumorske mase (razmazima punktata limfnog čvora, koštane srži i periferne krvi) te u različitim podskupinama leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti.

2.7. Odrediti povezanost morfometrijskih parametara stanice i jezgre, obilježja regije nukleolarne organizacije te parametara DNA limfatičnih stanica s: veličinom tumorske mase i kliničkim stadijima po Rai-u i Binet-u; tijekom (faktorima progresivnosti) bolesti (udvostručenjem totalne tumorske mase i udvostručenjem limfocitoze) te preživljenjem.

2.8. Uvođenjem novog parametra proliferacijsko-kinetičkog indeksa, izdvojiti kvantitativne parametre koji bi mogli objektivnije tipizirati pojedine podtipove, imati utjecaja na tijek bolesti i prognozu, uz pomoć kompjuterske analize slike koristeći morfometriju stanice i jezgre te procjenom proliferacije i kinetike: određivanjem količine DNA ICM metodom te analizom AgNOR-a limfatičnih stanica u leukemijskim oblicima kroničnih limfoproliferativnih bolesti u različitim odjeljcima tumorske mase (koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnom čvoru).




# 3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE



## 3.1. ISPITANICI

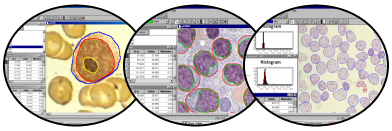
Ispitanike je predstavljalo 155 bolesnika s leukemijskim oblicima kroničnih limfoproliferativnih bolesti, klasificiranih prema SZO klasifikaciji, dijagnosticiranih u Kliničkoj bolnici «Merkur» u razdoblju od 1995-2002. godine. Obzirom na postavljene ciljeve analize u svim odjeljcima tumorske mase, znatan udio imali su bolesnici s povećanim limfnim čvorovima.

Analiza je izvršena u ukupnoj populaciji KLLPB te posebno u podskupinama:

- B-KLL+V (B kroničnoj limfocitnoj leukemiji s varijantama) koja uključuje
  - Tipičnu B-KLL (B kroničnu limfocitnu leukemiju)
  - KLL/PLL (miješanu kroničnu limfocitnu leukemiju i prolimfocitnu leukemiju) i
  - KLL/IMC (varijantu kronične limfocitne leukemije s limfoplazmocitoidnom diferencijacijom)
- Ne-B-KLL (leukemijskim oblicima kroničnih limfoproliferativnih bolesti bez B-kronične limfocitne leukemije) te
- Ne-(B-KLL+V) – (leukemijskim oblicima kroničnih limfoproliferativnih bolesti bez B-kronične limfocitne leukemije s varijantama)

U ispitivanoj populaciji (155) najviše je bilo u podskupini B-KLL+V (136), dok je svega 18 bolesnika (Ne-B-KLL+V) dijagnosticirano kao leukemijska slika FC gradus I ili FC gradus II, HCL, leukemijska slika SLMZ, leukemijska slika DLBCL ili leukemijska slika T limfoproliferativne bolesti (T LP). Tipičnih B-KLL je bilo 125, a ostalih (Ne-B-KLL) 29. U jednom slučaju nije bilo podataka o podtipu (neklasificiran). Grupa T limfoproliferativnih bolesti bila je zastupljena s po jednim slučajem T-PLL-a, T-LGL-a i ATL-a.

U periodu do 2002. godine kod 50% ispitanika nije primijenjeno nikakvo liječenje. Kod bolesnika koji su zahtijevali terapiju, prva linija je kod 29% ispitanika bila klorambucil, 7% CHOP (ciklofosfamid, adriamicin, onkovin i prednison), 5% FAMP (fudarabin), 3% „Paule-Elrich“, tj. modificiran protokol prema Knospe-u (ciklusi klorambucila + prednisona), po 2% PDN (prednison) i VAD (vinkristin, adriamicin i deksametazon), te po 1% endoksan, splenektomija u kombinaciji s kemoterapijom ili sama splenektomija.



Do 2005. godine točne podatke o početku i ishodu bolesti imali smo kod 151 bolesnika. Bolesnike smo pratili u razdoblju od 1 do 316 mjeseci s medijanom preživljena od 88 mjeseci.

Studija je provedena dijelom retrospektivno (76 bolesnika), a dijelom prospektivno (89 bolesnika) bazirana na medicinskoj dokumentaciji te citološkim razmazima punktata koštane srži, razmazima periferne krvi te punktatima limfnih čvorova. U analizu su uključeni demografski, klinički i laboratorijski pokazatelji (hematološki, biokemijski i morfološki) te pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike (engl. *image analysis* -IA) koja je uključivala morfometrijske karakteristike stanice i jezgre (engl. *image morfometry* - IM); osobine AgNOR-a (engl. *image AgNOR analysis* -IAgNOR) i statičku DNA citometriju (engl. *image DNA cytometry* - ICM).

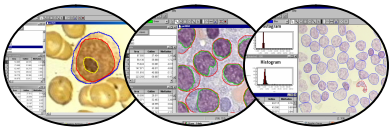
Od kliničkih i laboratorijskih parametara analizirani su: dob i spol bolesnika; veličina (TTM) i distribucija tumorske mase po Rai-u i Binet-u; vrijeme udvostručenja tumorske mase (DTM) i vrijeme udvostručenja limfocitoze (DTL); broj leukocita, eritrocita i trombocita; količina hemoglobina i hematokrit; postotak i apsolutni broj limfocita i atipičnih oblika, postotak neutrofilnih granulocita i monocita u perifernoj krvi; vrijednosti ukupnih proteina, albumina i globulina, prisustvo «M» komponente; vrijednosti LDH, bakra, SGOT-a, SGPT-a, bilirubina, alkalne fosfataze; mijelogram i histološki tip infiltracije koštane srži te ukupno preživljenje. Preživljenje je izračunato u ukupnoj populaciji bolesnika s KLLPB za sve kliničke, morfološke i laboratorijske pokazatelje, a za kompjuterske pokazatelje posebno u cjelokupnoj populaciji, a posebno u podskupini B-KLL+V.

Vrijeme udvostručenja ukupne tumorske mase (DTM) izračunato je po formuli:[266]

$$DTM = MJ \times TTM_1 \times (TTM_2 - TTM_1)^{-1}$$

$TTM_1$ je TTM na početku, a $TTM_2$ na kraju promatranog perioda, dok je MJ vrijeme promatranja u mjesecima.

Udvostručenje limfocitoze (DTL) je izračunavano regresijskom analizom iz 3 ili više vrijednosti apsolutnog broja limfocita kroz najmanje 12 mjeseci.[266]



Ukupno je analizirano 657 razmaza: punktata koštane srži (236), limfnih čvorova (146) i periferne krvi (275). Zbog ograničenog broja arhivskih preparata u retrospektivnoj studiji sve tri metode nisu učinjene na jednakom broju razmaza koštane srži, periferne krvi i limfnih čvorova. Morfometrija je učinjena na 85 punktata koštane srži, 107 razmaza periferne krvi te 52 razmaza limfnih čvorova; analiza AgNOR-a na 64 punktata koštane srži, 86 razmaza periferne krvi te 42 razmaza limfnih čvorova, a statička DNA citometrija na 87 punktata koštane srži, 82 razmaza periferne krvi te 52 razmaza limfnih čvorova.

Za IM i IAgNOR analizirano je prosječno po 100 stanica, a za ICM između 120 i 250 stanica (ispitivanih najmanje 100 i najmanje 20 kontrolnih stanica). Ukupno je analizirano 71 895 stanica za sve tri metode u svim odjeljcima tumorske mase (koštanoj srži, limfnom čvoru i perifernoj krvi).

Korišteni su svježi razmazi bojeni po MGG-u za morfometrijsku analizu, bojenjem po Feulgenu za ICM ili impregnacija srebrom za IAgNOR. Arhivski razmazi obojeni po MGG-u korišteni su za morfometrijsku analizu, a nakon toga odbojeni te ponovno bojeni: po Feulgenu za DNA ICM analizu,[221] a impregnacijom srebrom za analizu AgNOR-a (identično svježim razmazima).[192] Za DNA ICM analizu metodom po Feulgenu bojeni su i arhivski prethodno neobojeni razmazi sa zadovoljavajućim rezultatima. Arhivski, prethodno neobojeni razmazi, čak i nakon naknadnog bojenjem po MGG, nisu se pokazali zadovoljavajući za impregnaciju srebrom u svrhu prikaza AgNOR-a te kao takvi nisu uzeti za analizu.

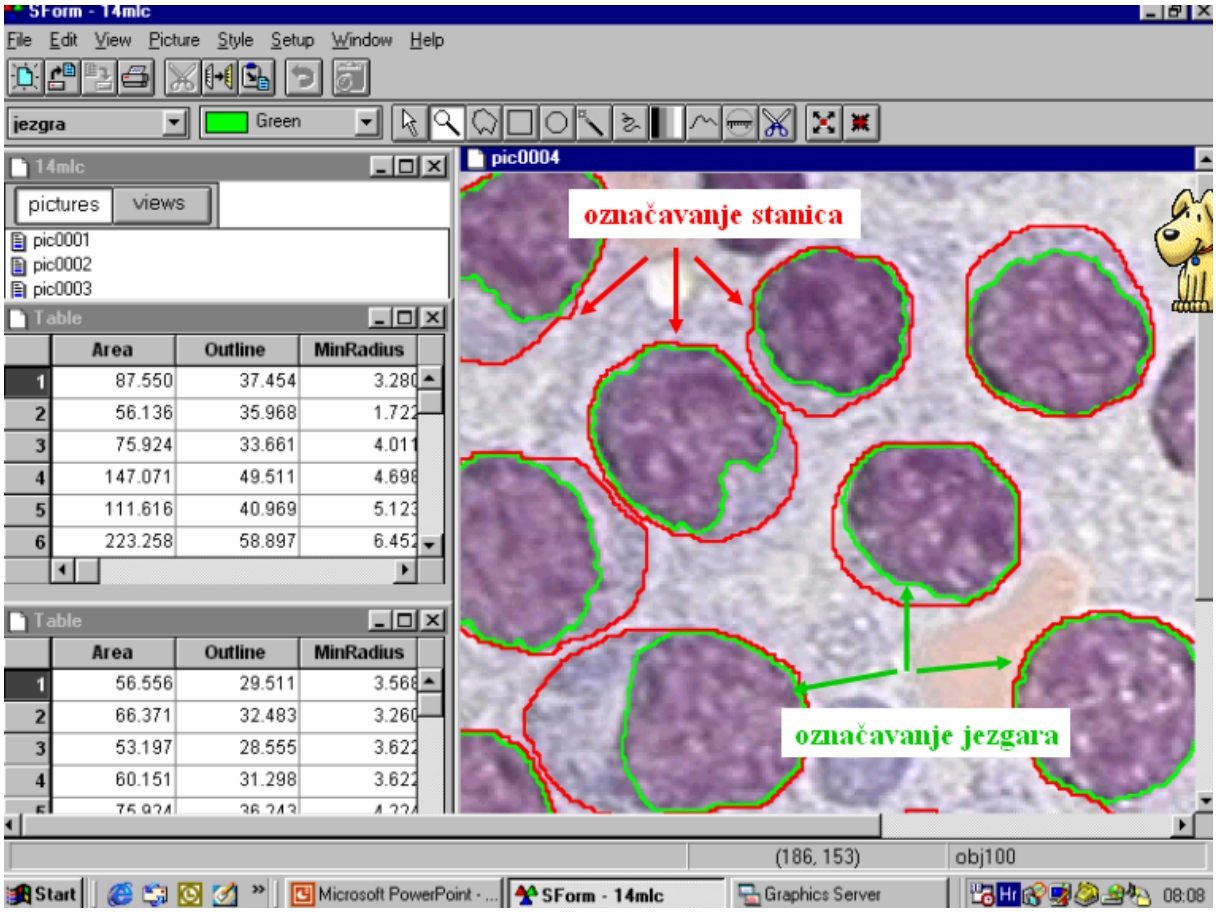
## 3.2. METODE

### *3.2.1. KOMPJUTERSKA ANALIZA* SLIKE

Morfometrija, analiza AgNOR-a i DNA ICM izvršena je na osobnom računalu s podržavajućim programom “SFORM” tvrtke VAMSTEC, Zagreb. Sistem se sastoji od visokorezolucijske kamere u boji «Pulinix» koja sliku (x100 oil) iz mikroskopa Olympus BH2 digitalizira i prenosi u osobno računalo.

### 3.2.1.1. Morfometrijska analiza stanice i jezgre

Morfometrijska analiza je izvršena na standardno obojenim razmazima po MGG-u. Granice citoplazme i jezgre su označavane interaktivno (prvo citoplazma, a nakon toga jezgra) uz ručnu korekciju *(slika 1).* Za citoplazmu i jezgru određivani su: površina, opseg, konveksitet, najmanji i najveći polumjer, duljina i širina, faktori pravilnosti (FF i FF izduženosti) te omjer jezgre i citoplazme.[164]



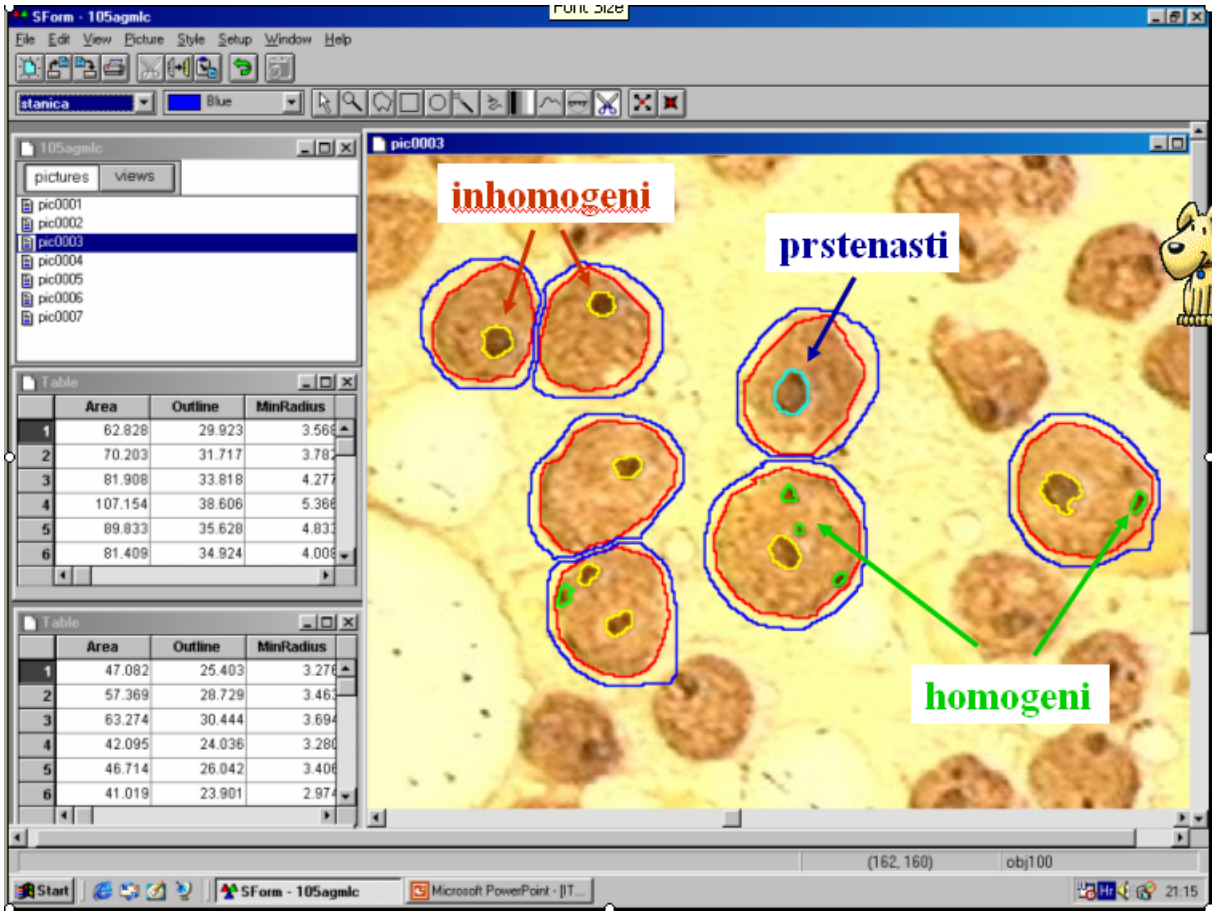

Slika 1. Morfometrijska analiza stanica i jezgara

### 3.2.1.2. Analiza AgNOR-a

U citološkim preparatima regije nukleolarnih organizatora nakon impregnacije srebrom prikazuju se kao manje ili veće tamno smeđe do crne točke u jezgri. Nalaze se pojedinačno, ili u većim ili manjim nakupinama, unutar kojih se ponekad pojedine točke mogu i razlikovati.

Pomoću kompjuterske analize slike AgNOR točke mogu se ne samo brojiti, nego i točno odrediti njihove dimenzije, te složeniji morfometrijski pokazatelji, kao npr. faktor zaokruženosti objekta, izduženost i sl. Osim toga, budući da se radi o brojčanim

rezultatima, mogu se koristiti i različite statističke metode.[199,201] Digitalna analiza slike dovela je i do povećanja reproducibilnosti rezultata mjerenja *(slika 2).*

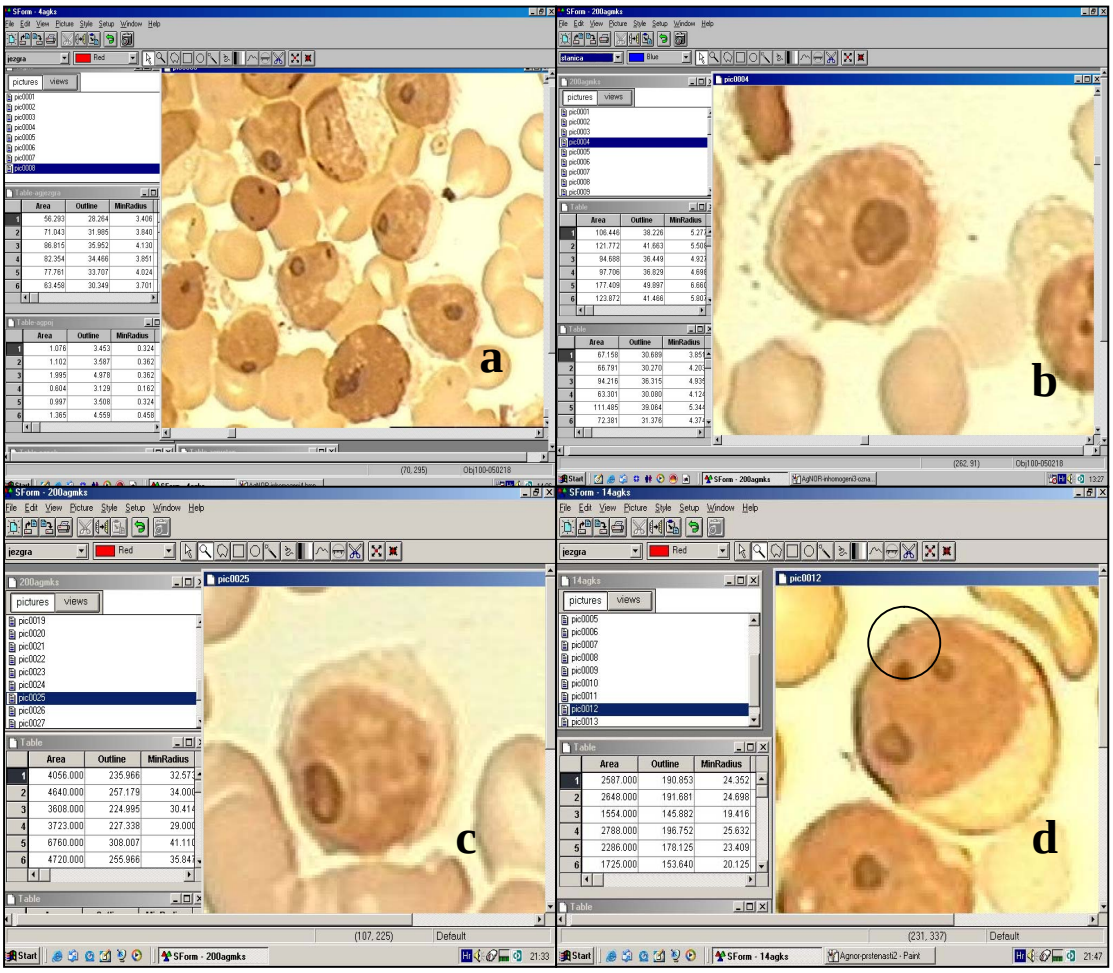



Slika 2. Kompjuterska analiza AgNOR-a

U ovom radu je primijenjen vlastiti pristup analizi, gdje su AgNOR-i podijeljeni u tri tipa *(slika 3):*

- Homogeni tip (unutar kojeg se ni nakon povećanja ne vide razrijeđenja)
- Inhomogeni tip (nepravilna razrijeđenja AgNOR-a vidljiva na standardnom povećanju x1000, a naročito nakon većih kompjuterskih povećanja)
- Prstenasti AgNOR-i (specifična konfiguracija u obliku prstena koja se vidi već i na standardnom povećanju).

Budući su KLLPB nisko maligni tumori, nakupine (engl. *clusters*) u pravom smislu riječi, koje se viđaju kod visoko malignih neoplazmi, nađene su u svega dva slučaja te kao takvi nisu analizirani.



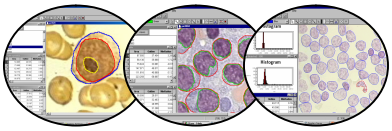

Slika 3. Tipovi AgNOR-a: a) pregledna slika; b) inhomogeni; c) prstenasti; d) homogeni (u krugu) i prstenasti

Za svaki pojedini tip ranije opisanih AgNOR-a, analizirani su broj, površina (najmanja i najveća te prosječna vrijednost), njihov omjer prema površini jezgara; ukupan broj svih AgNOR-a; ukupna površina (najmanja, najveća i prosječna) te omjer ukupne površine svih AgNOR-a prema površini jezgre.

### 3.2.1.3. Statička DNA citometrija

Prethodno obojeni razmazi po MGG-u odbojeni su i zajedno s neobojenim razmazima bojeni metodom po Feulgenu.

Tijekom cijele analize, prije početka i tijekom slikanja, poštivana su određena pravila. Prvo pravilo odnosi se na intenzitet svjetlosti, koje se tijekom cijelog postupka snimanja pojedinih vidnih polja ne smije mijenjati. Drugo pravilo, kalibracija intenziteta praznog



dijela predmetnog stakalca, budući kompjutor određuje optički denzitet svake jezgre u odnosu na prazan dio istog preparata.

Analizirane su jezgre (N≥100) limfatičnih stanica koje se ne preklapaju. Kao unutarnja kontrola korišteni su granulociti (N≥10) *(slika 4)*. Za svaki uzorak izračunat je koeficijent varijacije referentnih (kontrolnih) stanica koji nije smio iznositi >6%[251] prema formuli:

CV=(SD/prosjek) x 100

DNA indeks je određen kao omjer integrirane optičko-denzitometrijske vrijednosti (IOD) ispitivanih jezgara u odnosu na IOD vrijednost kontrolnih stanica.[254]

DI =IOD vrška DNA tumorskih stanica/ IOD vrška DNA kontrolnih stanica

Prema Cornelisse i sur.[230] granična vrijednost $G_0/G_1$ faze na desnoj strani histograma određena je preklapanjem lijeve polovice $G_0/G_1$ vrška oko modalne vrijednosti (moda). Nakon toga proporcija stanica do 4N smatrana je sintetskom (S) fazom.

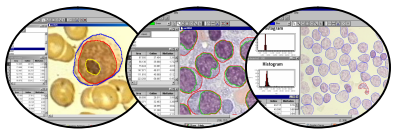
Svaki histogram je prikazan s 50 klasa IOD vrijednosti, a uz DI, određivan je postotak stanica u S fazi (prema Cornelisse i sur.) i postotak stanica veći od 4N.

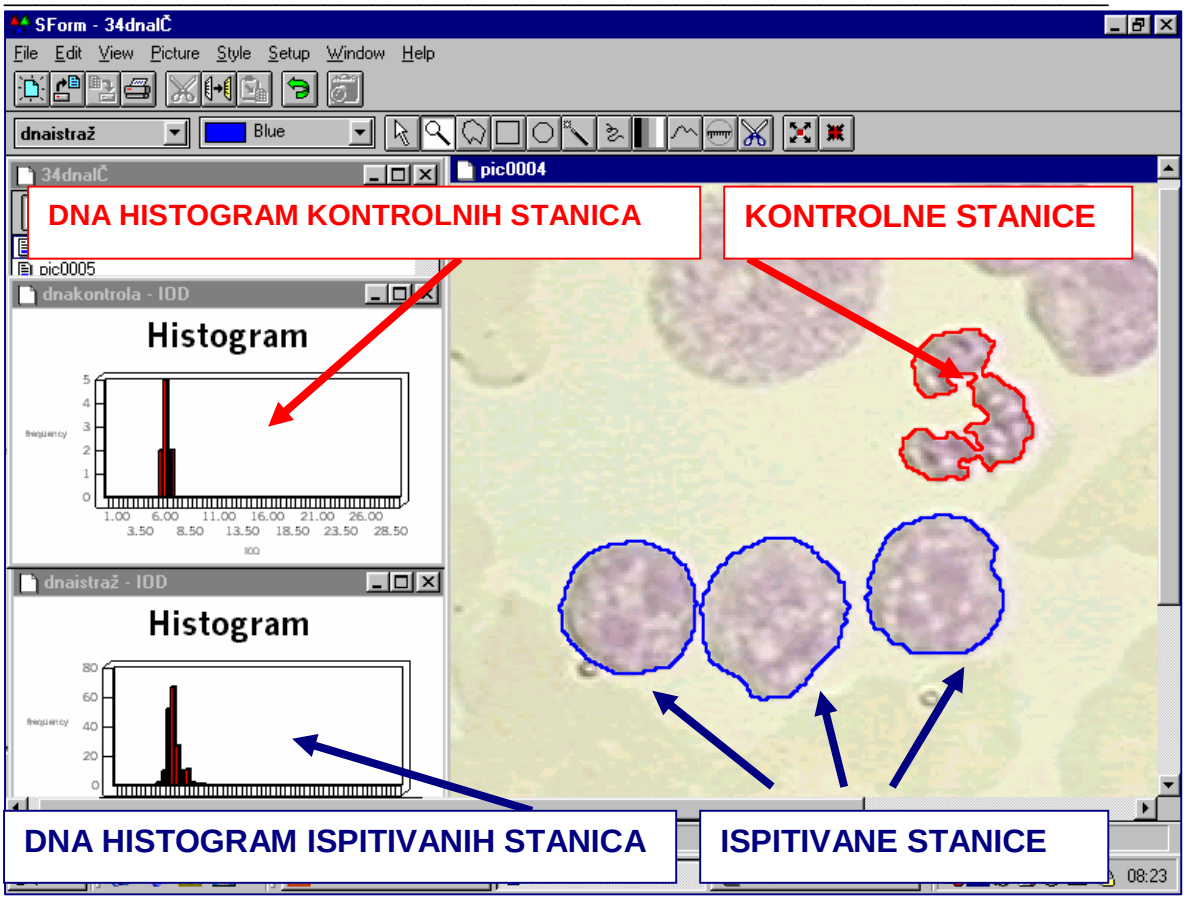
Međutim, kako su limfatične stanice bolesnika s KLLPB (naročito B-KLL) uglavnom diploidne stanice, koje se čak uzimaju kao kontrolne stanice u statičkoj DNA analizi tumora drugog biološkog podrijetla, u radu je korištena također vlastita modificirana metoda.

Elementi nove modificirane metode analize diploidnog tipa histograma primijenjena u ovom radu su *(slika 5):*

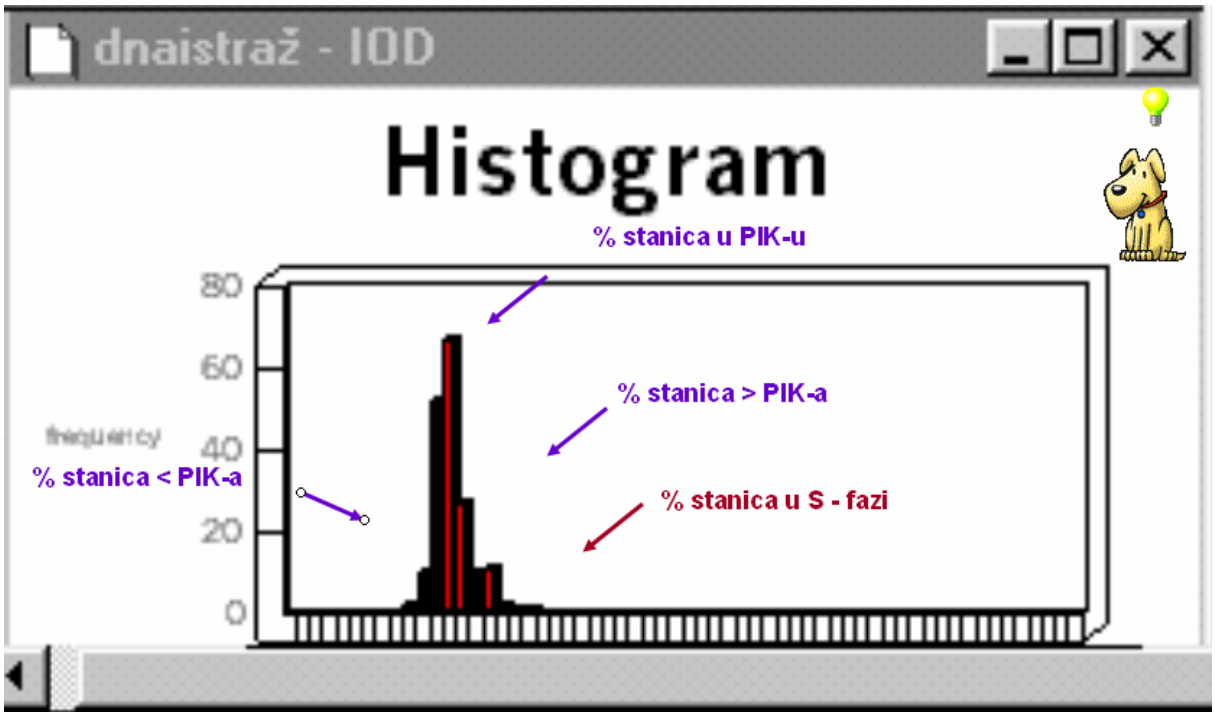
- udio stanica u vršku DNA histograma
- udio stanica koje sadrže manju količinu DNA od stanica u vršku DNA histograma
- udio stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica u vršku DNA histograma (uključuje i postotak stanica u S fazi i postotak stanica veći od 4N)

Analizirani su i postotak stanica u S fazi i postotak stanica veći od 4N.






Slika 4. Statička DNA citometrija




*Legenda: PIK-vršak DNA histograma*

Slika 5. Analiza diploidnog DNA histograma

Statistička obrada rezultata izvršena je uz pomoć kompjutorskog programa STATISTIKA 7.1.

#### 3.2.1.1. Opis varijabli

Za svaku kontinuiranu varijablu izračunati su osnovni opisni statistički pokazatelji (aritmetička sredina, geometrijska sredina, medijan, najmanja/najveća vrijednost aritmetičke sredine) i mjere varijabilnosti (koeficijent varijacije i standardna devijacija). Za svaku kontinuiranu varijablu procijenjen je oblik distribucije.

*Aritmetičkom sredinom (X)* je predstavljena mjera prosjeka, a *standardnom devijacijom (SD)* mjera varijabilnosti.[267]

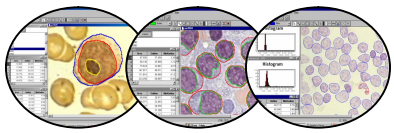
Određen je *medijan (Med)* kao mjera centralne tendencije i vrijednost koja se u nizu vrijednosti poredanih po veličini nalazi točno u sredini te *standardna greška (SG)* kao mjera odstupanja aritmetičkih sredina uzoraka iz jedne populacije od aritmetičkih sredina populacije.[267]

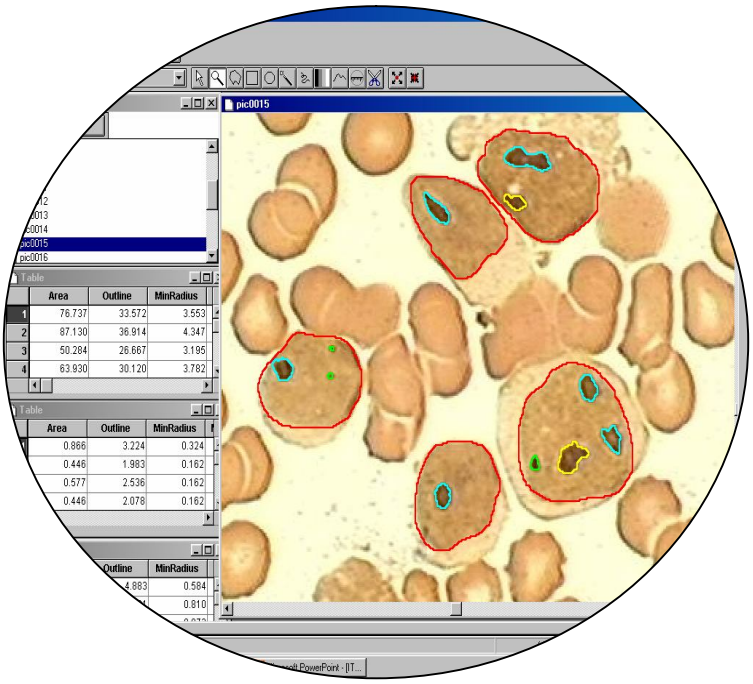
#### 3.2.2.2. Analiza povezanosti

*Spearman Rank testom* ispitana je povezanost svih kontinuiranih varijabli sustava.[267] *Mann-Whitney U-neparametrijskim testom* kao najosjetljivijim neparametrijskim testom je analizirana povezanost kontinuiranih varijabli u dvije grupe uz izračun temeljen na sumi rankova.[267] *Kruskal-Wallisovim testom*, također jednim od neparametrijskih testova, određena je vjerojatnost povezanosti kontinuiranih varijabli u tri ili više grupa.[268] *T-testom* su testirane razlike aritmetičkih sredina dvaju uzoraka.[267,268]

#### 3.2.2.3. Analiza preživljenja

Analiza preživljenja, kao model, je sveobuhvatna implementacija različitih tehnika za analizu cenzoriranih podataka. Dodatnim izračunavanjem tablica života raznim deskriptivnim statistikama i Kaplan-Meierovim procjenama, uspoređivano je preživljenje različitih skupina koristeći niz selekcijskih metoda (Gehan's Wilcoxonov test, Cox's-F test, Cox-Mantel test, Peto&Peto Wilcoxon test te Log-Rank Test).[268]




pic0015
pic0016
Table
Area
Outline
MinRadius
1 76.737 33.572 3.553
2 87.130 36.914 4.347
3 50.284 26.667 3.195
4 63.930 30.120 3.782
Table
Area
Outline
MinRadius
0.866 3.224 0.324
0.446 1.983 0.162
0.577 2.536 0.162
0.446 2.078 0.162
Outline
MinRadius
3.883 0.584
0.810

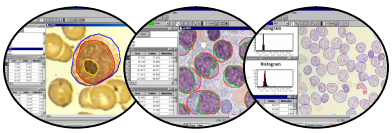
# 4. REZULTATI

U ovom radu analizirano je više od 70 000 individualnih podataka prikupljenih od 155 bolesnika s leukemijskim oblicima kroničnih limfoproliferativnih bolesti. Zbog toga su rezultati strukturirani tado da se nakon opisa populacije prikazuju međusobne korelacije ispitivanih pokazatelja dobivenih kompjuterskom analizom slike, a zatim se analiziraju povezanosti i/ili razlike u pojedinim kliničkim podgrupama. Nakon toga kao glavna analitička metoda korištena je prognostička analiza, kojom su evaluirani svi klinički, laboratorijski i pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike. Na kraju, na temelju prognostičke analize, predložen je novi prognostički pokazatelj, proliferacijsko kinetički indeks.

## 4.1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 129 novodijagnosticiranih i neliječenih ispitanika. Od 26 ranije dijagnosticiranih bolesnika, 12 nije dobivalo antitumorsku terapiju zbog limfoproliferativne bolesti, 9 ih je već bilo podvrgnuto terapijskom postupku, dok za 5 bolesnika nema podataka o ranijem liječenju.

Stariji bolesnici nalazili su se statistički značajno češće u skupini B-KLL (medijan dobi 63 godine) u usporedbi Ne-B-KLL, gdje je medijan bio 58 godina (p=0,000205) *(tablica 6).* Kada su se analizirale tipične B kronične limfatične leukemije i njene varijante (B-KLL+V) u odnosu na ostale kronične leukemijske varijante (Ne-B-KLL+V) također je nađena statistička značajnost u dobi ispitanika (p=0,000111). Od ukupno 90 muškaraca i 65 žena, analiza ispitanika unutar podskupina nije pokazala statistički značajnu razliku u raspodjeli ovih ispitanika po spolu (p=0,232674), odnosno bio je podjednak omjer muškaraca i žena u svim podskupinama KLLPB. Međutim, stariji bolesnici značajnije su se nalazili u skupini koji nisu uzimali terapiju u trenutku uključivanja u studiju (p=0,019247).



Tablica 6. Dob ispitanika s leukemijskim oblicima kronične limfoproliferativne bolesti (KLLPB) te podskupina: B-KLL, B-KLL+V, Ne-B-KLL, Ne-(B-KLL+V).

| DOB ISPITANIKA | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |
| ***DIJAGNOZA*** | **N** | | **X** | **Med** | **Min** | **Max** |
| **B-KLL+V** | 136 | | 62 | 63 | 36 | 91 |
| B-KLL | | 125 | 63 | 63 | 36 | 91 |
| **Ne-(B-KLL+V)** | 18 | | 52 | 46 | 31 | 76 |
| Ne-B-KLL | | 29 | 54 | 58 | 31 | 76 |
| **NEKLASIFIC.** | 1 | 1 | | | | |
| **KLLPB** | **155** | | **61** | **62** | **31** | **91** |

*Legenda: N-broj ispitanika; X-aritmetička sredina; Med-medijan; Min-minimalna vrijednost; Max-maksimalna vrijednost; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; B-KLL- B kronična limfocitna leukemija; B-KLL+V- B kronična limfocitna leukemija s varijantama; Ne-(B-KLL+V) – leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti bez B-kronične limfocitne leukemije s varijantama; Ne-B-KLL - leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti bez B-kronične limfocitne leukemije*

U trenutku uključivanja u studiju 57% ispitanika imalo je malu, a 43% veliku TTM, 53% bolesnika nalazilo se u kliničkom stadiju A i B po Binet-u, a 47% u stadiju C. Većina se nalazila u kliničkom stadiju 0, I ili II po Rai-u (52%), dok je 48% bolesnika bilo u stadiju III i IV .

Kod dijagnoze bolesti, povećani limfni čvorovi u medijastinumu nađeni su u svega 4% a «M» komponenta u 3% ispitanika. Normocelularan punktat koštane srži uočen je s istom učestalošću (52%) kod ispitanika s KLLPB i B-KLL+V, hipercelularnost također s istom učestalošću (42%) a vrlo rijetko se radilo o malom broju stanica u razmazima (hipocelularnost). Što se tiče zastupljenosti stanica trombocitnog reda, uredan nalaz je bio u 73% uzoraka, a čak u 1/5 megakariociti su bili slabije zastupljeni. Samo u jednom slučaju radilo se o značajnoj megakariocitozi u koštanoj srži, koja je rezultirala i trombocitozom u krvi. U 40% uzoraka bioptata koštane srži tip infiltracije limfatičnim stanicama je bio difuzan, 39% intersticijski i nodularan, 11% intersticijski te 10% difuzni i nodularni.

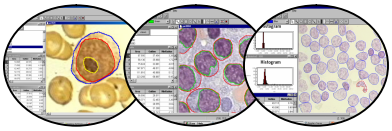
### *4.2.1. MEĐUSOBNI ODNOS POKAZATELJA MORFOMETRIJSKE ANALIZE, ANALIZE AgNOR-a I STATIČKE DNA CITOMETRIJE*

Morfometrijska i kinetička obilježja tumorskih stanica analizirana su međusobno u istog bolesnika u različitim odjeljcima tumorske mase: koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnim čvorovima *(prilog 1, 2 i 3*). Najviše statistički značajnih povezanosti našli smo u limfatičnim stanicama periferne krvi *(tablica 7)*.

Morfometrijske karakteristike stanice i jezgre su u negativnom odnosu s osobinama homogenih AgNOR-a, dok su osobine inhomogenih i prstenastih AgNOR-a te ukupni broj i površina svih AgNOR-a pozitivno povezani s veličinom, opsegom i drugim ispitivanim morfometrijskim karakteristikama stanice i jezgre.

Morfometrijske karakteristike stanice i jezgre u usporedbi s osobinama DNA histograma pokazuje određene zakonitosti. Ako su veće stanice i jezgre, veći je i postotak stanica koje sadrže DNA više od 4N.

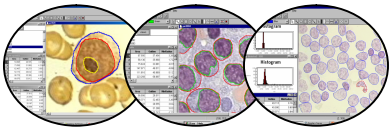
Homogeni AgNOR-i u perifernoj krvi su brojem i površinom veći ako je i postotak stanica u vršku DNA histograma veći, dok su istodobno inhomogeni AgNOR-i te ukupna površina svih AgNOR-a kao i omjer površine svih AgNOR prema jezgri veći ako je postotak stanica u vršku manji. Osobine broja i površine inhomogenih AgNOR-a su u pozitivnoj korelaciji s postotkom stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica u vršku, većim postotkom stanica koje sadrže više DNA od 4N, kao i većim postotkom stanica u S-fazi staničnog ciklusa. Istodobno veća površina svih AgNOR-a je u pozitivnoj korelaciji s postotkom stanica koje sadrže više DNA od 4N. Nasuprot inhomogenim, prstenasti AgNOR-i kao i omjer prstenastih prema jezgri su u obrnutom odnosu s postotkom stanica koje sadrže više od 4N DNA ili s postotkom stanica u S-fazi staničnog ciklusa.



Tablica 7. Spearman Rank korelacija između morfometrijskih karakteristika, osobina AgNOR-a i DNA histograma limfatičnih stanica u perifernoj krvi bolesnika s KLLPB

| Spearman Rank Order Correlations<br>Marked correlations are significant at p <,05000 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **PKAGSHOM/J** | **PKAGSINH** | **PKAGBPR** | **PKAGSUKUP** | **PKDNA%S>4N** |
| **PKMAS** | -0,260286 | 0,411878 | 0,002588 | 0,520050 | 0,268947 |
| **PKMOS** | -0,231187 | 0,354180 | 0,012462 | 0,460307 | 0,275398 |
| **PKMMIRS** | -0,368542 | 0,448534 | 0,020353 | 0,544974 | 0,112562 |
| **PKMMARS** | -0,182966 | 0,329715 | 0,003340 | 0,442939 | 0,251818 |
| **PKMCAS** | -0,248888 | 0,403110 | -0,007118 | 0,501597 | 0,275175 |
| **PKMLS** | -0,182006 | 0,339860 | 0,017222 | 0,462311 | 0,263830 |
| **PKMBS** | -0,286254 | 0,430247 | -0,048555 | 0,483728 | 0,262273 |
| **PKMFFS** | -0,042981 | 0,215071 | -0,202215 | 0,145684 | -0,197539 |
| **PKMFFIS** | 0,059096 | -0,104770 | 0,171132 | 0,027325 | 0,082753 |
| **PKMSUMAJ** | -0,279491 | 0,393216 | 0,040852 | 0,548648 | 0,219784 |
| **PKMN/C** | 0,115332 | -0,232022 | -0,012692 | -0,304874 | -0,238025 |
| **PKMAJ** | -0,278196 | 0,402067 | 0,040101 | 0,561257 | 0,213556 |
| **PKMOJ** | -0,236739 | 0,335393 | 0,054212 | 0,474752 | 0,208439 |
| **PKMMIRJ** | -0,303914 | 0,431375 | -0,013318 | 0,568312 | 0,100327 |
| **PKMMARJ** | -0,207181 | 0,328588 | 0,046781 | 0,456925 | 0,222009 |
| **PKMCAJ** | -0,269387 | 0,386452 | 0,045695 | 0,541008 | 0,219784 |
| **PKMLJ** | -0,220708 | 0,342407 | 0,052187 | 0,481641 | 0,234021 |
| **PKMBJ** | -0,299113 | 0,442396 | -0,016011 | 0,557040 | 0,187528 |
| **PKMFFJ** | -0,092078 | 0,238409 | -0,220167 | 0,190606 | -0,082530 |
| **PKMFFIJ** | -0,022398 | -0,020436 | 0,168168 | 0,042396 | 0,048050 |
| **PKDNADI** | -0,085971 | -0,027394 | 0,115021 | 0,181850 | |
| **PKDNA%SPIK** | 0,310507 | -0,487430 | 0,177307 | -0,419512 | |
| **PKDNA%S<PIK** | -0,074488 | -0,060322 | 0,086687 | 0,052160 | |
| **PKDNA%S>PIK** | -0,085378 | 0,330534 | -0,184509 | 0,201435 | |
| **PKDNA%S>4N** | 0,053809 | 0,411988 | -0,282203 | 0,317514 | |
| **PKDNA%SFC** | -0,104367 | 0,321613 | -0,324771 | 0,136893 | |

*Legenda: PK-periferna krv; MAS-površina stanice; MOS-opseg stanice; MIRS-minimalni polumjer stanice; MARS- maksimalni polumjer stanice; MCAS-površina konveksiteta stanice; MBS-širina stanice; MLS-duljina stanice; MFFIS- pravilnost stanice; MFFIS-izduženost stanice; MAJ-površina jezgre; MOJ-opseg jezgre; MIRJ-minimalni polumjer jezgre; MARJ-maksimalni polumjer jezgre; MCAJ-konveksitet površine jezgre; MLJ-duljina jezgre; MBJ-širina jezgre; MFFIJ - pravilnost jezgre; MFFIJ-izduženost jezgre; AGSINHOM-površina inhomogenih AgNOR-a; AGBPR-broj prstenastih AgNOR-a; AGSUKUP-ukupna površina svih AgNOR-a; AGHOM/J-omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre; DNADI-DNA indeks; DNA%SPIK-postotak stanica u vršku DNA histograma; DNA%S<PIK-postotak stanica koje sadrže manje DNA od stanica u vršku; DNA%S>PIK-postotak stanica koje sadrže više DNA od stanica u vršku; DNA%S>4N-postotak stanica koje sadrže više DNA od 4N; DNA%SFC-postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa*



## *4.2.2. RAZLIČITI ODJELJCI DISTRIBUCIJE TUMORSKE MASE*

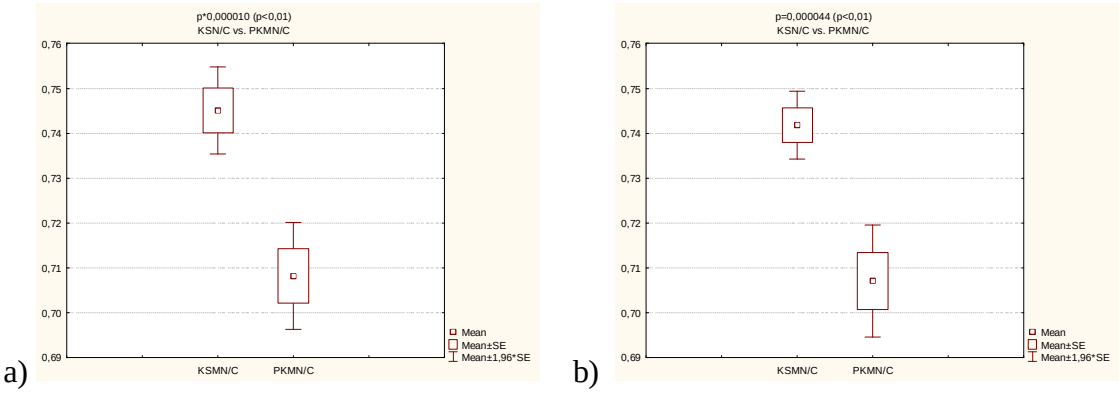
### 4.2.2.1. Koštana srž i periferna krv

Površina limfatičnih stanica i pravilnost jezgara istih je statistički značajno veća u PK nego u KS u ukupnoj populaciji KLLPB i subpopulaciji B-KLL+V, za razliku od omjera jezgre i citoplazme koji je manji u PK prema KS kod obje skupine (veće jezgre, odnosno manja citoplazma limfatičnih stanica u KS)*(slika 6) (tablica 8).*

Tablica 8. Statistički značajne razlike pokazatelja limfatičnih stanica koštane srži i periferne krvi

| VARIJABLE | KLLPB | | | B-KLL+V | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | KS X±SD | PK X±SD | p | KS X±SD | PK X±SD |
| **KSMAS # PKMAS (μm$^2$)** | 0,002273 | 90,62±16,70 | 99,79±22,93 | 0,005566 | 89,62±12,53 | 97,38±20,40 |
| **KSMFFJ # PKMFFJ** | 0,000275 | 0,82±0,02 | 0,84±0,02 | 0,000275 | 0,83±0,03 | 0,84±0,03 |
| **KSMN/C # PKMN/C** | 0,000010 | 0,74±0,04 | 0,70±0,06 | 0,000044 | 0,74±0,03 | 0,71±0,06 |

*Legenda: X-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; p-razina statističke značajnosti; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V- B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; MAS-površina stanice; MFFJ-pravilnost jezgre; MN/C-nukleo-citoplazmatski odnos*




Slika 6. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: omjera jezgre i citoplazme limfatičnih stanica koštane srži (KSMN/C) i periferne krvi (PKMN/C) ispitanika s KLLPB (a) i B-KLL+V (b) dobivenih t-testom uz razinu statističke značajnosti p<0,01.

### 4.2.2.2. Koštana srž i limfni čvor

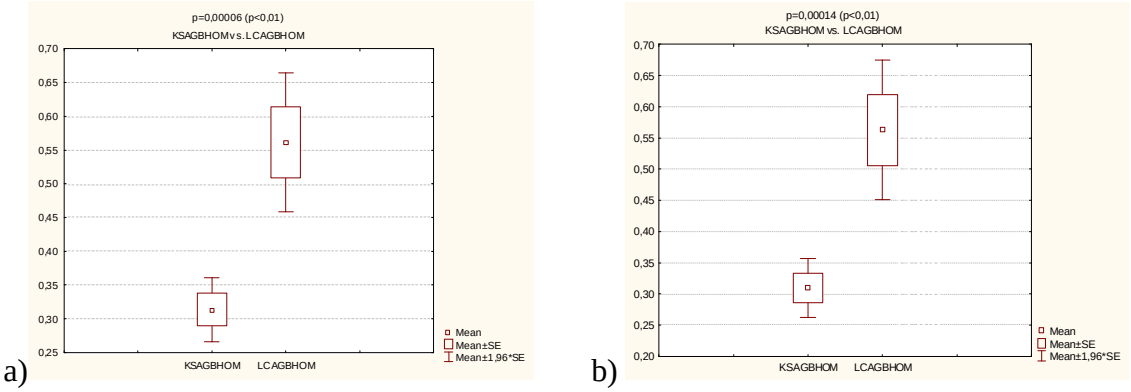
Koštana srž u odnosu na limfni čvor ima manji broj *(slika 7),* manju ukupnu, minimalnu, maksimalnu i prosječnu površinu homogenih AgNOR-a. U limfnom čvoru je manji broj

prstenastih AgNOR-a, veći broj ukupnih AgNOR-a, ali manji postotak stanica u vršku DNA histograma u ukupnoj populaciji KLLPB i KLL+V podskupini *(tablica 9).*

Tablica 9. Statistički značajne razlike pokazatelja limfatičnih stanica koštane srži i limfnog čvora

| VARIJABLE | KLLPB | | | B-KLL+V | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | KS X±SD | LC X±SD | P | KS X±SD | LC X±SD |
| **KSAGBHOM # LCAGBHOM** | 0,000006 | 0,31±0,19 | 0,56±0,33 | 0,000014 | 0,31±0,17 | 0,56±0,34 |
| **KSAGSHOM # LCAGSHOM** | 0,000046 | 0,26±0,16 | 0,44±0,26 | 0,000042 | 0,26±0,14 | 0,45±0,26 |
| **KSAGBPR # LCAGBPR** | 0,006717 | 0,46±0,24 | 0,33±0,22 | 0,003040 | 0,48±0,22 | 0,33±0,22 |
| **KSAGBUK # LCAGBUK** | 0,015294 | 1,42±0,23 | 1,55±0,32 | 0,0129114 | 1,43±0,16 | 1,54±0,35 |
| **KSDNA%SPIK # KSDNA%SPIK** | 0,010407 | 36,24±8,98 | 31,80±10,90 | 0,002434 | 37,56±7,76 | 32,08±11,36 |

*Legenda: X-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; p-razina statističke značajnosti; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; AGBHOM-broj homogenih AgNOR-a; AGSHOM-površina homogenih AgNOR-a; AGBPR-broj prstenastih AgNOR-a; AGBUK-ukupan broj AgNOR-a; KSDNA%SPIK-postotak stanica u vršku DNA histograma*

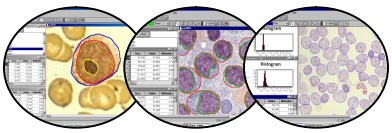



Slika 7. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: broja homogenih AgNOR-a limfatičnih stanica koštane srži (KSAGBHOM) i limfnog čvora (LCAGBHOM) ispitanika s KLLPB (a) i B-KLL+V (b) dobivenih t-testom uz razinu statističke značajnosti p<0,01.

### 4.2.2.3. Periferna krv i limfni čvor

Morfometrijski pokazatelji kao što su površina limfatičnih stanica te konveksitet površine stanice i jezgre u limfnom čvoru su statistički značajno manje nego u perifernoj krvi.

Osobine AgNOR-a kao što su broj i površina homogenih te njihov omjer u odnosu na jezgru manji su u perifernoj krvi. Broj prstenastih AgNOR-a, njihova ukupna površina *(slika 8)* te minimalna i maksimalna površina je veća u limfatičnim stanicama periferne krvi nego u limfnom čvoru *(tablica 10).*

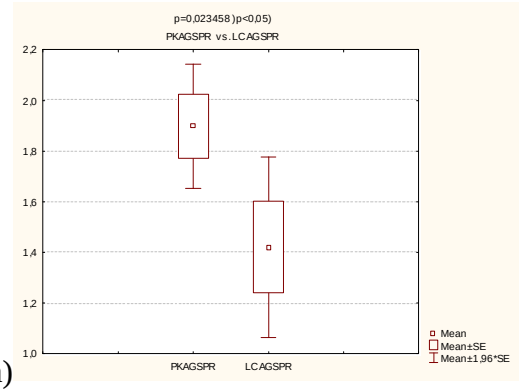


Postotak stanica u vršku DNA histograma *(slika 9)* je niži u limfnom čvoru nego u perifernoj krvi u obje ispitivane skupine.

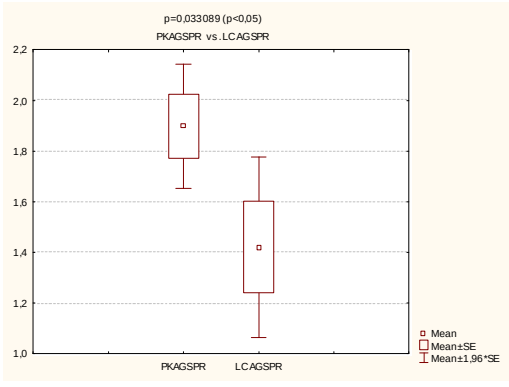
Tablica 10. Statistički značajne razlike pokazatelja limfatičnih stanica periferne krvi i limfnog čvora dobiveni komjuterskom analizom slike

| VARIJABLE | KLLPB | | | B-KLL+V | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | PK X±SD | LC X±SD | p | PK X±SD | LC X±SD |
| **PKMAS # LCMAS (μm$^2$)** | ,000143 | 99,79±22,93 | 86,10±15,35 | ,000627 | 97,38±20,40 | 85,73±11,90 |
| **PKMCAS # LCMCAS (μm$^2$)** | ,000005 | 102,56±24,37 | 88,22±15,92 | ,000002 | 100,06±22,01 | 87,75±12,27 |
| **PKAGBHOM # LCAGBHOM** | ,000576 | 0,31±0,33 | 0,56±0,33 | ,000243 | 0,29±0,20 | 0,56±0,34 |
| **PKAGSHOM # LCAGSHOM (μm$^2$)** | ,000576 | 0,28±0,22 | 0,44±0,26 | ,000246 | 0,27±0,20 | 0,45±0,26 |
| **PKAGHOM/J #LCAGHOM/J** | ,002918 | 0,004±0,003 | 0,01±0,02 | ,003708 | 0,004±0,003 | 0,01±0,03 |
| **PKAGBPR # LCAGBPR** | ,002943 | 0,48±0,26 | 0,33±0,22 | ,003685 | 0,49±0,27 | 0,30±0,22 |
| **PKAGSPR # LCAGSPR (μm$^2$)** | ,023458 | 1,90±0,26 | 1,44±1,13 | ,033089 | 1,90±1,07 | 1,42±1,08 |
| **PKAGPPR # LCAGPPR (μm$^2$)** | ,023458 | 1,93±1,11 | 1,36±1,08 | ,045500 | 1,90±0,97 | 1,33±1,01 |
| **PKAGMIPR # LCAGMIPR (μm$^2$)** | ,026769 | 1,79±1,01 | 1,35±1,07 | ,031885 | 1,75±0,96 | 1,32±1,00 |
| **PKAGMAPR # LCAGMAPR (μm$^2$)** | ,023417 | 1,84±1,04 | 1,38±1,08 | ,030083 | 1,80±0,99 | 1,35±1,02 |
| **PKDNA%SPIK # LCDNA%SPIK** | ,009674 | 36,75±10,47 | 31,80±10,90 | ,011876 | 37,50±10,75 | 32,08±11,36 |

*Legenda: X-aritmetička sredina; SD-standardna devijacija; p-razina statističke značajnosti; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; MAS-površina limfatične stanice; MCAS-površina konveksiteta limfatične stanice; AGBHOM-broj homogenih AgNOR-a; AGSHOM-površina homogenih AgNOR-a; AGHOM/J-omjer površine homogenih AgNOR-a prema jezgri; AGBPR-broj prstenastih AgNOR-a; AGSPR-površina prstenastih AgNOR-a; AGSPPR-prosječna površina prstenastih AgNOR-a AGMIPR-minimalna površina prstenastih AgNOR-a; AGMAPR-maksimalna površina prstenastih AgNOR-a; KSDNA%SPIK-postotak stanica u vršku DNA histograma*

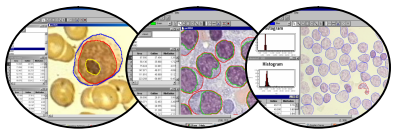


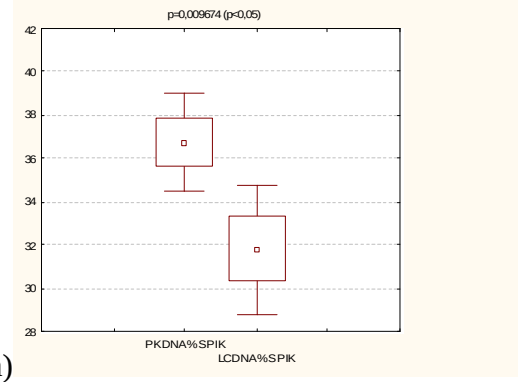

a)



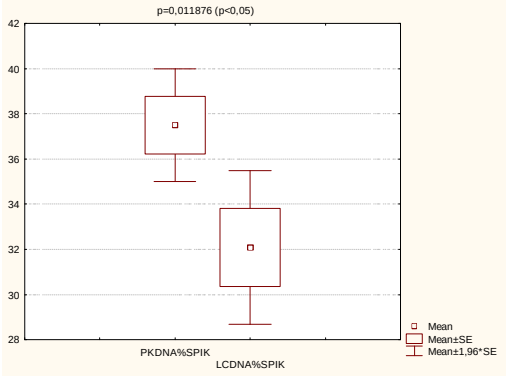

b)

Slika 8. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: površine prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica periferne krvi (PKAGSPR) i limfnog čvora (LCAGSPR) ispitanika s KLLPB (a) i B-KLL+V (b) dobivenih t-testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.






a)




b)

Slika 9.Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: postotak stanica u vršku DNA histograma limfatičnih stanica periferne krvi (PKDNA%PIK) i limfnog čvora (LCDNA%PIK) ispitanika s KLLPB (a) i B-KLL+V (b) dobivenih t-testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.

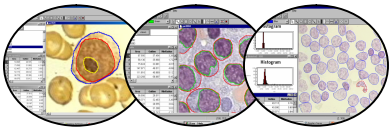
### *4.2.3. VELIČINA TUMORSKE MASE I POKAZATELJI DOBIVENI KOMPJUTERSKOM ANALIZOM*

#### 4.2.3.1. Klinički stadij bolesti po Binet-u

Analizirajući pokazatelje dobivene kompjuterskom analizom slike, unutar kliničkih stadija po Binet-u uočava se kako je omjer jezgre i citoplazme najveći u II stadiju *(slika 10a),* jezgre limfatičnih stanica periferne krvi i koštane srži u višim stadijima bolesti postaju okruglije (faktor izduženosti jezgara u KS i PK se smanjuje) *(slika 10b).* Suprotno tome zajednički zbroj prstenastih i inhomogenih AgNOR-a kao i ukupan broj AgNOR-a se povećava *(tablica 11)(slika 11)*.

Odnos jezgre i citoplazme; odnos površine homogenih AgNOR-a i površine jezgara te broj homogenih AgNOR-a u limfatičnih stanica KS je najveći u II stadiju bolesti, a najmanji u prvom. Postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa limfatičnih stanica najmanji je u II stadiju, a najveći u III stadiju.

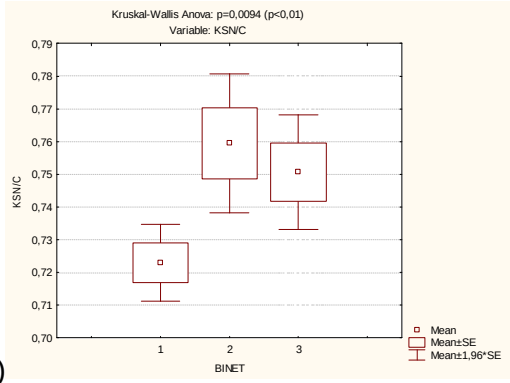
U subpopulaciji B-KLL+V statistički su povezane samo varijable: omjer jezgra/citoplazma u koštanoj srži; postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa; faktor pravilnosti jezgara te ukupni broj prstenastih i inhomogenih AgNOR-a u PK.



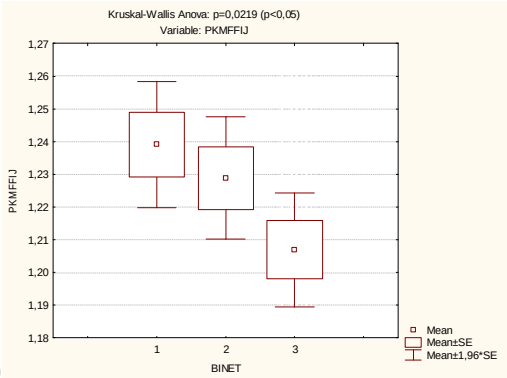
Tablica 11. Statistički značajni kvantitativni pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani s kliničkim stadijem bolesti po Binet-u, ispitanika s KLLPB i B-KLL+V (Kruskal-Wallis Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

| ISPITIVANE VARIJABLE | KLINIČKI STADIJI PO BINET-u | |
|---|---|---|
| | KLLPB<br>p | B-KLL+V<br>p |
| **KSN/C** | 0,0094 | 0,0255 |
| **KSMFFIJ** | 0,0219 | NS |
| **KSAGBHOM** | 0,0442 | NS |
| **KSAGSHOM/J** | 0,0448 | NS |
| **KSDNA%SFC** | 0,0398 | 0,0070 |
| **PKMFFIJ** | 0,0219 | 0,0278 |
| **PKAGBPRINH** | 0,0268 | 0,0208 |
| **PKAGBUKUP** | 0,0264 | NS |

*Legenda: p-razina statističke značajnosti; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; N/C-omjer jezgre i citoplazme; MFFIJ-faktor izduženosti jezgre; AgNOR-srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije; AGBHOM-broj homogenih AgNOR-a; AGSHOM/J-omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre; DNA%SFC-postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa; AGBPRINH-ukupan broj prstenastih i homogenih AgNOR-a; AGBUKUP-ukupan broj svih AgNOR-a*

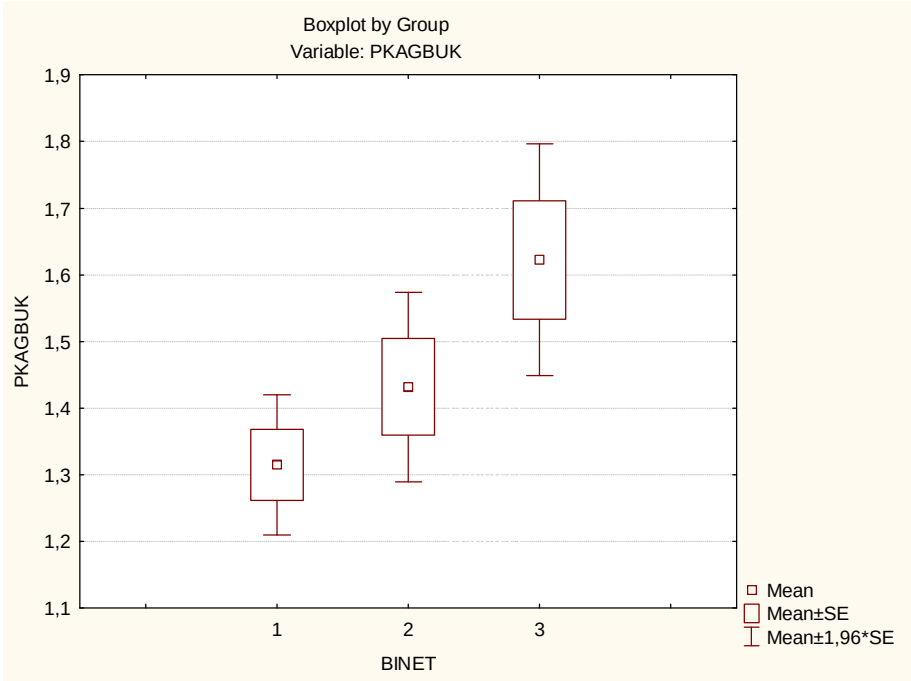



a)




b)

Slika 10. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: (a) omjera jezgre i citoplazme limfatičnih stanica koštane srži i (b) faktora izduženosti jezgara limfatičnih stanica periferne krvi u odnosu na stadij bolesti po Binet-u, ispitanika s KLLPB, dobivenih Kruskal-Wallis - neparametrijskim testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.




*Slika 11.*Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: ukupni omjer površine AgNOR-a prema jezgri limfatičnih stanica periferne krvi (PKAGBUK) bolesnika s KLLPB u odnosu na stadij bolesti po Binet-u (1, 2 i 3), dobivenih Kruskal-Wallis - neparametrijskim testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.

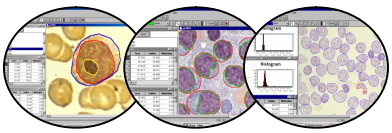
### 4.2.3.2. Klinički stadij bolesti po Rai-u

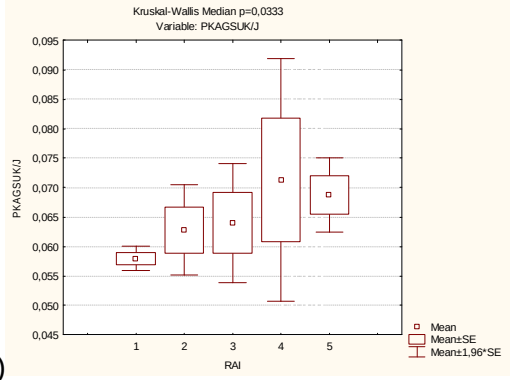
U ukupnoj populaciji KLLPB u klinički većim stadijima bolesti po Rai-u jezgre stanica postaju okruglije (izuzetak je nulti stadij bolesti) u KS i PK, dok omjer ukupne površine AgNOR-a i jezgre *(slika 12a)* u perifernoj krvi raste sa stadijem bolesti. U podskupini B-KLL+V značajan je DNA indeks u koštanoj srži, omjer ukupne površine AgNOR-a i jezgre *(slika 12b)* te faktor izduženosti jezgre u PK *(tablica 12).*

Tablica 12. Statistički značajni kvantitativni pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani s kliničkim stadijem bolesti po Rai-u, ispitanika s KLLPB i B-KLL+V (Kruskal-Wallis Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

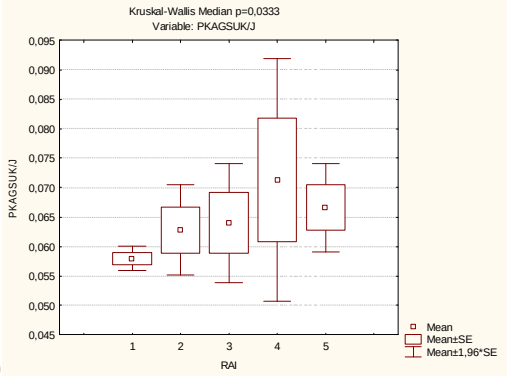
| **ISPITIVANE VARIJABLE** | **KLINIČKI STADIJI PO Rai-u** | |
|---|---|---|
| | **KLLPB p** | **B-KLL+V p** |
| **KSMFFIJ** | 0,0365 | NS |
| **PKMFFIJ** | 0,0369 | 0,0415 |
| **PKAGSUK/J** | 0,0333 | NS |
| **KSDNAI** | NS | 0,0322 |

*Legenda: p-razina statističke značajnosti; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; MFFIJ-faktor izduženosti jezgre; AGSUK/J-omjer ukupne površine svih AgNOR-a i jezgre; DNADI-DNA indeks*






a)




b)

Slika 12. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih varijabli: ukupni omjer površine AgNOR-a prema jezgri limfatičnih stanica periferne krvi (PKAGSUK/J) bolesnika s (a) KLLPB i (b) B-KLL+V u odnosu na stadij bolesti po Rai-u, dobivenih Kruskal-Wallis - neparametrijskim testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.

### 4.2.3.3. Povećanje limfnih čvorova

Veličina limfnih čvorova u statistički je značajnoj korelaciji s postotkom stanica većim od 4N u limfatičnim stanicama PK i LČ samo u ukupnoj populaciji KLLPB *(tablica 13).*

Tablica 13. Statistički značajni kvantitativni pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani s tumorskom masom 2 ($TM_2$) ispitanika s KLLPB i B-KLL+V (Kruskal-Wallis Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

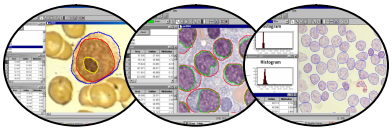
| **ISPITIVANE VARIJABLE** | **ORGANOMEGALIJA** | |
|---|---|---|
| | **KLLPB p** | **B-KLL+V p** |
| **PKDNA%S>4N** | 0,0063 | NS |
| **LCDNA%S<4N** | 0,0404 | NS |

*Legenda: p-razina statističke značajnosti; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; LČ-limfni čvor; DNA%S>4N-postotak stanice s količinom DNA većom od 4 N*

### 4.2.3.4. Ukupna (totalna) tumorska masa po Jakšiću

Veliki broj ispitivanih pokazatelja dobivenih kompjuterskom analizom slike, pokazuje statistički značajnu povezanost s veličinom tumorske mase po Jakšiću. Veliku tumorsku masu (engl. *high total tumor mass* – HTTM) karakteriziraju okruglije stanice i jezgre limfatičnih stanica periferne krvi (manji faktor izduženosti), stanice s manjim najvećim polumjerom te nepravilnije stanice u limfnom čvoru *(tablica 14).*

Nasuprot tome mala tumorska masa (engl. *low total tumor mass* – LTTM) statistički korelira osim s visokim omjerom jezgra/citoplazma u perifernoj krvi još s čitavim nizom



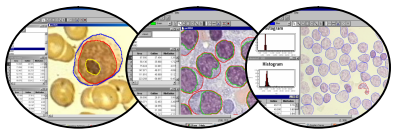
osobina regije nukleolarne organizacije u perifernoj krvi i limfnim čvorovima: manjom površinom kao i minimalnom i prosječnom vrijednosti površine inhomogenih AgNOR-a u perifernoj krvi. Isto tako, manjim brojem, površinom, prosječnom, minimalnom i maksimalnom vrijednosti površine te manjim omjerom prstenastih AgNOR-a u odnosu na jezgru; manjom ukupnom površinom svih AgNOR-a i manjim omjerom ukupne površine svih AgNOR-a u odnosu na površinu jezgre u limfatičnim stanicama limfnog čvora *(slika 13).*

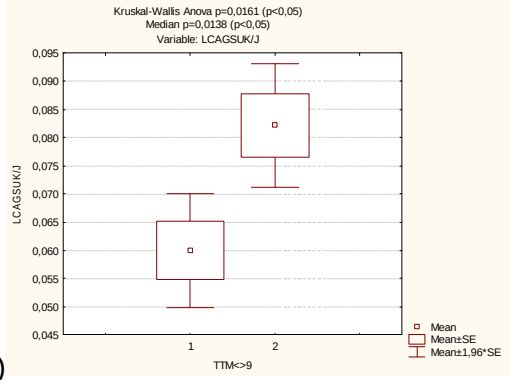
Zanimljivo je uočiti da su uz pokazatelje proliferacije kao što su: veći postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa te veći postotak stanica s patološkim mitozama (>4N), visoka TTM najviše je karakterizirana prstenastim AgNOR-ima i većom ukupnom površinom i omjerom površine i jezgre ukupnih AgNOR-a.

Tablica 14. Statistički značajni kvantitativni pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani s ukupnom (totalnom) tumorskom masom (TMM) ispitanika s KLLPB i B-KLL+V (Kruskal-Wallis Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

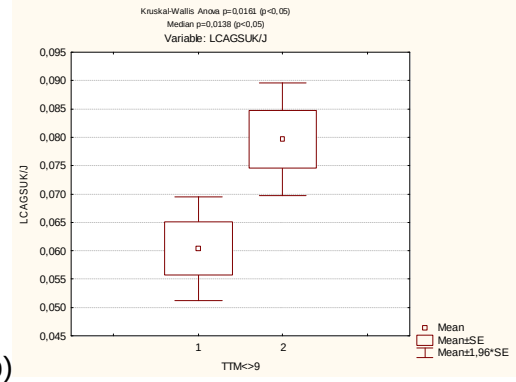
| ISPITIVANE VARIJABLE | KLLPB | | | B-KLL+V | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | LTTM Med | HTTM Med | p | LTTM Med | HTTM Med |
| **PKMMARS (µm)** | 0,0181 | 6,60 | 6,10 | 0,0369 | 6,60 | 6,31 |
| **PKMFFIS** | 0,0206 | 1,22 | 1,17 | NS | | |
| **PKMN/C** | 0,0005 | 0,68 | 0,74 | 0,0034 | 0,68 | 0,74 |
| **PKAGSINH (µm$^2$)** | 0,0364 | 2,00 | 2,50 | NS | | |
| **PKAGMIINH (µm$^2$)** | 0,0281 | 1,80 | 2,20 | NS | | |
| **PKAGPINH (µm$^2$)** | 0,0281 | 1,700 | 2,10 | NS | | |
| **PKDNA%S>4N** | 0,0193 | 0,00 | 0,65 | 0,0405 | 0,00 | 0,58 |
| **PKDNA%SFC** | 0,0060 | 6,10 | 9,60 | 0,0261 | 6,20 | 9,60 |
| **LCMFFS (µm)** | 0,0405 | 0,842 | 0,832 | NS | | |
| **LCAGBPR** | 0,0459 | 0,22 | 0,39 | 0,0225 | 0,27 | 0,42 |
| **LCAGSPR (µm$^2$)** | 0,0282 | 0,80 | 1,60 | 0,0099 | 0,90 | 1,60 |
| **LCAGPPR (µm$^2$)** | 0,0282 | 0,60 | 1,50 | 0,0099 | 0,80 | 1,55 |
| **LCAGMIPR (µm$^2$)** | 0,0282 | 0,60 | 1,50 | 0,0099 | 0,80 | 1,55 |
| **LCAGMAPR (µm$^2$)** | 0,0282 | 0,70 | 1,50 | 0,0099 | 0,90 | 1,60 |
| **LCAGSPR/J** | 0,0443 | 0,012 | 0,027 | 0,0237 | 0,014 | 0,028 |
| **LCAGSUKUP (µm$^2$)** | 0,0125 | 3,80 | 5,30 | 0,0038 | 3,80 | 5,40 |
| **LCAGSUK/J** | 0,0161 | 0,060 | 0,068 | 0,0124 | 0,060 | 0,068 |
| **LCDNA%S>4N** | 0,0200 | 0,00 | 2,80 | NS | | |

*Legenda: LTTM-mala tumorska masa; HTTM-visoka tumorska masa; p-razina statističke značajnosti; NS-statistički neznačajno; Med-median vrijednosti ispitivanih pokazatelja; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; MMARS-maksimalni polumjer stanice; MFFIS-faktor izduženosti stanice; N/C-omjer jezgre i citoplazme; MMFIJ-faktor izduženosti jezgre; AGSINH-površina inhomogenih AgNOR-a; AGMIINH-minimalna površina inhomogenih AgNOR-a; AGPINH-prosječna površina inhomogenih AgNOR-a; DNA%S>4N-postotak stanica koje sadrže DNA više od 4N; PKDNA%SFC-postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa; MFFS-faktor pravilnosti stanice; AGBPR-broj prstenastih AgNOR-a; AGSPR-površina prstenastih AgNOR-a; AGPPR-prosječna površina prstenastih AgNOR-a; AGSMIPR-minimalna površina prstenastih AgNOR-a; AGSMAPR-maksimalna površina prstenastih AgNOR-a; AGSPR/J-omjer površine prstenastih AgNOR-a i jezgre; AGSUKUP-ukupna površina svih AgNOR-a; AGSUK/J-omjer ukupne površine svih AgNOR-a i jezgre*






a)




b)

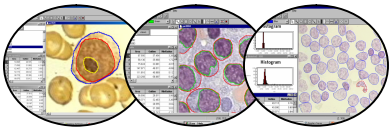
Slika 13. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: omjera površine AgNOR-a i površine jezgara limfatičnih stanica limfnog čvora (LCAGSUK/J) bolesnika s KLLPB (a) i B-KLL+V (b) u odnosu TTM, dobivenih Kruskal-Wallis - neparametrijskim testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.

### *4.2.4. BIOLOŠKO PONAŠANJE/PROGRESIJA BOLESTI I POKAZATELJI DOBIVENI KOMPJUTERSKOM ANALIZOM*

#### 4.2.4.1. Udvostručenje tumorske mase u mjesecima

Kod kraćeg vremena udvostručenje tumorske mase (<12 mjeseci) uočeno je kako je površina stanice manja kao i njihova minimalna vrijednost te širina u koštanoj srži. Manje su vrijednosti površine, opsega, minimalna i maksimalna vrijednost, konveksitet, duljina i širina jezgara limfatičnih stanica u koštanoj srži (akumulacija indolentnih stanica).

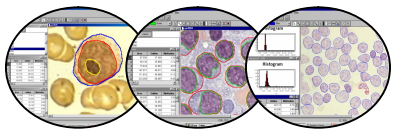
Stabilnija je bolest (DTM>12 mjeseci) ako su stanice s manjim brojem, površinom, maksimalnom i minimalnom vrijednosti homogenih AgNOR-a u koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnom čvoru. Limfatične stanice koštane srži i periferne krvi imaju i manji zbroj homogenih i inhomogenih, periferne krvi još i manji omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre i manju površinu *(slika 14)* homogenih i prstenastih AgNOR-a, dok je u limfnom čvoru manji postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa *(tablica 15).*

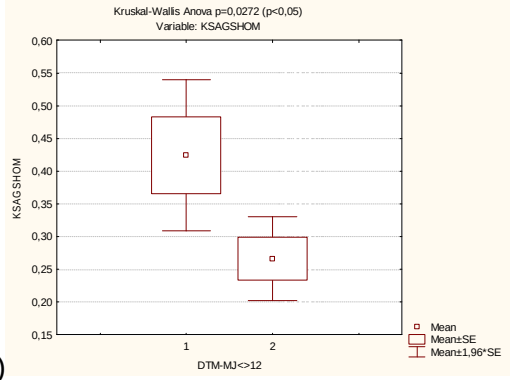


Tablica 15. Statistički značajni kvantitativni pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani s udvostručenjem tumorske mase (DTM<>12) za 12 mjeseci, ispitanika s KLLPB i B-KLL+V (Kruskal-Wallis Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

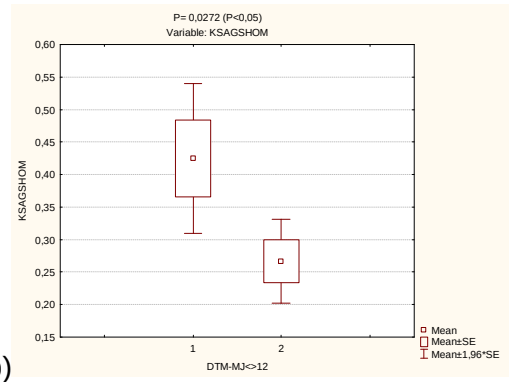
| ISPITIVANE VARIJABLE | KLLPB | | | B-KLL+V | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | P vrijednost | Med | | P vrijednost | Med | |
| | | DTM <12 M | DTM >12 M | | DTM <12 M | DTM >12 M |
| **KSMAS (μm$^2$)** | 0,0475 | 90,00 | 99,00 | 0,0475 | 79,00 | 90,00 |
| **KSMIRS (μm)** | 0,0039 | 4,13 | 4,42 | 0,0039 | 4,12 | 4,42 |
| **KSMBS (μm)** | 0,0105 | 9,40 | 10,18 | 0,0105 | 9,40 | 10,15 |
| **KSMAJ (μm$^2$)** | 0,0132 | 57,50 | 67,00 | 0,0132 | 57,50 | 67,00 |
| **KSMOJ (μm)** | 0,0166 | 29,60 | 31,80 | 0,0166 | 29,50 | 31,80 |
| **KSMIRJ (μm)** | 0,0146 | 3,50 | 3,65 | 0,0146 | 3,50 | 3,65 |
| **KSMARJ (μm)** | 0,0318 | 5,00 | 5,35 | 0,0318 | 5,00 | 5,35 |
| **KSMCAJ (μm)** | 0,0132 | 59,00 | 68,50 | 0,0132 | 59,00 | 68,50 |
| **KSMLJ (μm)** | 0,0318 | 9,50 | 10,15 | 0,0318 | 9,50 | 10,15 |
| **KSMBJ (μm)** | 0,0082 | 7,88 | 8,45 | 0,0082 | 7,88 | 8,45 |
| **KSAGBHOM** | 0,0272 | 0,52 | 0,28 | 0,0272 | 0,52 | 0,28 |
| **KSAGSHOM (μm$^2$)** | 0,0272 | 0,42 | 0,28 | 0,0272 | 0,42 | 0,28 |
| **KSAGMAHOM (μm$^2$)** | 0,0474 | 0,33 | 0,23 | 0,0474 | 0,33 | 0,23 |
| **KSAGHOM/J** | 0,0361 | 0,009 | 0,005 | 0,0361 | 0,009 | 0,005 |
| **PKAGBHOM** | 0,0348 | 0,43 | 0,22 | 0,0348 | 0,42 | 0,22 |
| **PKAGSHOM (μm$^2$)** | 0,0497 | 0,33 | 0,19 | 0,0497 | 0,35 | 0,18 |
| **PKAGPHOM (μm$^2$)** | 0,0497 | 0,27 | 0,17 | 0,0497 | 0,26 | 0,17 |
| **PKAGMIHOM (μm$^2$)** | 0,0497 | 0,25 | 0,17 | 0,0497 | 0,25 | 0,17 |
| **PKAGMAHOM (μm$^2$)** | 0,0497 | 0,27 | 0,17 | 0,0497 | 0,27 | 0,17 |
| **PKAGSHOM/J** | 0,0497 | 0,008 | 0,003 | 0,0497 | 0,008 | 0,003 |
| **PKAGBHOMPR** | 0,0497 | 0,82 | 0,68 | 0,0497 | 0,82 | 0,68 |
| **LCAGBHOM** | 0,0455 | 0,95 | 0,46 | 0,0455 | 0,96 | 0,46 |
| **LCAGSHOM (μm$^2$)** | 0,0455 | 0,57 | 0,38 | 0,0455 | 0,58 | 0,39 |
| **LCAGPHOM (μm$^2$)** | 0,0455 | 0,32 | 0,24 | 0,0455 | 0,32 | 0,24 |
| **LCAGMIHOM (μm$^2$)** | 0,0455 | 0,29 | 0,22 | 0,0455 | 0,29 | 0,22 |
| **LCAGMAHOM (μm$^2$)** | 0,0455 | 0,43 | 0,27 | 0,0455 | 0,36 | 0,26 |
| **LCDNA%SFC** | 0,0420 | 10,00 | 4,50 | 0,0420 | 10,00 | 4,50 |

*Legenda: DTM-udvostručenje tumorske mase u mjesecima; M-mjeseci; p-razina statističke značajnosti; Med-median vrijednosti ispitivanih pokazatelja; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; MAS-površina stanice; MIRS-minimalni polumjer stanice; MBS-širina stanice; MAJ-površina jezgre; MOJ-opseg jezgre; MIRJ-minimalni polumjer jezgre; MARJ-maksimalni polumjer jezgre; MCAJ-konveksitet površine jezgre; MLJ-duljina jezgre; MBJ-širina jezgre; AGBHOM-broj homogenih AgNOR-a; AGSHOM-površina homogenih AgNOR-a; AGMIHOM-minimalna površina homogenih AgNOR-a; AGMAHOM-maksimalna površina homogenih AgNOR-a; AGHOM/J-omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre; AGBHOMPR-ukupan boj homogenih i prstenastih AgNOR-a; DNA%SFC-postotak stanica u S fazi staničnog ciklusa*






a)



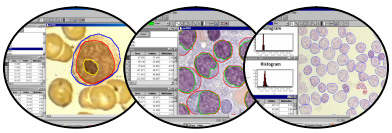

b)

Slika 14. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: površine homogenih AgNOR-a jezgara limfatičnih stanica koštane srži (KSAGSHOM) bolesnika s KLLPB (a) i B-KLL+V (b) u odnosu na udvostručenje ukupne tumorske mase (DTM) u mjesecima, dobivenih Kruskal-Wallis - neparametrijskim testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.

#### 4.2.4.2. Udvostručenje apsolutnog broja limfocita u mjesecima

Slabiju progresiju apsolutnog broja limfocita imaju bolesnici čije patološke stanice imaju manju duljinu u koštanoj srži i faktor izduženosti stanica u perifernoj krvi, manju površinu, manju minimalnu i maksimalnu vrijednost, manji opseg, konveksitet, dužinu i širinu stanice te manji maksimalni polumjer jezgre limfatičnih stanica u limfnom čvoru.

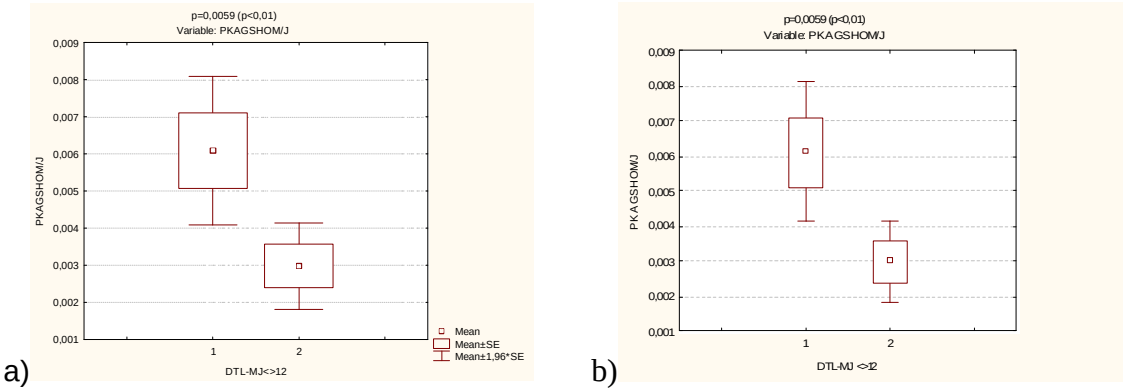
Od osobina AgNOR-a stabilnost se očituje manjim brojem, površinom, prosječnom, minimalnom i maksimalnom vrijednosti homogenih AgNOR-a te manjim omjerom površine istih po jezgri limfatičnih stanica u perifernoj krvi *(slika 15).* U isto vrijeme i u limfnom čvoru broj homogenih AgNOR-a pojedinačno i u zbroju s prstenastim AgNOR-ima je niži ako limfocitoza ne pokazuje brzi rast *(tablica 16).*



Tablica 16. Statistički značajni kvantitativni pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani s udvostručenjem limfocitoze (DTL<>12) za 12 mjeseci, ispitanika s KLLPB i B-KLL+V (Kruskal-Wallis Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

| ISPITIVANE VARIJABLE | KLLPB | | | B-KLL+V | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | Med | | p | Med | |
| | | DTL<12 M | DTL>12 M | | DTL<12 M | DTL>12 M |
| **KSMLS** | 0,0487 | 12,10 | 11,60 | 0,0487 | 12,10 | 11,60 |
| **PKMMFFIS** | 0,0447 | 1,25 | 1,17 | 0,0447 | 1,25 | 1,17 |
| **PKAGBHOM** | 0,0221 | 0,31 | 0,18 | 0,0221 | 0,31 | 0,19 |
| **PKAGSHOM** | 0,0298 | 0,29 | 0,14 | 0,0298 | 0,29 | 0,14 |
| **PKAGPHOM** | 0,0397 | 0,26 | 0,14 | 0,0397 | 0,27 | 0,14 |
| **PKAGMIHOM** | 0,0397 | 0,24 | 0,14 | 0,0397 | 0,25 | 0,14 |
| **PKAGMAHOM** | 0,0345 | 0,28 | 0,14 | 0,0345 | 0,28 | 0,15 |
| **PKAGSHOM/J** | 0,0059 | 0,006 | 0,002 | 0,0059 | 0,006 | 0,002 |
| **PKDNA%S>PIK** | 0,0312 | 41,00 | 29,00 | 0,0312 | 41,00 | 30,00 |
| **LCMAS** | 0,0184 | 90,00 | 73,00 | 0,0184 | 90,00 | 73,00 |
| **LCMOS** | 0,0133 | 36,90 | 32,90 | 0,0133 | 36,90 | 32,90 |
| **LCMIRS** | 0,0184 | 4,29 | 3,89 | 0,0184 | 4,28 | 3,89 |
| **LCMCAS** | 0,0133 | 92,00 | 74,00 | 0,0133 | 92,00 | 74,00 |
| **LCMLS** | 0,0339 | 11,56 | 10,58 | 0,0339 | 11,57 | 10,58 |
| **LCMBS** | 0,0339 | 9,81 | 8,79 | 0,0339 | 9,81 | 8,79 |
| **LCMARJ** | 0,0451 | 5,40 | 4,92 | 0,0451 | 5,40 | 4,92 |
| **LCAGBHOM** | 0,0415 | 0,84 | 0,43 | 0,0415 | 0,84 | 0,46 |

*Legenda: p-razina statističke značajnosti; Med-median vrijednosti ispitivanih pokazatelja; NS-statistički neznačajno; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; BKLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; AgNOR-srebrom prikazana regija nukleolarne organizacije; MLS-duljina stanice; MMFFIS-faktor izduženosti stanice; AGBHOM-broj AgNOR-a; AGSHOM-površina homogenih AgNOR-a; AGPHOM-prosječna površina homogenih AgNOR-a; AGMIHOM-minimalna površina homogenih AgNOR-a; AGMAHOM-maksimalna površina homogenih AgNOR-a; PKAGSHOM/J-omjer površine homogenih AgNOR-a i jezgre; DNA%S>PIK-postotak stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica u vršku; MAS-površina stanice; MOS-opseg stanice; MIRS-minimalni polumjer stanice; MCAS-konveksitet površine stanice; MBS-širina stanice; N/C-nukleo-citoplazmatski omjer; MAJ-površina jezgre*



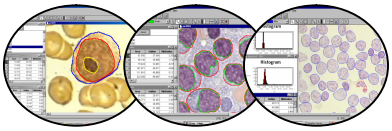

Slika 15. Grafički prikaz statistički značajnih kvantitativnih pokazatelja: omjera površine homogenih AgNOR-a u odnosu na jezgru limfatičnih stanica periferne krvi (PKAGSHOM/J) bolesnika s (a) KLLPB i (b) B-KLL+V u odnosu na udvostručenje limfocitoze (DTL), dobivenih Kruskal-Wallis - neparametrijskim testom uz razinu statističke značajnosti p<0,05.

DTM i DTL su izračunati su kod niske tumorske mase u bolesnika kod nije bila potrebna antitumorska terapija. Limfatične stanice u tih bolesnika su sadržavale uglavnom male homogene AgNOR-e, bez inhomogenih i prstenastih oblika. Interesantan nalaz je da su faktori progresivnosti bolesti (DTM i DTL) u tom slučaju bili povezani i s homogenim AgNOR-ima (koji su karakteristični za slabo proliferativne stanice). Logičan slijed razmišljanja je kako su kod niske tumorske mase prisutne nisko proliferativne stanice, koje se onda međusobno razlikuju po proliferativnosti brojem i površinom homogenih AgNOR-a. S druge strane moguće je i tumačenje da postoje i tzv. granični AgNOR-i između homogenih i inhomogenih, koji su veći od tipičnih homogenih AgNOR-a, a dostupnim metodama nije moguće uočiti inhomogenost unutar strukture. Takvi AgNOR-i (veći površinom i opsegom) od tipičnih homogenih predstavljaju proliferativnost stanica.

Drugo zapažanje odnosi se na različitost parametara DTM i DTL. Dok se kod DTM statistički značajni pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike nalaze u limfatičnim stanicama koštane srži, periferne krvi i limfnog čvora, dotle kod DTL statistički značajni pokazatelji su većinom u limfatičnim stanicama periferne krvi, manje u limfnom čvoru, a izrazito rijetko u koštanoj srži.

### *4.2.5. POVEZANOST ISPITIVANIH POKAZATELJA S DOBI I SPOLOM*

Mann Whitney U-testom ispitana je statistička značajnost kvantitativnih pokazatelja povezanih s dobi i spolom bolesnika. Uočeno je da je vrijednost bilirubina, veličina limfnih čvorova na vratu te udvostručenje limfocitoze u perifernoj krvi (DTL) manji u grupi starijih bolesnika (>60 godina) *(tablica 17).*



Tablica 17. Statistički značajni klinički, laboratorijski i pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani s dobi bolesnika s KLLPB (Mann-Whitney U Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

| ISPITIVANE VARIJABLE | Vrijednost ispitivanih varijabli >60 god | Vrijednost ispitivanih varijabli <60 god | P vrijednost | N >60 god | N <60 god |
|---|---|---|---|---|---|
| **BI** | 12,7 | 15,8 | 0,018764 | 48 | 70 |
| **LC-CM-VR** | 1,02 | 1,65 | 0,015329 | 56 | 80 |
| **DTL-MJ** | 42 | 92 | 0,003997 | 21 | 26 |

*Legenda: p-razina statističke značajnosti; N-broj ispitanika; BI-vrijednosti bilirubina; LC-CM-VR-veličina limfnih čvorova na vratu; DTL-MJ-vrijeme udvostručenja limfocitoze u mjesecima*

Muškarci imaju veće vrijednosti hemoglobina, bilirubina, SGOT, kreatinina, UZV veće vrijednosti slezene u mm, palpabilniju jetru ispod rebranog luka, veći % limfatičnih stanica u vršku (PIK-u) DNA histograma koštane srži te izduženije jezgre limfatičnih stanica limfnog čvora.

Kod žena su uočene pravilnije jezgre limfatičnih stanica limfnog čvora te veći zbroj prstenastih i inhomogenih AgNOR-a u jezgrama limfatičnih stanica koštane srži *(tablica 18)*.

Tablica 18. Statistički značajni klinički, laboratorijski i pokazatelji dobiveni kompjuterskom analizom slike povezani sa spolom bolesnika s KLLPB (Mann-Whitney U Test; razina statističke značajnosti p <0,05).

| ISPITIVANE VARIJABLE | Vrijednost ispitivanih varijabli M | Vrijednost ispitivanih varijabli Ž | P vrijednost | Broj ispitanika M | Broj ispitanica Ž |
|---|---|---|---|---|---|
| **HB** | 124,2 | 115,5 | 0,024387 | 72 | 54 |
| **BI** | 16,3 | 12,2 | 0,003787 | 70 | 48 |
| **SGPT** | 16,8 | 15,9 | 0,037815 | 73 | 52 |
| **KREATININ** | 100 | 80 | 0,000118 | 71 | 52 |
| **SLEZ-CM-UZV** | 167 | 148 | 0,026337 | 65 | 46 |
| **JETRA-CM-RL** | 1,68 | 1,36 | 0,038414 | 69 | 51 |
| **KSAGBPRINH** | 1,075 | 1,165 | 0,049704 | 36 | 28 |
| **KSDNA%SPIK** | 38 | 34 | 0,023334 | 49 | 38 |
| **LCMFFJ** | 0,82 | 0,84 | 0,004094 | 30 | 22 |
| **LCMFFIJ** | 1,20 | 1,18 | 0,015252 | 30 | 22 |

*Legenda: p-razina statističke značajnosti; N-broj ispitanika; M-muškarci; Ž-žene; HB-vrijednosti hemoglobina; BI-vrijednosti bilirubina; SGOT-vrijednosti asprartat aminotranferaze; KREATININ-vrijednosti kreatinina; SLEZ-CM-UZV-veličina slezene u cm mjerena ultrazvukom; JETRA-CM-RL-veličina slezene u cm ispod rebranog luka mjerena palpacijski; KSAGBPRINH-zbroj prstenastih i inhomogenih AgNOR-a u limfatičnim stanicama koštane srži; KSDNA%SPIK-postotak stanica u vršku DNA histograma limfatičnih stanica u koštanoj srži; LCMFFJ-faktor pravilnosti limfatičnih stanica u limfnom čvoru; LCMFFIJ-faktor izduženosti limfatičnih stanica u limfnom čvoru.*

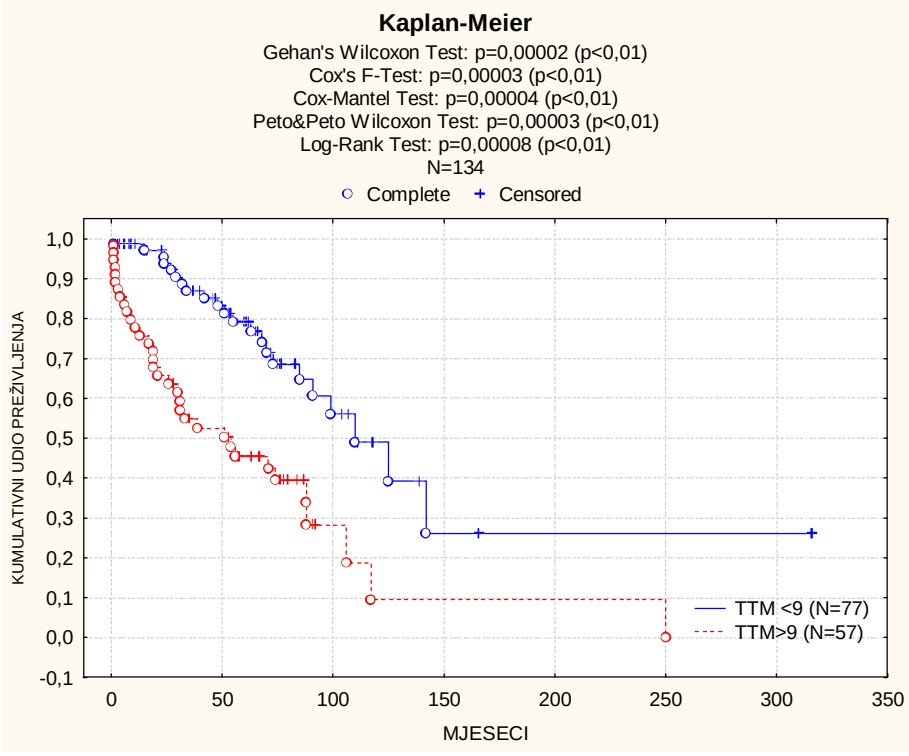
### *4.3.1. KLINIČKI POKAZATELJI*

U *tablici 19.* prikazani su statistički značajni rezultati preživljenja bolesnika s KLLPB u odnosu na kliničke karakteristike. Ukupno je analizirano 20, a statistički značajne razlike u preživljenju nađene su za 16 pokazatelja. Bolje preživljenje su imali bolesnici stariji od 62 godine te žene, bolesnici koji nisu primali antitumorsku terapiju u trenutku uključivanja u studiju kao i bolesnici kod kojih i nakon uključivanja u studiju nije primijenjeno liječenje zbog KLLPB. Niži klinički stadiji po Rai-u i Binet-u pokazatelji su bolje prognoze. Isto vrijedi i za ukupnu tumorsku masu manju od 9 *(slika 16a),* $TM_1$ manju od 7 te $TM_2$ manju od 7. Lošije preživljenje nađeno je u bolesnika čija je veličina slezene mjerena palpatorno ispod rebranog luka bila veća od 1, odnosno veća od 150 mm mjerena ultrazvukom *(slika 16b),* ako su imali povećane limfne čvorove u više regija *(slika 17a)* ili ako je veličina limfnih čvorova u preponama bila veća od 1 cm *(slika 17b).* Bolje preživljenje imali su i bolesnici kod kojih je dijagnosticirana B-KLL+V prema ukupnoj populaciji bolesnika s KLLPB, a također i bolesnici kod kojih nije došlo do udvostručenja ukupne tumorske mase ili broja limfocita unutar 12 mjeseci.

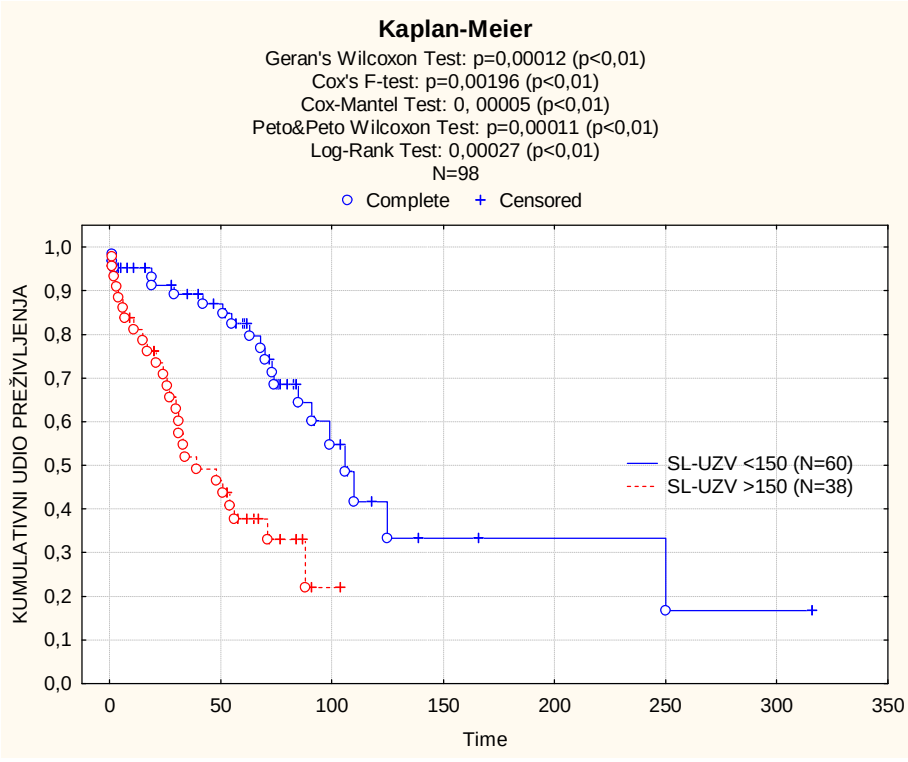
Tablica 19. Statistički značajno preživljenje bolesnika s KLLPB u odnosu na kliničke pokazatelje

| POKAZATELJI | KATEGORIJE | Broj i postotak ispitanika po kategorijama | Medijan preživljenja (mjeseci) | P vrijednost |
|---|---|---|---|---|
| **SPOL** | ŽENE | 65 (41,9%) | 99 | 0,02871 |
| | MUŠKARCI | 90 (58,1%) | 71 | |
| **DOB** | ≤62 | 79 (50,9%) | 73 | 0,03991 |
| | >62 | 76 (49,1%) | 125 | |
| **ANTITUMORSKA TERAPIJA PRIJE UKLJUČIVANJA U STUDIJU** | DA | 9 (0,6%) | 34 | 0,01902 |
| | NE | 141 (99,4%) | 88 | |
| **ANTITUMORSKA TERAPIJA NAKON UKLJUČIVANJA U STUDIJU** | NELIJEČENI | 58 (50,4%) | 106 | 0,04076 |
| | LIJEČENI | 57 (49,6%) | 74 | |
| **STADIJ BOLESTI po BINET-u** | A | 50 (40,0%) | 110 | 0,01276 |
| | B | 16 (12,8%) | 74 | |
| | C | 59 (47,2%) | 56 | |
| **STADIJ BOLESTI po RAI-u** | 0 | 9 (6,9%) | 125 | 0,00453 |
| | 1+2 | 58 (45,0%) | 99 | |
| | 3+4 | 62 (48,1%) | 54 | |
| **UKUPNA TUMORSKA MASA TTM** | ≤9 | 77 (57,0%) | 110 | 0,00014 |
| | 9-12 | 16 (11,9%) | 74 | |
| | >12 | 42 (31,1%) | 33 | |
| **LIMFOCITOZA $TM_1$** | ≤7 | 100 (73,5%) | 99 | 0,03392 |
| | >7 | 36 (26,5%) | 74 | |
| **POVEĆANJE ORGANA $TM_2$** | ≤7 | 105 (77,8%) | 91 | 0,04608 |
| | >7 | 30 (22,2%) | 56 | |
| **VELIČINA INGINALNIH ČVOROVA u cm** | ≤1 | 99 (72,8%) | 99 | 0,01200 |
| | >1 | 37 (27,2%) | 56 | |
| **BROJ REGIJA S POVEĆANIM LIMFNIM ČVOROVIMA** | ≤1 | 62 (45,6%) | 110 | 0,03385 |
| | >1 | 74 (54,4%) | 73 | |
| **VELIČINA SLEZENE MJERENA ULTRAZVUKOM u cm** | ≤150 mm | 60 (66,7%) | 106 | 0,00036 |
| | >150 mm | 30 (33,3%) | 39 | |
| **PALPATORNA VELIČINA SLEZENE ISPOD REBRANOG LUKA u cm** | ≤1 cm | 80 (61,1%) | 106 | 0,00333 |
| | >1 cm | 51 (38,9%) | 54 | |
| **UDVOSTRUČENJE UKUPNE TUMORSKE MASE U MJESECIMA** | ≤12 mjeseci | 9 (20,0%) | 48 | 0,01743 |
| | >12 mjeseci | 36 (80,0%) | 106 | |
| **UDVOSTRUČENJE LIMFOCITOZE U MJESECIMA** | ≤12 mjeseci | 22 (48,9%) | 91 | 0,02570 |
| | >12 mjeseci | 25 (51,1%) | 125 | |
| **PODTIP BOLESTI** | B-KLL+V | 136 (83,1%) | 96 | 0,03792 |
| | OSTALI PODTIPOVI | 18 (16,8%) | 27 | |

*Legenda: TTM – ukupna tumorska masa; $TM_1$ – apsolutna limfocitoza; $TM_2$ – promjer najvećeg palpabilnog čvora*



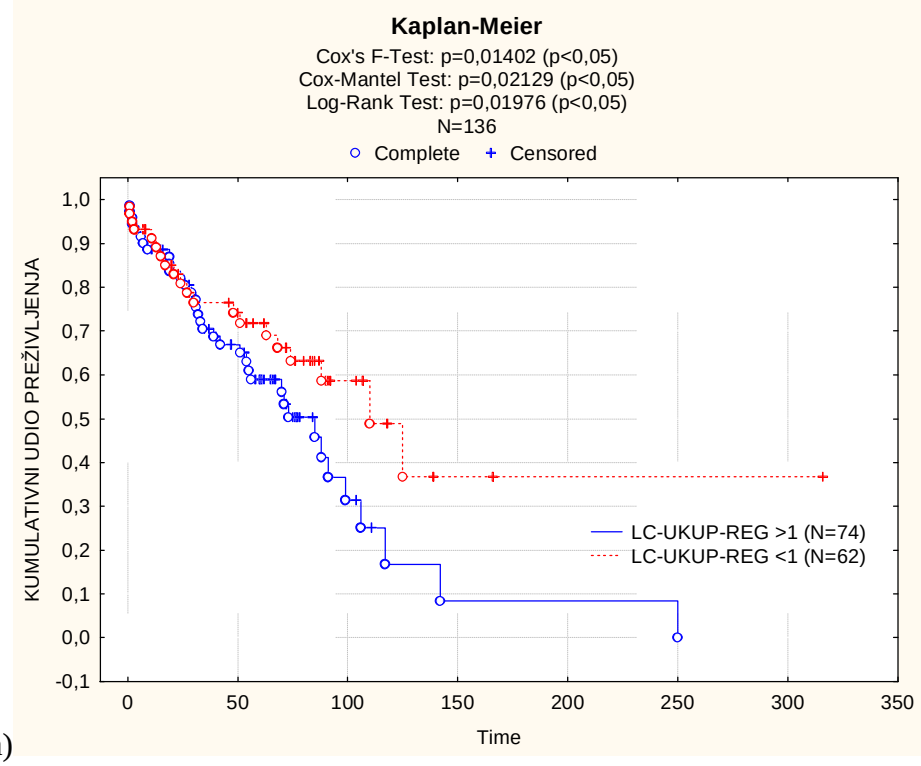

a)



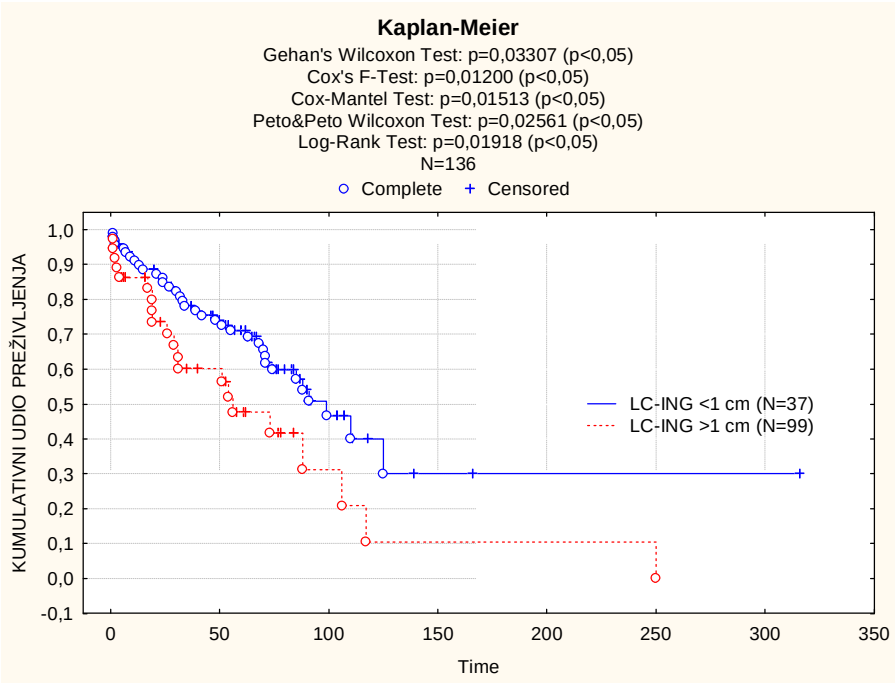

b)

*Legenda: N – broj ispitanika, TTM – ukupna tumorska masa; SL-UZV- ultrazvučna veličina slezene u mm*

Slika 16. Preživljenje u odnosu na (a) TTM i (b) veličinu slezene mjerenu ultrazvukom u ispitanika s KLLPB uključenih u studiju



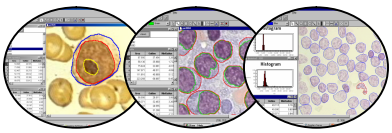

a)




b)

*Legenda: N – broj ispitanika; LC-UKUP-REG – broj regija s povećanim čvorovima; LC-ING – veličina ingvinalnih limfnih čvorova*

Slika 17. Preživljenje u odnosu na (a) broj regija s povećanim limfnim čvorovima i (b) veličinu ingvinalnih limfnih čvorova ispitanika s KLLPB uključenih u studiju

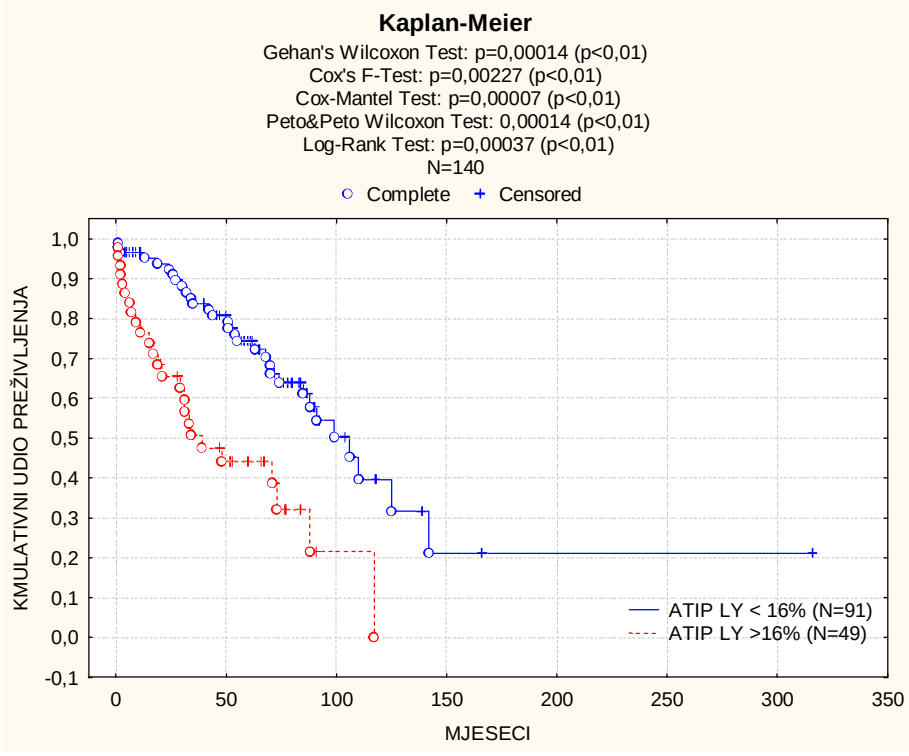


### *4.3.2. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE LIMFATIČNIH STANICA I TIP INFILTRACIJE U KOŠTANOJ SRŽI*

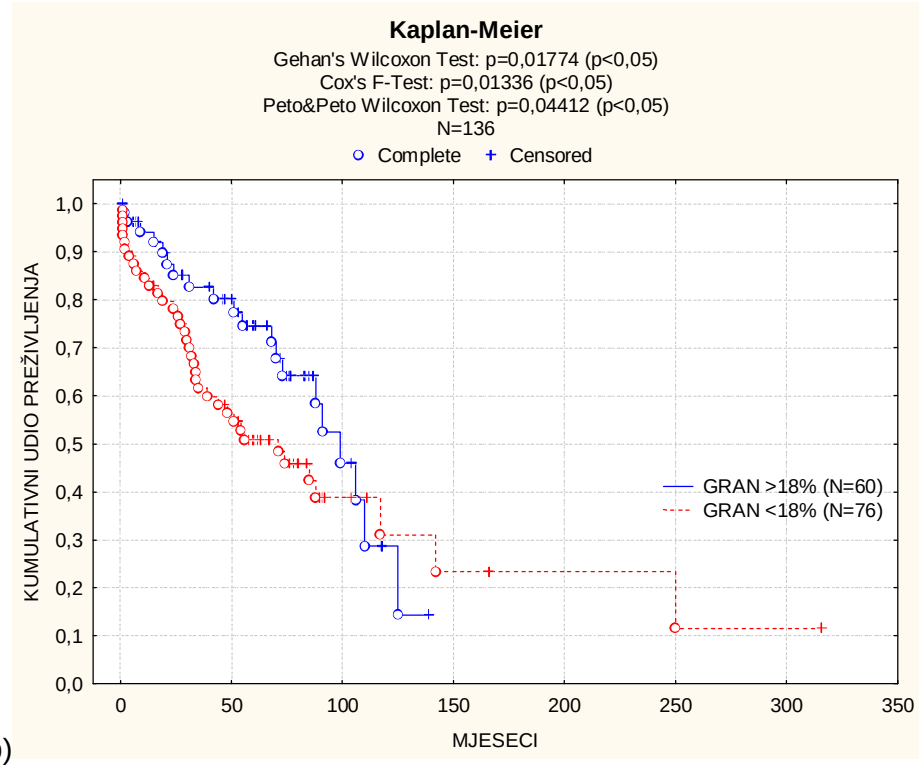
Od 15 ispitivanih pokazatelja u koštanoj srži samo kod 5 pokazatelja nađena je statistički značajna razlika u preživljenju. Statistički značajni pokazatelji povezani s boljim preživljenjem prikazani u *tablici 20,* a to je normo- i slabije celularan uzorak punktata koštane srži prema hipercelularnom razmazu. Isto tako, manje od 70% svih limfatičnih stanica u koštanoj srži, manje od 16% *(slika 18a)* atipičnih limfatičnih stanica te manje od 18% granulocita u mijelogramu *(slika 18b)* pokazatelji su bolje prognoze. Nasuprot tome, lošiji ishod imali su bolesnici s intersticijskim i nodularnim tipom infiltracije, od onih kod kojih je nađen difuzni tip infiltracije u bioptatu kosti.

Tablica 20. Statistički značajni pokazatelji preživljenja u bolesnika s KLLPB u odnosu na pokazatelje koštane srži

| POKAZATELJI | Kategorije | Broj i postotak ispitanika po kategorijama | Medijan preživljenja (mjeseci) | P vrijednost |
|---|---|---|---|---|
| CELULARITET KOŠTANE SRŽI | HIPO I NORMO | 83 (58,5%) | 90 | 0,02542 |
| | HIPER | 59 (41,5%) | 68 | |
| UKUPAN % SVIH LIMFATIČNIH STANICA U KS | ≤ 70% | 58 (41,1%) | 106 | 0,03622 |
| | > 70% | 83 (58,9%) | 71 | |
| UKUPAN % ATIPIČNIH LIMFATIČNIH STANICA U KS | ≤ 16% | 91 (65,0%) | 99 | 0,00072 |
| | > 16% | 49 (35,0%) | 39 | |
| POSTOTAK GRANULOCITA U KS | ≤ 18% | 76 (55,9%) | 71 | 0,01265 |
| | > 18% | 60 (44,1%) | 99 | |
| HISTOLOŠKI TIP INFILTRACIJE U BIOPTATU KOSTI | I+N | 42 (48,9%) | 56 | 0,02335 |
| | D | 44 (51,1%) | 110 | |



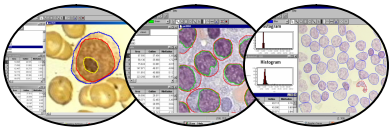

a)




b)

*Legenda: N – broj ispitanika, ATIP LY – ukupan postotak atipičnih limfatičnih stanica u koštanoj srži; GRAN – postotak granulocita u koštanoj srži*

Slika 18. Preživljenje u odnosu na (a) ukupan postotak atipičnih limfatičnih stanica i (b) postotak granulocita u koštanoj srži ispitanika s KLLPB



### 4.3.3. *LABORATORIJSKI POKAZATELJI*

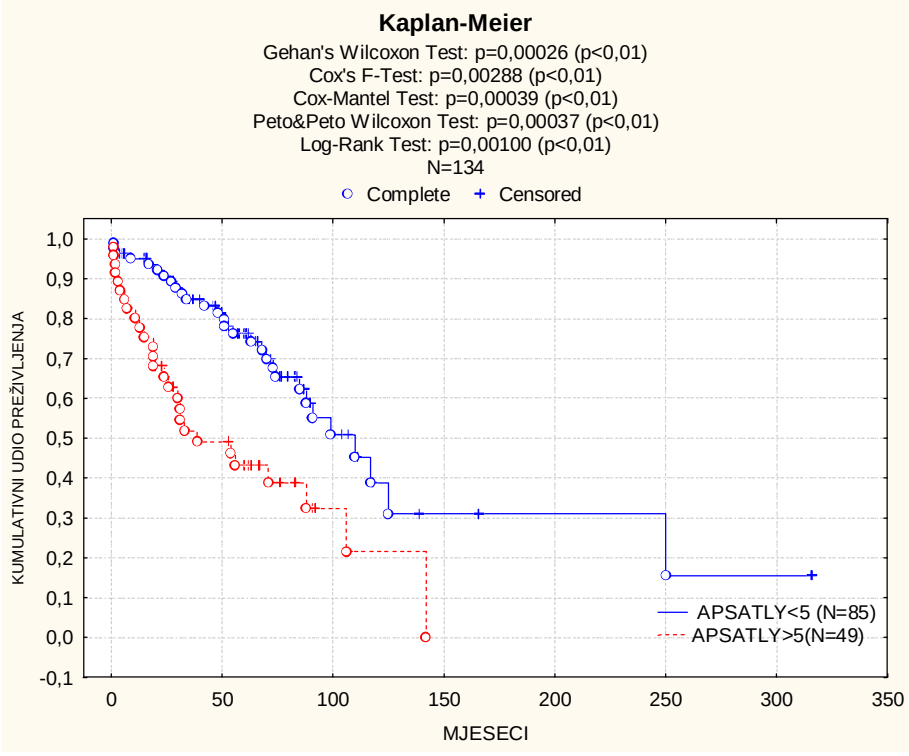
Brojni laboratorijski pokazatelji (hematološki i biokemijski) pokazali su svoju ulogu u ukupnom preživljenju.

#### 4.3.3.1. Hematološki pokazatelji

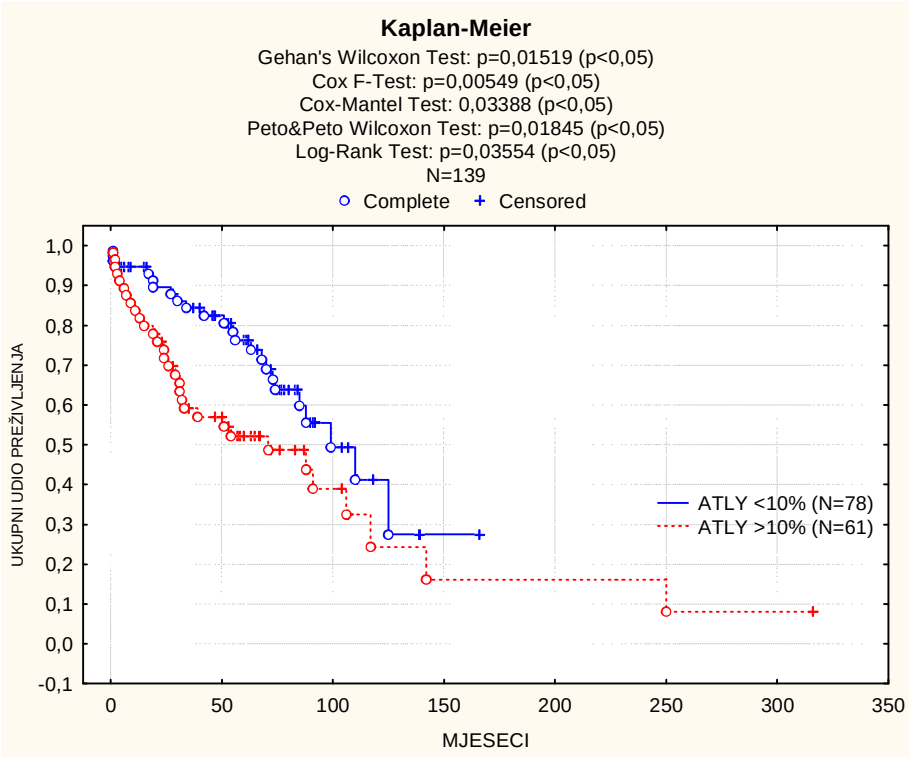
U *tablici 21* prikazani su statistički značajni hematološki pokazatelji preživljenja (10 statistički značajnih od ukupno 20 ispitivanih). Lošiju prognozu imali su bolesnici kod kojih je broj eritrocita bio manji od 2,5 x$10^{12}$/L, broj leukocita veći od 100x$10^9$/L, količina hemoglobina manja od 100 g/L, broj retikulocita veći od 15/$10^3$E te vrijednosti željeza manje od 15 µmol/L. Bolje preživljenje nađeno je kod bolesnika kod kojih je apsolutni broj ukupnih limfatičnih stanica bio manji od 100x$10^9$/L, apsolutni broj atipičnih limfatičnih stanica manji od 5x$10^9$/L *(slika 19a)* te ako je nađeno manje od 10% svih atipičnih limfatičnih stanica u razmazu periferne krvi *(slika 19b).* Bolji ishod bolesti imali su i bolesnici kod kojih je postotak monocita bio veći od 5,1, a granulocita veći od 10,1 u diferencijalnoj krvnoj slici.

Tablica 21. Preživljenje bolesnika s KLLPB u odnosu na statistički značajne hematološke pokazatelje

| POKAZATELJI | Granična vrijednost | Broj i postotak ispitanika u odnosu na granične vrijednosti | Medijan preživljenja (mjeseci) | P vrijednost |
|---|---|---|---|---|
| BROJ ERITROCITA | ≤ 2,5 x$10^{12}$/L | 9 (7,3%) | 30 | 0,01773 |
| | > 2,5 x$10^{12}$/L | 115 (92,7%) | 91 | |
| KOLIČINA HEMOGLOBINA | ≤ 100 g/L | 23 (18,3%) | 26 | 0,00115 |
| | > 100 g/L | 103 (81,7%) | 106 | |
| BROJ RETIKULOCITA | >15/$10^3$E | 85 (68,0%) | 30 | 0,01124 |
| | ≤15/$10^3$E | 40 (32,0%) | 91 | |
| VRIJEDNOST ŽELJEZA | ≤15µmol/L | 50 (39,7%) | 74 | 0,04035 |
| | >15µmol/L | 76 (60,3%) | 106 | |
| BROJ LEUKOCITA | > 100 x$10^9$/L | 14 (10,3%) | 30 | 0,03019 |
| | ≤ 100 x$10^9$/L | 122 (89,7%) | 91 | |
| APSOLUTNI BROJ LIMFOCITA U PK | ≤ 100 x$10^9$/L | 121 (89,0%) | 91 | 0,03281 |
| | > 100 x$10^9$/L | 15 (11,0%) | 30 | |
| APSOLUTNI BROJ ATIPIČNIH LIMFOCITA U PK | ≤ 5 x$10^9$/L | 85 (63,4%) | 110 | 0,00066 |
| | > 5 x$10^9$/L | 49 (36,6%) | 39 | |
| % SVIH ATIPIČNIH LIMFOCITA U PK | ≤ 10% | 78 (56,1%) | 99 | 0,02247 |
| | > 10% | 61 (43,9%) | 71 | |
| % MONOCITA U PK | ≤ 5,1% | 91 (67,4%) | 85 | 0,00717 |
| | > 5,1% | 44 (32,6%) | 117 | |
| % GRANULOCITA U PK | ≤ 10,1% | 47 (36,4%) | 51 | 0,00355 |
| | > 10,1% | 82 (63,6%) | 99 | |



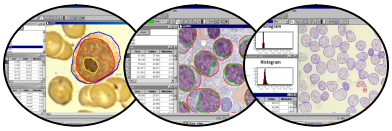

a)




b)

*Legenda: N – broj ispitanika, APSATLY– apsolutni broja atipičnih limfocita x109/L; ATLY– postotak svih atipičnih limfocita u perifernoj krvi*

Slika 19. Preživljenje u odnosu na (a) apsolutni broj atipičnih limfocita u krvi i (b) postotak svih atipičnih limfocita u perifernoj krvi ispitanika s KLLPB

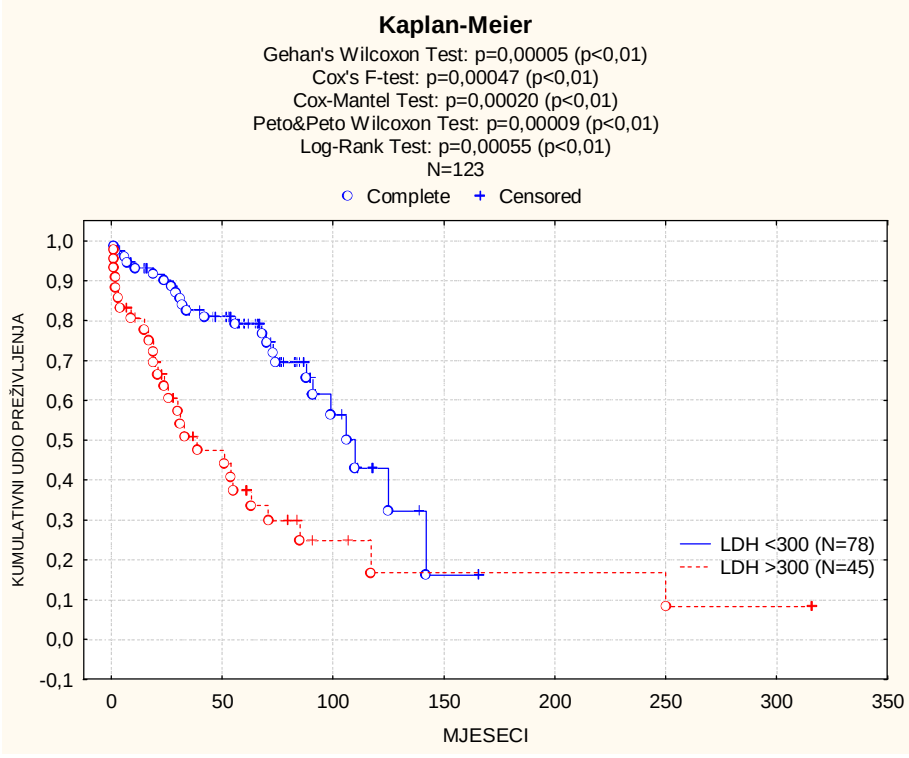


### 4.3.3.2. Biokemijski pokazatelji

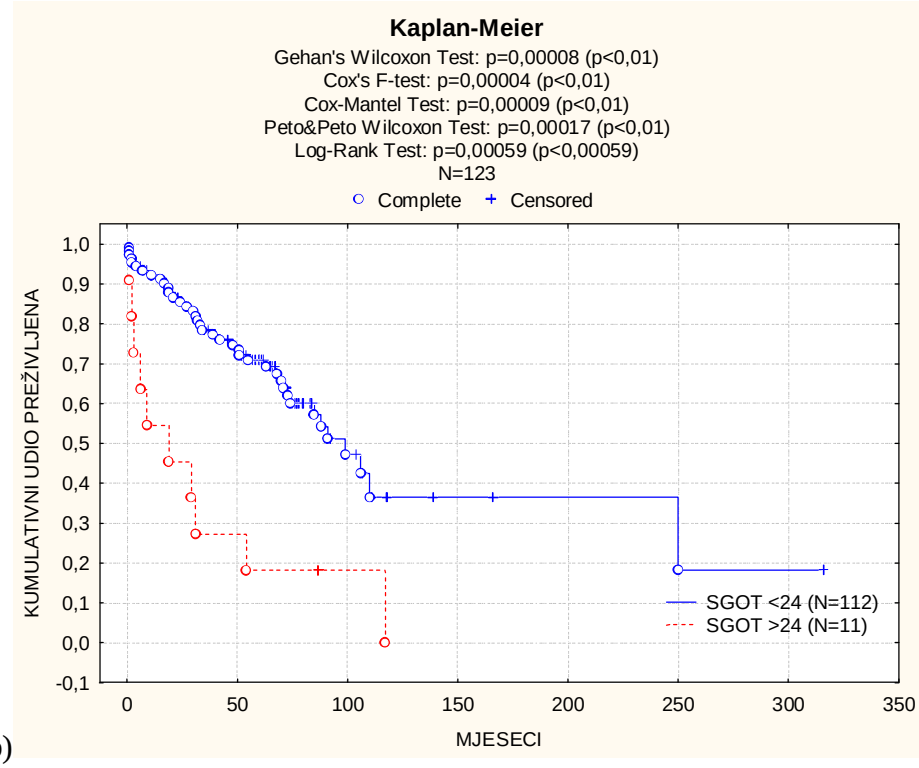
Od ukupno 20 ispitivanih biokemijskih pokazatelja statistički značajno preživljenje nađeno je kod 10. Lošije preživljenje imali su bolesnici kod kojih su *(tablica 22)* vrijednosti LDH bile veće od 300 U/L *(slika 20a),* SGOT-a veće od 24 U/L *(slika 20b)*, a kalcija manje od 2,3 mmol/L. Ukupni proteini manji od 66,1 g/L, albumini manji od 40 g/L, $\alpha_2$ manji od 5,9 g/L, β manji od 7,3 g/L te γ globulina manji od 9 g/L bili su također pokazatelji lošijeg preživljenja, kao i vrijednosti IgG manje od 10 g/L*(slika 21a).* Jedino su niže vrijednosti IgM (manje od 0,91 g/L) upućivali na bolju prognozu*(slika 21b).*

Tablica 22. Preživljenje bolesnika s KLLPB u odnosu na statistički značajne biokemijske pokazatelje

| POKAZATELJI | Granična vrijednost | Broj i postotak ispitanika u odnosu na granične vrijednosti | Medijan preživljenja (mjeseci) | P vrijednost |
|---|---|---|---|---|
| LDH (laktat dehidrogenaza) | ≤ 300 U/L | 77 (62,6%) | 106 | 0,00020 |
| | > 300 U/L | 46 (37,4%) | 33 | |
| SGOT | ≤ 24 U/L | 112 (91,1%) | 99 | 0,00056 |
| | > 24 U/L | 11 (8,9%) | 19 | |
| KALCIJ | ≤ 2,3 mmol/L | 82 (67,2%) | 68 | 0,00039 |
| | > 2,3 mmol/L | 40 (32,8%) | 125 | |
| UKUPNI PROTEINI | ≤ 66,1 g/L | 66 (52,0%) | 68 | 0,02145 |
| | > 66,1 g/L | 61 (48,0%) | 106 | |
| ALBUMINI | ≤ 40 g/L | 55 (47,0%) | 39 | 0,00664 |
| | > 40 g/L | 62 (53,0%) | 99 | |
| $\alpha_2$ GLOBULINI | ≤ 5,9 g/L | 68 (56,7%) | 75 | 0,01982 |
| | > 5,9 g/L | 52 (43,3%) | 250 | |
| β GLOBULINI | ≤ 7,3 g/L | 61 (52,6%) | 68 | 0,04241 |
| | >7,3 g/L | 55 (47,4%) | 99 | |
| γ GLOBULINI | ≤ 9 g/L | 49 (40,2%) | 68 | 0,03430 |
| | > 9 g/L | 73 (59,8%) | 110 | |
| IgG | ≤ 10 g/L | 62 (62,0%) | 73 | 0,04897 |
| | > 10 g/L | 38 (38,0%) | 110 | |
| IgM | ≤ 0,91g/L | 64 (63,4%) | 106 | 0,02229 |
| | > 0,91g/L | 37 (36,6%) | 85 | |



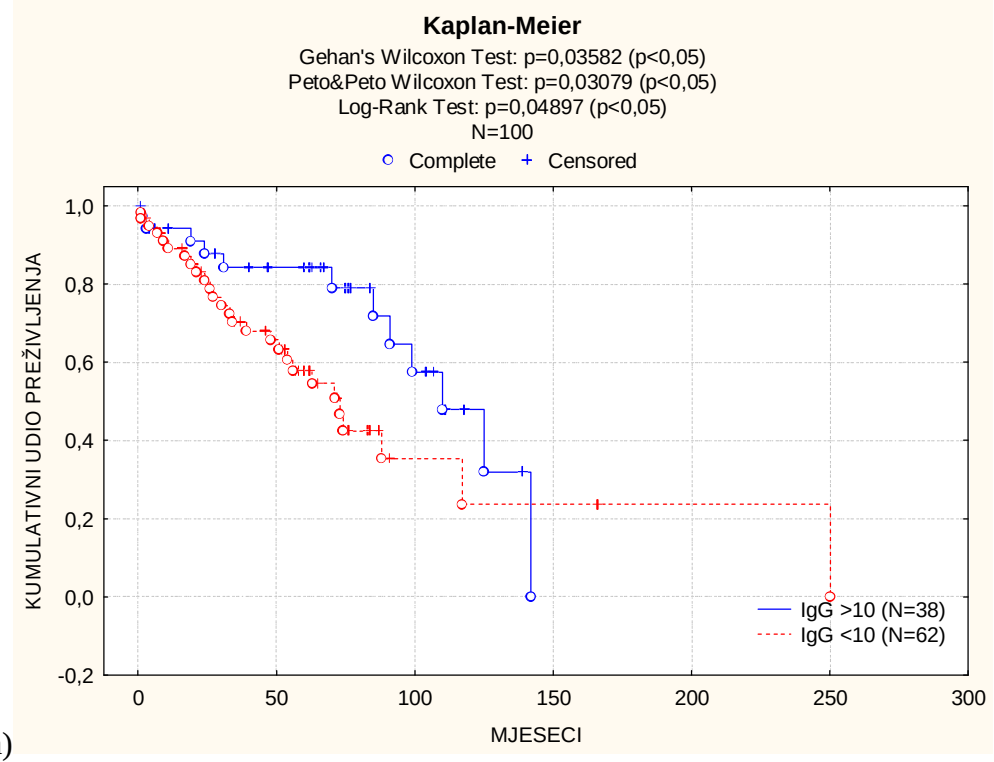

a)



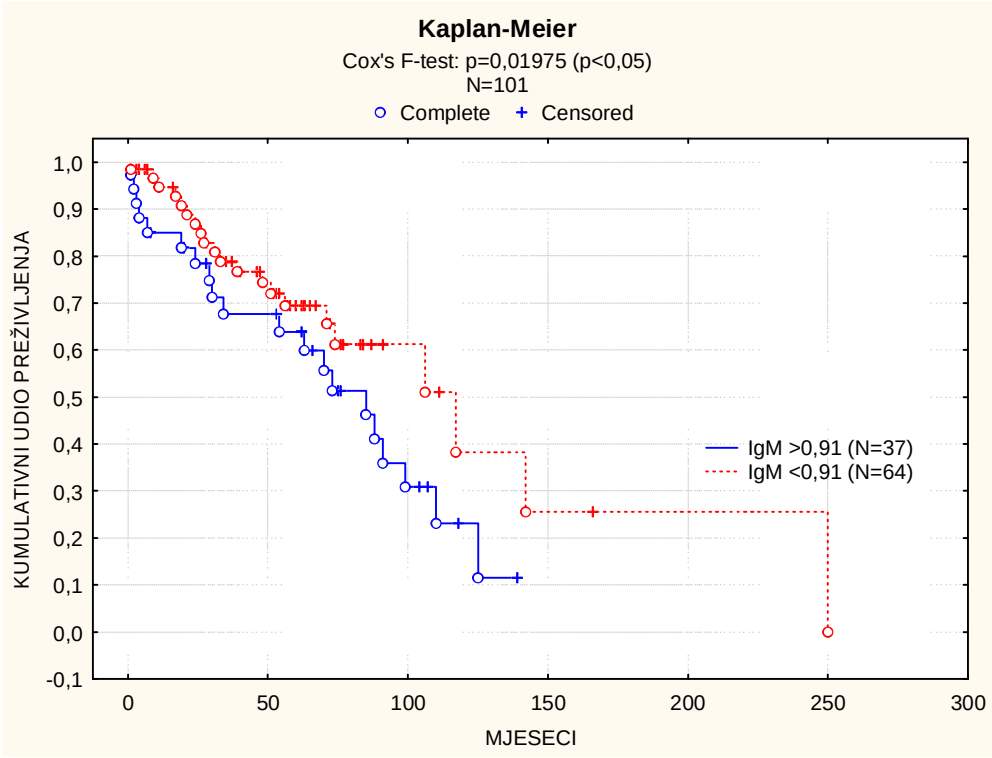

b)

*Legenda: N – broj ispitanika, LDH – vrijednost laktat dehidrogenaze u serumu; SGOT- aspartat aminotransferaza*

Slika 20. Preživljenje u odnosu na (a) vrijednost laktat dehidrogenaze - LDH i (b) vrijednost SGOT–a u serumu ispitanika s KLLPB




a)




*b)*

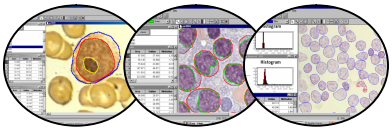
*Legenda: N – broj ispitanika, IgG-G klasa imunoglobulina; IgM-M klasa imunoglobulina*

Slika 21. Preživljenje u odnosu na vrijednosti (a) IgG i (b) IgM u serumu ispitanika s KLLPB

### 4.3.4.1. Morfometrijska obilježja

Analizirano je 60 morfometrijskih pokazatelja u sva tri odjeljka tumorske mase (koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnim čvorovima). Najveći broj statistički značajnih pokazatelja nađen je u perifernoj krvi. U ukupnoj populaciji **KLLPB** 13 statistički značajnih karakteristika kojima je uvjetovano bolje ili lošije preživljenje prikazane su *u tablici 23.* U ***koštanoj srži*** to je opseg limfatičnih stanica manji od 41 µm, površina jezgara manja od 75 µm$^2$, opseg jezgara manji od 35 µm, konveksitet površine jezgara manji od 77 µm$^2$ te ukupna površina jezgara manja od 80 µm$^2$. U ***perifernoj krvi*** kod takvih bolesnika površina cijelih limfatičnih stanica je manja od 130 µm$^2$ a faktor izduženosti stanica veći od 1,25 *(slika 22a).* Iste imaju minimalni polumjer jezgara manji do 4,1 µm *(slika 22b),* jezgre su duže od 9 µm, konveksitet površine im je veći od 55 µm$^2$ *(slika 23a)* a omjer jezgre i citoplazme manji do 0,7. Ako je ishod bolesti povoljniji limfatične stanice u ***limfnom čvoru*** imaju manju površinu stanica od 89 µm$^2$*;* manji minimalni polumjer od 3,9 µm; veći faktor izduženosti stanica od 1,22.

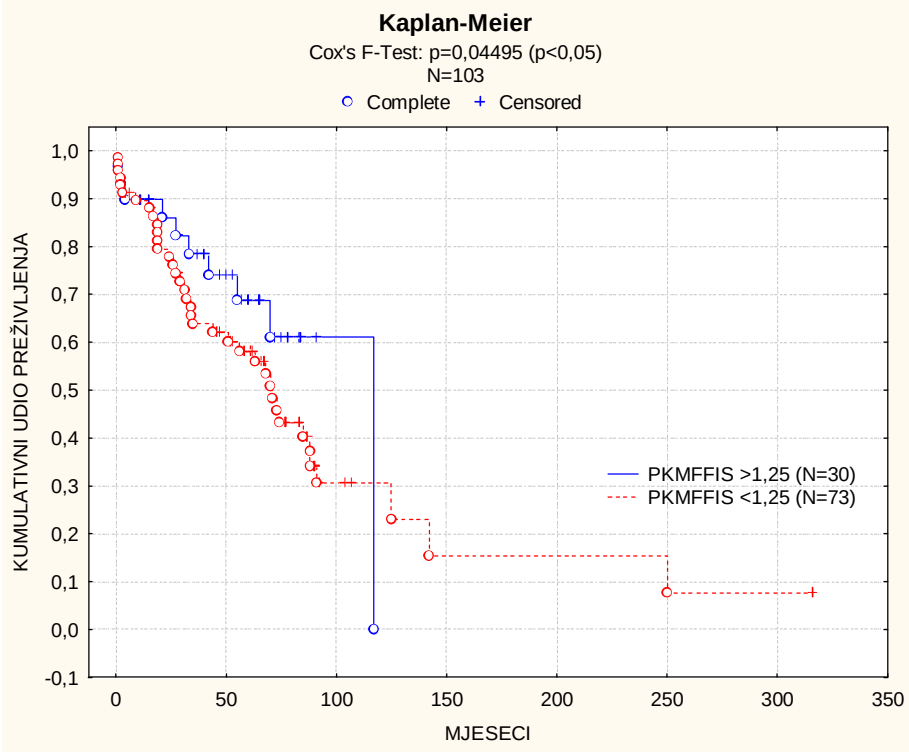
**BKLL+V** je homogenija što se tiče morfoloških karakteristika, a samim time i manji broj morfometrijskih karakteristika (ukupno 5) utječe na bolje preživljenje. U ***koštanoj srži*** to samo opseg jezgre manji od 33 µm. U ***perifernoj krvi***, u tom slučaju, površina cijelih limfatičnih stanica je veća od 90,5 µm$^2$, duljina jezgara veća od 9 µm; konveksitet površine veći od 55 µm$^2$ *(slika 23b)* te omjer jezgre i citoplazme manji od 0,7. Limfatične stanice u ***limfnom čvoru*** imaju manji faktor izduženosti stanice od 1,22 ako je prognoza lošija.



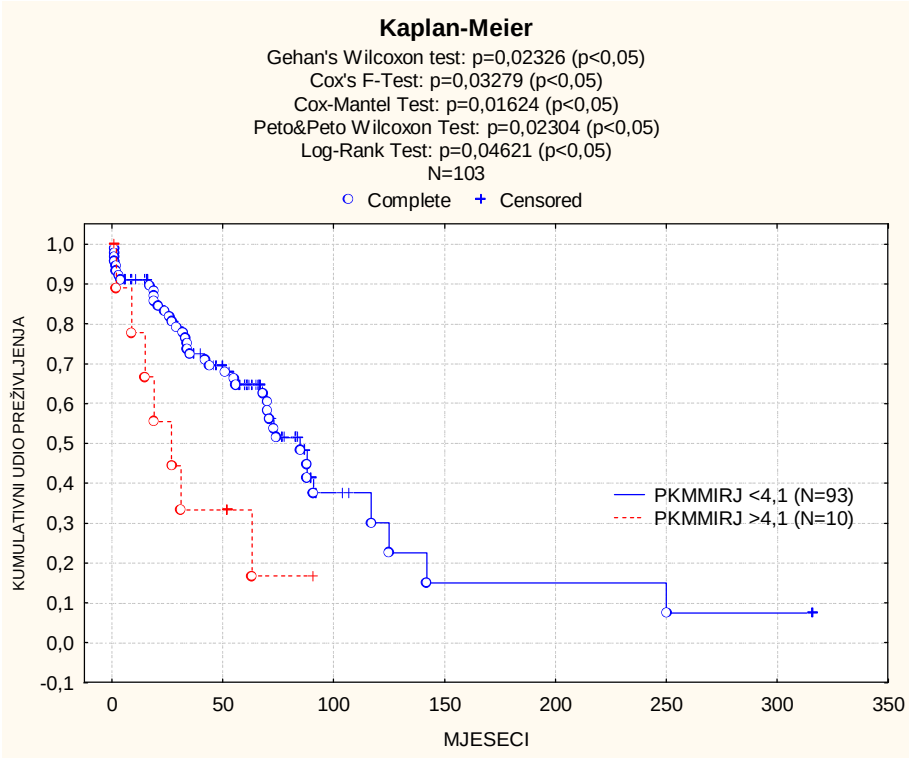
Tablica 23. Statistički značajni morfometrijski pokazatelji preživljenja u različitim odjeljcima tumorske mase u bolesnika s KLLPB i B-KLL+V; Kaplan-Meier, razina statističke značajnosti p<0,05

| POKAZATELJI | KLLPB | | | | B-KLL+V | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GV | Broj i % ispitanika | Med (mj) | p vrijednost | GV | Broj i % ispitanika | Med (mj) | p vrijednost |
| **KSMOS (µm)** | ≤41 | 73 (88,0%) | 88 | 0,03788 | | | | NS |
| | >41 | 10 (12,0%) | 21 | | | | | |
| **KSMAJ ($\mu m^2$)** | ≤75 | 73 (88,0%) | 88 | 0,02576 | | | | NS |
| | >75 | 10 (12,0%) | 31 | | | | | |
| **KSMOJ (µm)** | ≤35 | 75 (90,4%) | 88 | 0,02408 | ≤33 | 59 (84,3%) | 88 | 0,02266 |
| | >35 | 8 (9,6%) | 31 | | >33 | 11 (15,7%) | 70 | |
| **KSMCAJ ($\mu m^2$)** | ≤77 | 11 (10,5%) | 81 | 0,04575 | | | | NS |
| | >77 | 94 (9,5%) | 33 | | | | | |
| **KSMSUMJ ($\mu m^2$)** | ≤80 | 76 (91,6%) | 88 | 0,04082 | | | | NS |
| | >80 | 7 (9,4%) | 21 | | | | | |
| **PKMAS ($\mu m^2$)** | ≤130 | 94 (91,3%) | 75 | 0,04520 | >90,5 | 50 (57,5%) | 88 | 0,04209 |
| | >130 | 9 (9,7%) | 33 | | ≤90,5 | 37 (42,5%) | 74 | |
| **PKMFFIS (µm)** | ≤1,25 | 30 (29,1%) | 71 | 0,04495 | | | | NS |
| | >1,25 | 73 70,9%) | 117 | | | | | |
| **PKMMIRJ (µm)** | ≤4,1 | 93 (90,3%) | 85 | 0,04621 | | | | NS |
| | >4,1 | 10 (9,7%) | 27 | | | | | |
| **PKMLJ (µm)** | >9 | 96 (93,2%) | 74 | 0,04786 | >9 | 81 (93,1%) | 88 | 0,02010 |
| | ≤9 | 7 (6,8%) | 25 | | ≤9 | 6 (6,9%) | 19 | |
| **PKMCAJ ($\mu m^2$)** | >55 | 95 (92,2%) | 85 | 0,04274 | >55 | 80 (92,0%) | 88 | 0,04710 |
| | ≤55 | 8 (7,8%) | 26 | | ≤55 | 7 (8,0%) | 26 | |
| **LCMAS ($\mu m^2$)** | >89 | 19 (36,5%) | 35 | 0,03414 | | | | NS |
| | ≤89 | 33 (63,5%) | 91 | | | | | |
| **LCMFFIS (µm)** | >1,22 | 28 (53,9%) | 88 | 0,02409 | >1,22 | 23 (52,3%) | 88 | 0,01612 |
| | ≤1,22 | 24 (46,1%) | 55 | | ≤1,22 | 21 (47,7%) | 55 | |
| **PKN/C** | >0,7 | 61 (59,2%) | 71 | 0,02484 | | | | NS |
| | ≤0,7 | 42 (40,8%) | 85 | | | | | |

*Legenda: GV-granične vrijednosti; Med-medijan preživljenja u mjesecima; p-razina statističke značajnosti; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; B-KLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; MAS-površina stanice; MOS-opseg stanice; MSUMJ-ukupna površina jezgara; MFFIS-faktor izduženosti stanice; MMINRS-minimalni polumjer stanice; MAJ-površina jezgre; MOJ-opseg jezgre; MCAJ-konveksitet površine jezgre; MMINRJ-minimalni polumjer jezgre; MLJ-duljina jezgre; MBJ-širina jezgre; MFFJ-pravilnost jezgre, N/C-omjer jezgre i citoplazme*



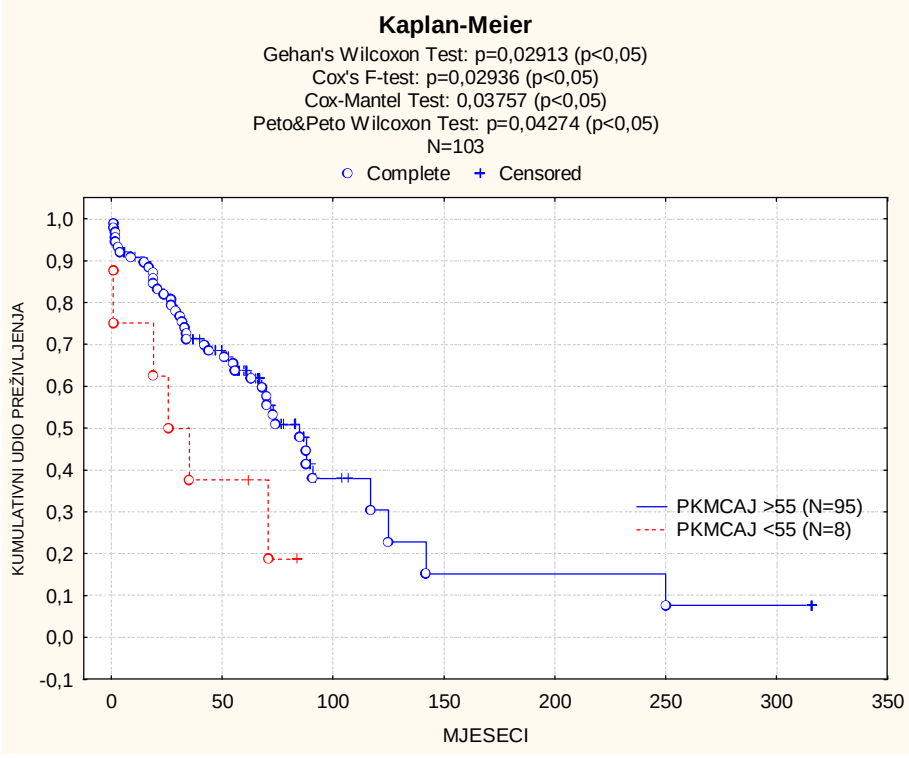

a)



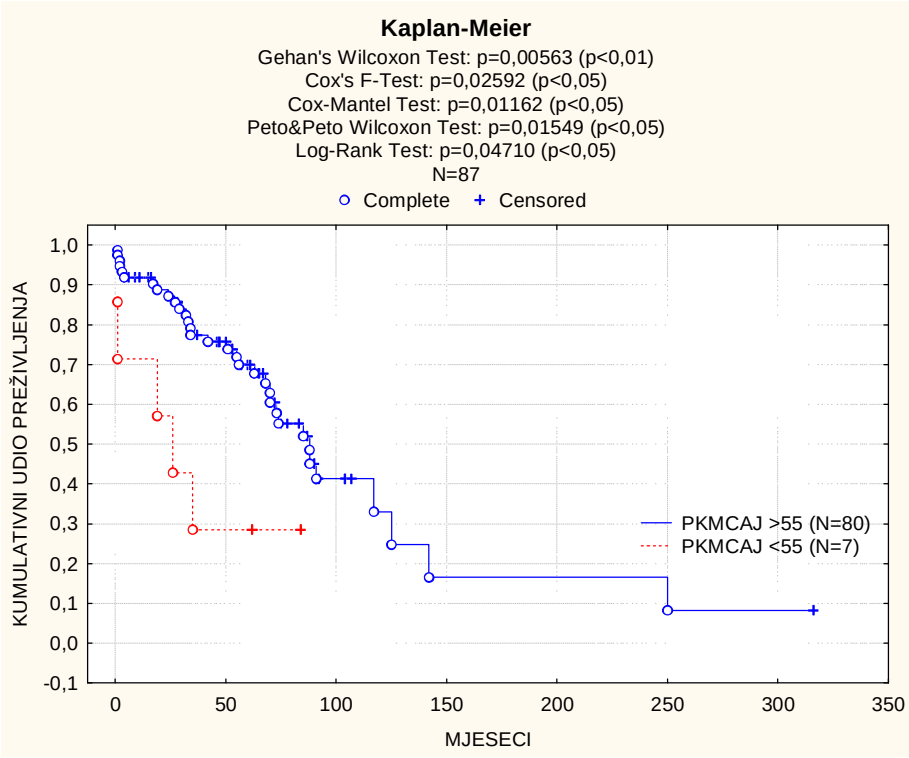

b)

*Legenda: N – broj ispitanika, PKMFFIS – izduženost limfatičnih stanica u perifernoj krvi; PKMMIJ- minimalni polumjer jezgara limfatičnih stanica u perifernoj krvi*

Slika 22. Preživljenje u odnosu na (a) izduženost i (b) najmanji polumjer jezgara limfatičnih stanica u perifernoj krvi ispitanika s KLLPB




a)




b)

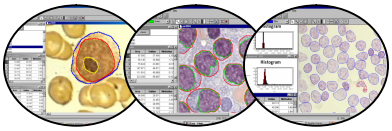
*Legenda: N – broj ispitanika, PKMCAJ – konveksitet površine jezgre limfatičnih stanica u perifernoj krvi*

Slika 23. Preživljenje u odnosu na konveksitet površine jezgara limfatičnih stanica u perifernoj krvi ispitanika s (a) KLLPB i (b) B-KLL+V

Od 72 ispitivana, statistička značajnost je nađena u 21 pokazatelja AgNOR-a *(tablica 24*).

Kao dobri prognostički pokazatelji pokazali su se u grupi **KLLPB** u ***koštanoj srži*** površina homogenih AgNOR-a manja od 0,43 $\mu m^2$ a broj istih manji od 0,25, omjer površine homogenih AgNOR-a prema površini jezgre manji od 0,004, površina inhomogenih AgNOR-a manja od 3,5 $\mu m^2$, ukupna površina svih AgNOR-a manja od 6,4 $\mu m^2$, ukupni broj AgNOR-a u koštanoj srži manji od 1,6 te omjer površine svih AgNOR-a manji od 0,07. U ***perifernoj krvi*** broj homogenih AgNOR-a je bio veći 0,3, površina također veća od 0,3 $\mu m^2$ kao i omjer istih prema površini jezgre veći od 0,002. Površina inhomogenih AgNOR-a je bila manja od 3 $\mu m^2$ *(slika 24a),* maksimalna vrijednost površine također manja od 3 $\mu m^2$ *(slika 25a) a* omjer prema površini jezgre manji od 0,04 u bolesnika s boljom prognozom. Oni su imali i broj prstenastih AgNOR-a manji od 0,65 *(slika 26a),* s površinom manjom od 2,3 $\mu m^2$ *te* najveću vrijednost površine istih manju od 3 $\mu m^2$. Broj ukupnih AgNOR-a bio je veći od 1,37, ali zato površina ukupnih manja od 6,5 $\mu m^2$ *(slika 27a)* te omjer površine svih AgNOR-a prema površini jezgre manji od 0,07 ako je ishod bolesti bio povoljniji. U ***limfnim čvorovima*** površina inhomogenih AgNOR-a veća od 3,674 $\mu m^2$ i ukupna površina svih AgNOR-a prema površini jezgre veća od 0,065 odnosila se na limfatične stanice bolesnika s lošijom prognozom.

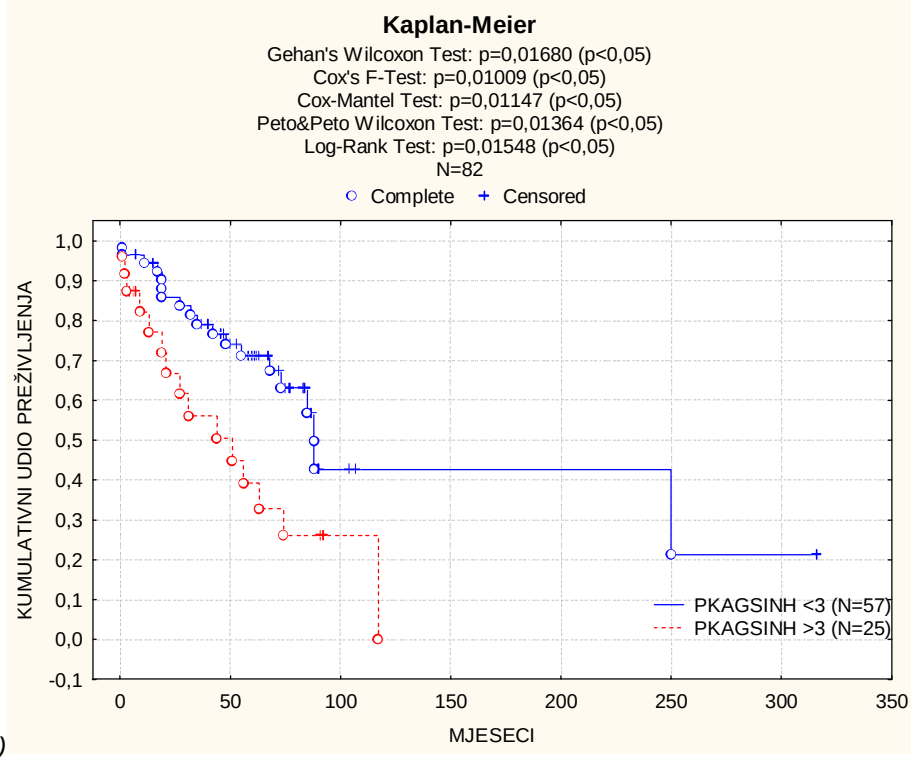
U grupi **B-KLL+V** lošije preživljenje imali su oni bolesnici kod kojih je u ***koštanoj srži*** omjer površine homogenih AgNOR-a prema površini jezgre bio veći od 0,004, ukupni broj AgNOR-a u koštanoj srži veći od 1,65, ukupna površina AgNOR-a manja od 4 $\mu m^2$ te omjer površine svih AgNOR-a prema površini jezgre manji od 0,06. U ***perifernoj krvi*** broj i površina homogenih AgNOR-a manja od 0,3 $\mu m^2$ predskazivali su lošije preživljenje. Površina inhomogenih AgNOR-a veća od 3,1 $\mu m^2$ *(slika 24b)*, maksimalna vrijednost površine također veća od 3,1 $\mu m^2$ *(slika 25b),* omjer istih prema površini jezgre veći od 0,047 svrstavali su bolesnike u prognostički lošiju skupinu. Međutim, broj prstenastih AgNOR-a manji od 0,65 *(slika 26b)* kao i maksimalna površina istih manja od 3 $\mu m^2$, površina ukupnih manja od 5 $\mu m^2$ *(slika 27b)* te omjer površine svih AgNOR-a prema površini jezgre manji od 0,07 bolji su prognostički pokazatelji.



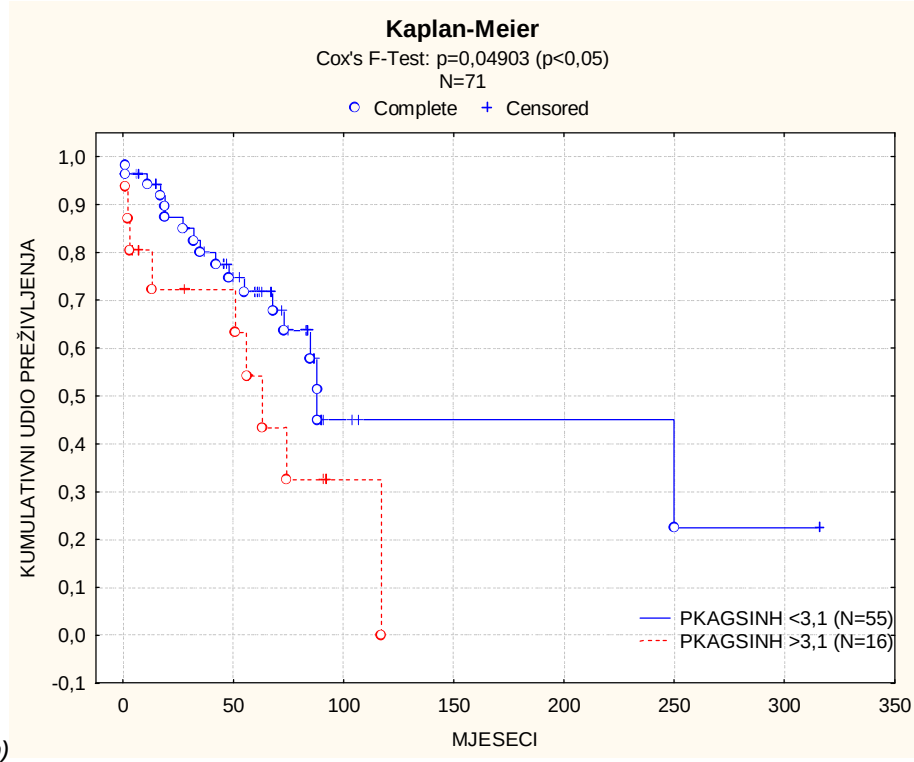
Tablica 24. Statistički značajni AgNOR pokazatelji preživljenja u različitim odjeljcima tumorske mase u bolesnika s KLLPB i B-KLL+V

| POKAZATELJI | KLLPB | | | | B-KLL+V | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GV | Broj i % ispitanika | Med (mj) | p vrijednost | GV | Broj i % ispitanika | Med (mj) | p vrijednost |
| **KSAGBHOM** | >0,25 | 31 (49,2%) | 73 | 0,04749 | | | | NS |
| | ≤0,25 | 32 (50,8%) | 87 | | | | | |
| **KSAGSHOM** | >0,43 | 16 (25,3%) | 48 | 0,04218 | | | | NS |
| | ≤0,43 | 47 (74,7%) | 91 | | | | | |
| **KSAGHOM/J** | <0,004 | 33 (52,4%) | 117 | 0,02621 | ≤0,004 | 27 (48,1%) | 117 | 0,01294 |
| | >0,004 | 30 (47,6%) | 73 | | >0,004 | 25 (51,9%) | 73 | |
| **KSAGSINH** | ≤3,5 | 54 (85,8%) | 117 | 0,04365 | | | | NS |
| | >3,5 | 9 (14,2%) | 88 | | | | | |
| **KSAGSUMUK** | ≤6,4 | 55 (88,7%) | 88 | 0,04526 | ≤4 | 22 (41,5%) | 73 | 0,04104 |
| | >6,4 | 7 (11,3%) | 31 | | >4 | 31 (58,5%) | 117 | |
| **KSAGBUK** | >1,6 | 9 (14,5%) | 34 | 0,04380 | >1,65 | 13 (24,5%) | 34 | 0,04351 |
| | ≤1,6 | 53 (85,5%) | 88 | | ≤1,65 | 40 (75,5%) | 91 | |
| **KSAGSUK/J** | <0,07 | 46 (73,0%) | 88 | 0,04526 | ≤0,06 | 15 (28,3%) | 73 | 0,03822 |
| | >0,07 | 17 (17,0%) | 34 | | >0,06 | 38 (71,7%) | 117 | |
| **PKAGBHOM** | >0,3 | 32 (39,0%) | 117 | 0,02273 | >0,3 | 27 (38,0%) | 117 | 0,04422 |
| | ≤0,3 | 50 (61,0%) | 73 | | ≤0,3 | 44 (62,0%) | 85 | |
| **PKAGSHOM** | >0,3 | 29 (35,3%) | 117 | 0,02803 | >0,3 | 25 35,2%) | 117 | 0,03140 |
| | ≤0,3 | 53 (64,7%) | 74 | | ≤0,3 | 46 (64,8%) | 85 | |
| **PKAGSHOM/J** | >0,002 | 59 (72,0%) | 88 | 0,00653 | | | | NS |
| | ≤0,002 | 23 (28,0%) | 50 | | | | | |
| **PKASINH** | <3 | 57 (69,6%) | 88 | 0,01548 | ≤3,1 | 55 (77,5%) | 88 | 0,04903 |
| | >3 | 25 (30,4%) | 51 | | >3,1 | 16 (22,5%) | 63 | |
| **PKAGMAINH** | ≤3 | 64 (78,0%) | 88 | 0,00051 | ≤3,1 | 59 (83,1%) | 88 | 0,03386 |
| | >3 | 18 (22%) | 31 | | >3,1 | 12 (16,9%) | 63 | |
| **PKAGSINH/J** | ≤0,04 | 55 (67,1%) | 88 | 0,04341 | ≤0,047 | 61 (85,9%) | 88 | 0,04840 |
| | >0,04 | 27 (32,9%) | 56 | | >0,047 | 10 (14,1%) | 74 | |
| **PKAGBPR** | ≤0,65 | 57 (69,6%) | 88 | 0,04364 | ≤0,65 | 49 (69,0%) | 250 | 0,03508 |
| | >0,65 | 25 (30,4%) | 68 | | >0,65 | 22 (31,0%) | 68 | |
| **PKAGSPR** | ≤2,3 | 55 (67,1%) | 250 | 0,04937 | | | | NS |
| | >2,3 | 27 (32,9%) | 60 | | | | | |
| **PKAGMAPR** | ≤3 | 69 (88,5%) | 88 | 0,02348 | ≤3 | 62 (82,7%) | 117 | 0,04557 |
| | >3 | 9 (11,5%) | 27 | | >3 | 13 (17,3%) | 27 | |
| **PKAGBUK** | >1,37 | 41 (50,0%) | 117 | 0,00653 | | | | NS |
| | ≤1,37 | 41 (50,0%) | 73 | | | | | |
| **PKAGSUK** | ≤6,5 | 72 (87,8%) | 88 | 0,00666 | ≤5 | 57 (80,3%) | 88 | 0,04690 |
| | >6,5 | 10 (12,2%) | 21 | | >5 | 14 (19,7%) | 56 | |
| **PKAGSUK/J** | >0,07 | 24 (29,3%) | 21 | 0,01281 | >0,07 | 18 (25,4%) | 8 | 0,03224 |
| | ≤0,07 | 58 (70,7%) | 88 | | ≤0,07 | 53 (74,6%) | 88 | |
| **LCAGSINH** | ≤3,674 | 33 (80,5%) | 88 | 0,02131 | | | | NS |
| | >3,674 | 8 (19,5%) | 31 | | | | | |
| **LCAGSUK/J** | >0,065 | 23 (56,1%) | 70 | 0,04284 | | | | NS |
| | ≤0,065 | 18 (43,9%) | 91 | | | | | |

*Legenda: GV-granična vrijednost; Median-medijan preživljenja u mjesecima; p-razina statističke značajnosti; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; B-KLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; AGBHOM-broj homogenih AgNOR-a; AGSHOM-površina homogenih AgNOR-a; AgSHOM/J-omjer homogenih AgNOR-a i jezgre; AGBINH-broj inhomogenih AgNOR-a; AGSINH-površina inhomogenih AgNOR-a; AGSMAINH-maksimalna površina inhomogenih AgNOR-a; AGSINH/J-omjer inhomogenih AgNOR-a i jezgre; AGBPR-broj prstenastih AgNOR-a; AGSPR-površina prstenastih AgNOR-a; AGSMAPR-maksimalna površina prstenastih AgNOR-a; AGBUKUP-ukupan broj svih AgNOR-a; AGSUKUP-ukupna površina svih AgNOR-a; AGSUK/J-omjer ukupne površine AgNOR-a i jezgre*



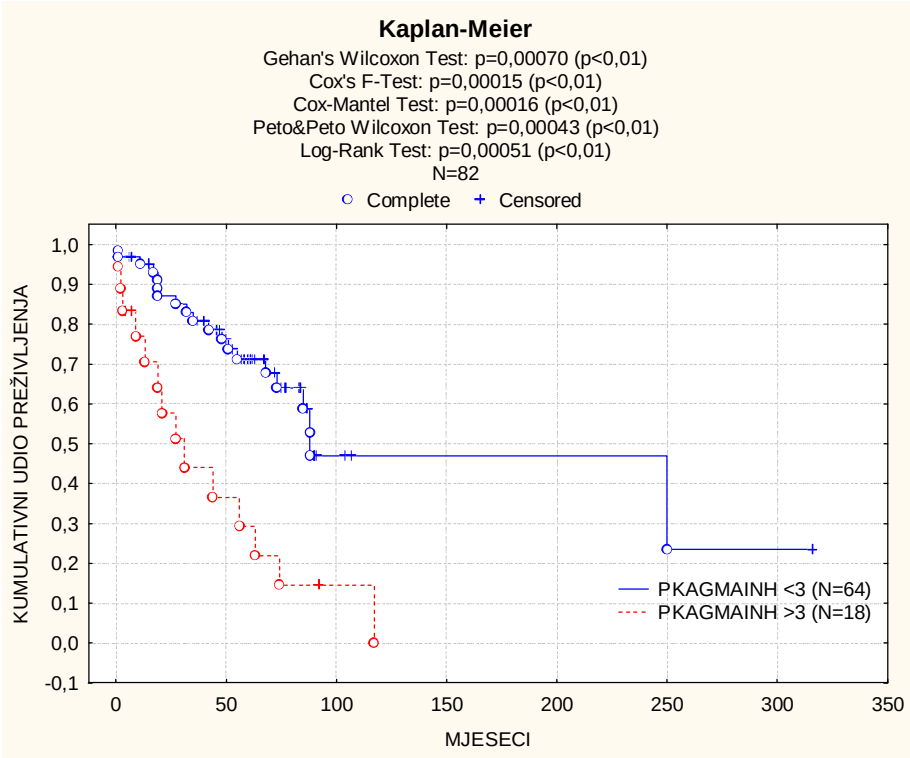

*a)*



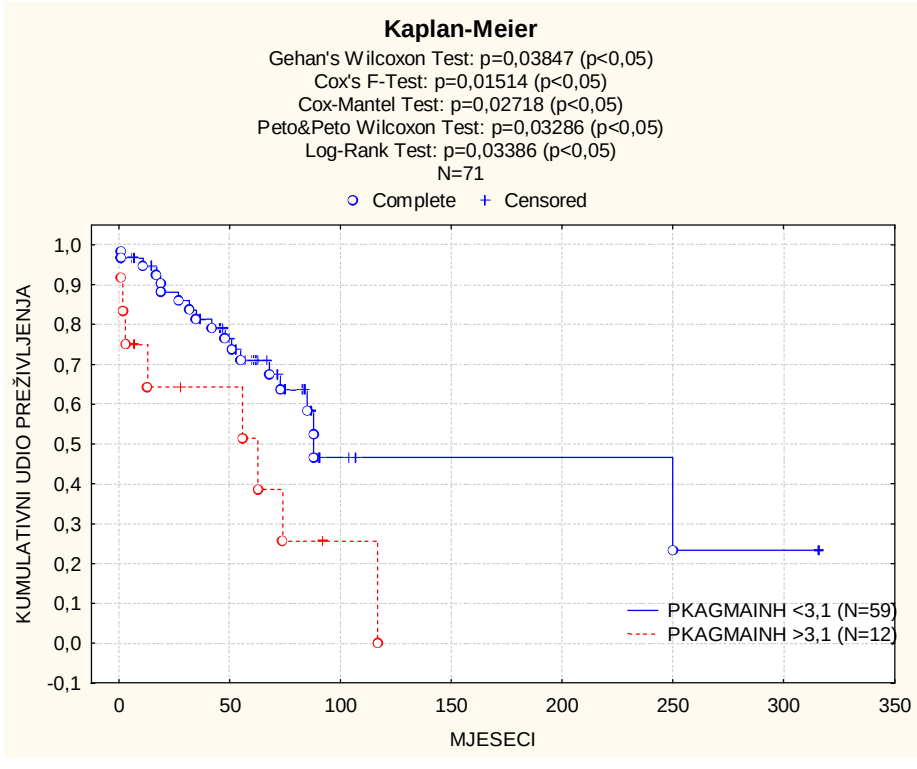

*b)*

*Legenda: N – broj ispitanika, AgNOR – srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije; PKAGSINH – površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi*

Slika 24. Preživljenje u odnosu na površinu inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi ispitanika s (a) KLLPB i (b) B-KLL+V



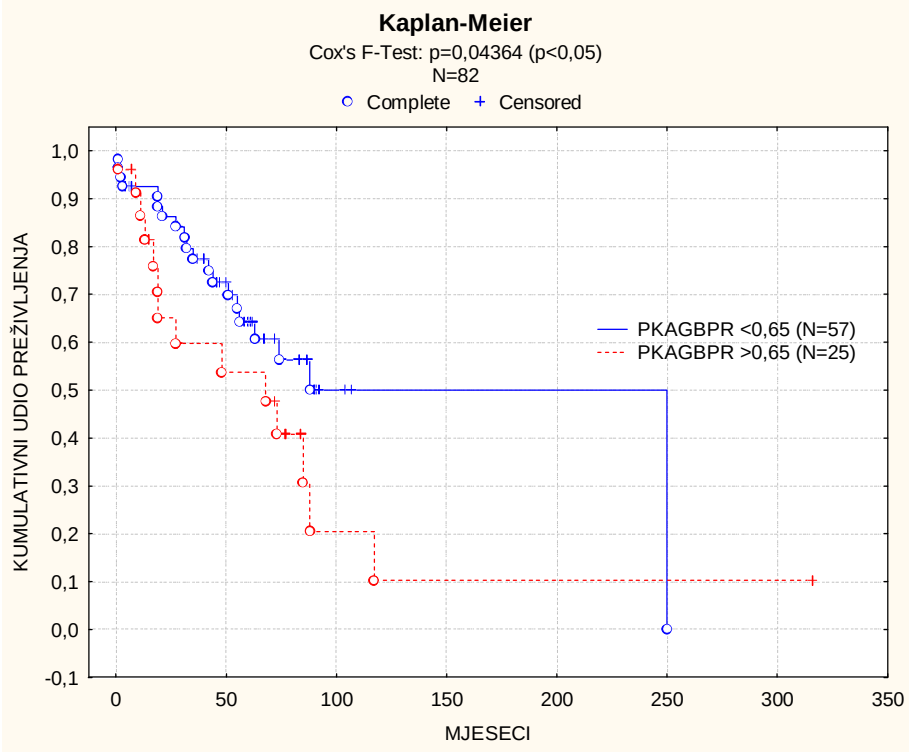

a)



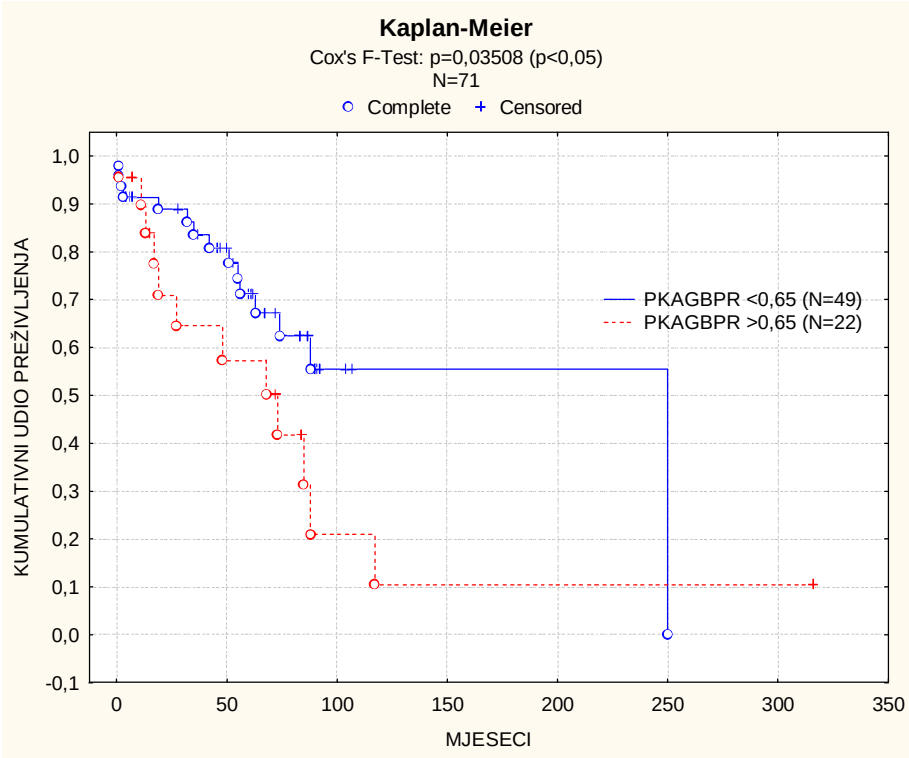

b)

*Legenda: N – broj ispitanika, AgNOR – srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije; PKAGMAINH – najveća površina inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi*

Slika 25. Preživljenje u odnosu na najveću površinu inhomogenih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi ispitanika s (a) KLLPB i (b) B-KLL+V



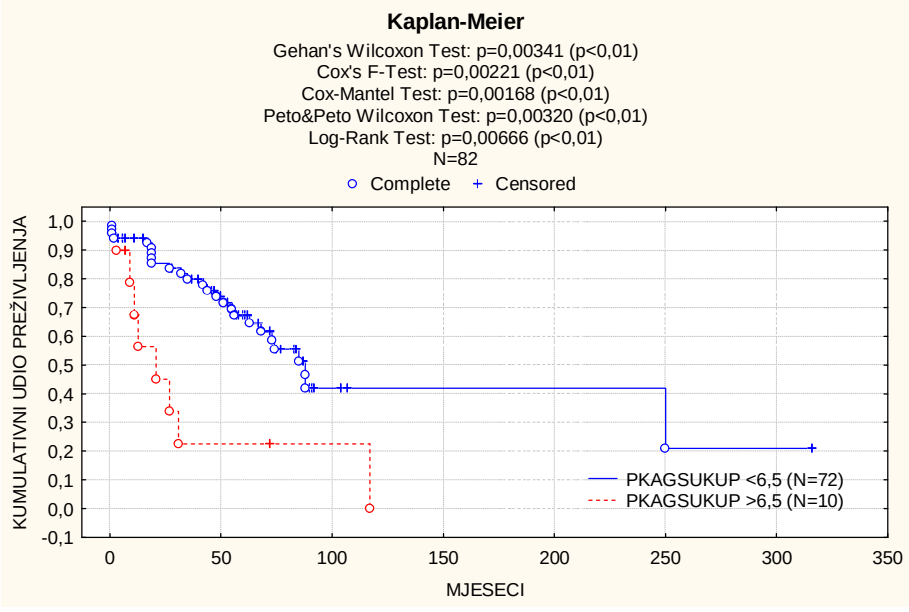

a)



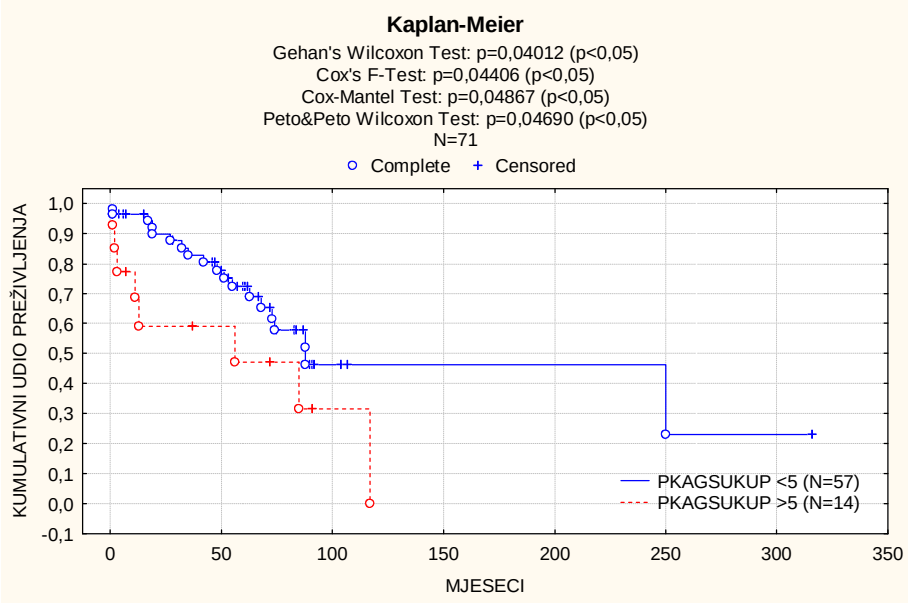

b)

*Legenda: N – broj ispitanika, AgNOR – srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije; PKAGBPR – broj prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi*

Slika 26. Preživljenje u odnosu na broj prstenastih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi ispitanika s (a) KLLPB i (b) B-KLL+V



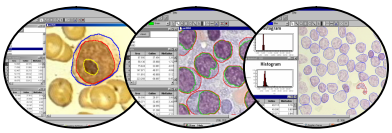

a)




b)

*Legenda: N – broj ispitanika, AgNOR – srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije; PKAGSUKUP – površina svih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi*

Slika 27. Preživljenje u odnosu na površinu svih AgNOR-a limfatičnih stanica u perifernoj krvi ispitanika s (a) KLLPB i (b) KLL+V



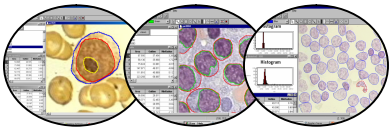
4.3.4.3. Osobine statičke DNA citometrije

Vrlo značajnu ulogu u preživljenju pokazali su pokazatelji dobiveni statičkom DNA citometrijom (7 statistički značajnih pokazatelja od 15 ispitivanih): postotak stanica u vrhu DNA histograma, udio stanica koje sadrže manju ili veću količinu DNA od stanica u vršku, količina stanica u S-fazi staničnog ciklusa te postotak stanica koje sadrže količinu DNA više od 4N *(tablica 25).*

Bolju prognozu imali su bolesnici s KLLPB koji su imali **u *koštanoj srži*** % stanica u Go/$G_1$-vršku između 28,2-47% *(slika 28a);* više od 20% stanica sa sadržajem DNA manjim od vrška; manje od 55% stanica sa sadržajem DNA većim od vrška*;* više od 55% stanica sa sadržajem DNA manjim od vrška te više od 4,1 % stanica u S-fazi staničnog ciklusa. U ***perifernoj krvi*** DI je bio veći od 1,01 a postotak stanica sa sadržajem DNA većim od vrška veći od 45. Više od 35% stanica u Go/$G_1$ vršku *(slika 29a)* i manje od 2,5 % stanica sa sadržajem DNA većim od 4N *(slika 29b)* imale su limfatične stanice **limfnog čvora** bolesnika s duljim preživljenjem.

Zanimljivo je kako bolje preživljenje pokazuju bolesnici u obje skupine kod kojih je veća proliferativna aktivnost u koštanoj srži (manje od 47% limfatičnih stanica nalazi u vršku, ali ne manje od 28,2, <20% stanica sadrži manje DNA nego stanice u vršku te ako je > 4,1% stanica u S-fazi staničnog ciklusa u bolesnika.

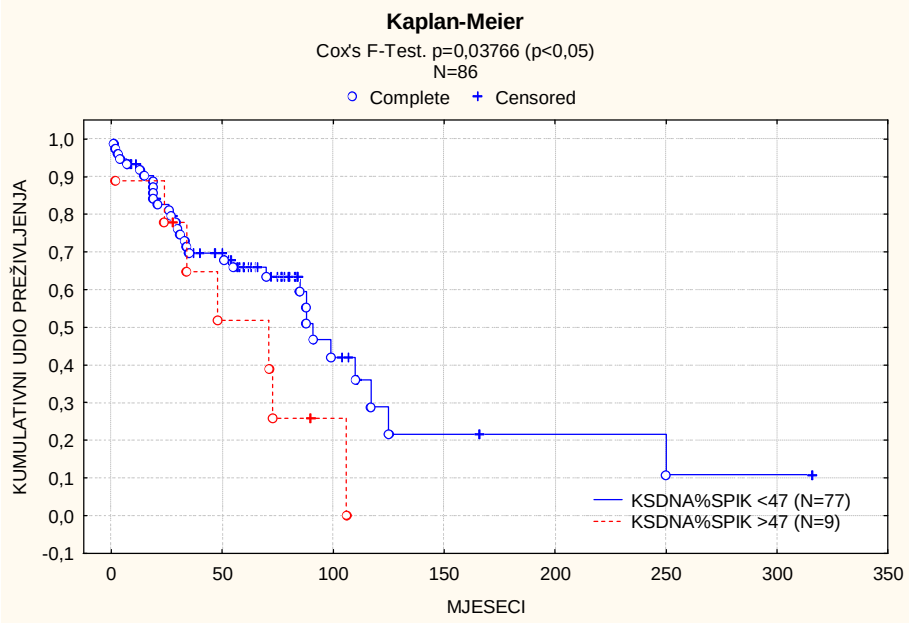
Lošiju prognozu imali su bolesnici s **KLL+V** koji su imali u ***koštanoj srži*** *postotak* stanica u Go/$G_1$ vršku manje od 37% ili više od 47% *(slika 28b); više od* 55% stanica sa sadržajem DNA većim od vrška; manje od 20% stanica sa sadržajem DNA manjim od vrška te manje od 4,1 % stanica u S-fazi staničnog ciklusa. Slično kao i bolesnici s KLLPB, lošiji ishod bolesti bio je prisutan ako je u limfatičnim stanicama ***periferne krvi*** DI bio manji od 1,08 uz više od 45% stanica sa sadržajem DNA većim od vrška.



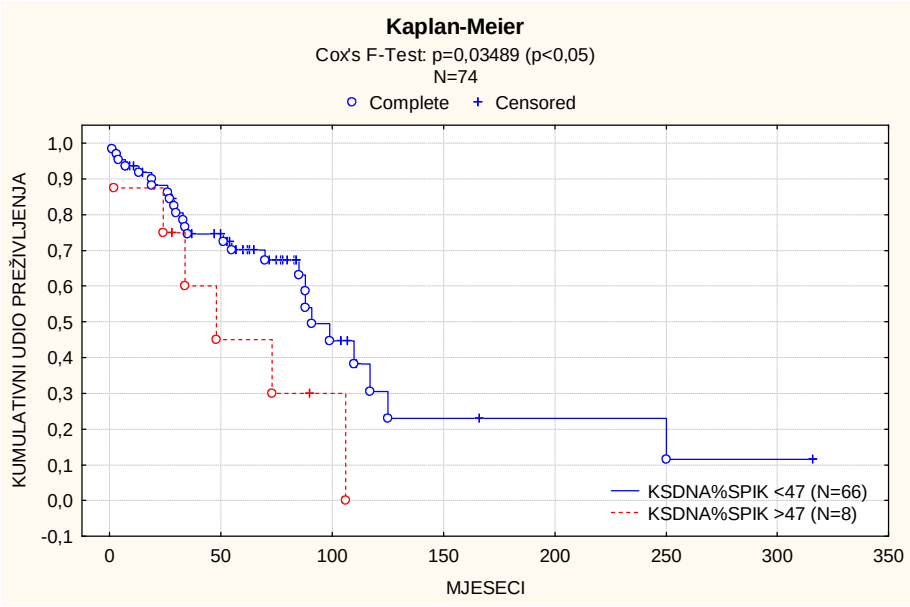
Tablica 25. Statistički značajno preživljenje u bolesnika s KLLPB i BKLL+V odnosu na osobine statičke DNA citometrije

| POKAZATELJI | KLLPB | | | | B-KLL+V | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GV | Broj i % ispitanika | Med (mj) | p vrijednost | GV | Broj i % ispitanika | Med (mj) | p vrijednost |
| **KSDNA%SPIK** | ≤47 | 77 (89,5%) | 91 | 0,03766 | <47 | 66 (89,2%) | 91 | 0,03489 |
| | >47 | 9 (10,5%) | 71 | | >47 | 8 (10,8%) | 48 | |
| **KSDNA%S>PIK** | ≤55 | 80 (93,0%) | 88 | 0,04616 | <55 | 80 (93,0%) | 88 | 0,04616 |
| | >55 | 6 (7,0%) | 19 | | >55 | 6 (7,0%) | 19 | |
| **KSDNA%S<PIK** | ≤20 | 30 (37,0%) | 70 | 0,04769 | ≤20 | 27 (38,0%) | | 0,03175 |
| | >20 | 51 (63,0%) | 88 | | >20 | 44 (62,0%) | | |
| **KSDNA%SFC** | >4,1 | 40 (46,5%) | 106 | 0,02242 | >4,1 | 39 (52,7%) | 106 | 0,02242 |
| | ≤4,1 | 46 (53,5%) | 85 | | <4,1 | 35 (47,3%) | 88 | |
| **PKDNADI** | ≤1,01 | 65 (81,3%) | 70 | 0,00553 | <1,08 | 56 (78,9%) | 70 | 0,04918 |
| | >1,01 | 15 (18,7%) | 250 | | >1,08 | 15 (21,1%) | 250 | |
| **PKDNA%S>PIK** | >45 | 30 (37,0%) | 70 | 0,04769 | >45 | 27 (38,0%) | 70 | 0,03175 |
| | ≤45 | 51 (63,0%) | 88 | | <45 | 44 (62,0%) | 80 | |
| **LCDNA%SPIK** | >35 | 14 (27,5%) | 125 | 0,04806 | | | | NS |
| | ≤35 | 37 (72,5%) | 55 | | | | | |
| **LCDNA%S>4N** | ≤2,5 | 45 (88,2%) | 88 | 0,03533 | | | | NS |
| | >2,5 | 6 (11,8%) | 19 | | | | | |

*Legenda: GV-granična vrijednost; Med-medijan preživljenja u mjesecima; p-razina statističke značajnosti; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; B-KLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; PIK- vršak DNA histograma; DNA%SPIK-postotak stanica u vrhu DNA histograma; DNA%S<PIK-postotak stanica koje sadrže manju količinu DNA od stanica u vršku; DNA%S>PIK-postotak stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica u vršku; DNA%S>4N-postotak stanica koje sadrže DNA više od 4N; DNA%SFC-postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa*



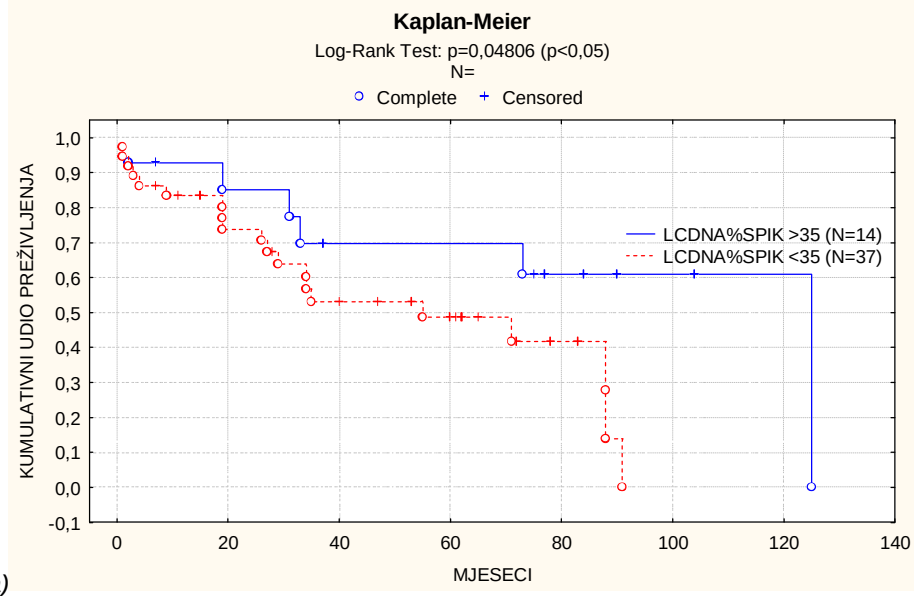

a)



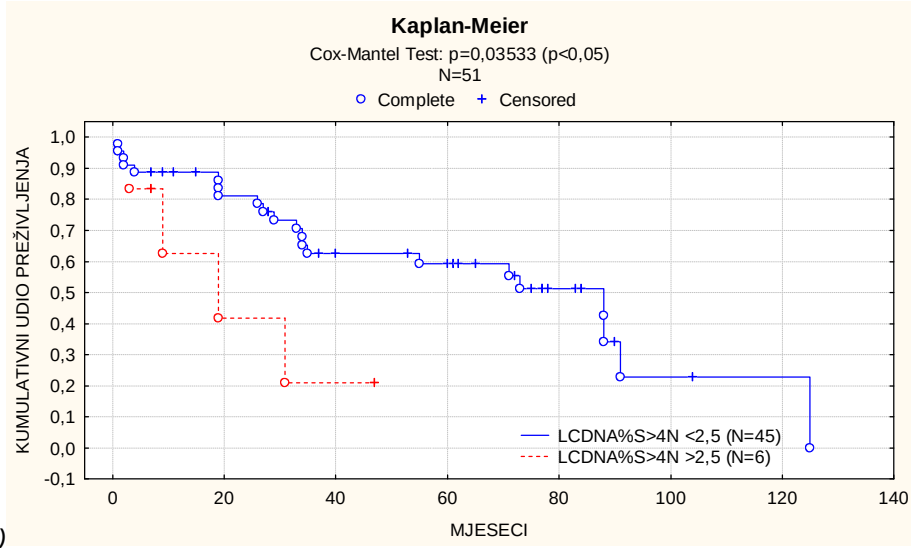

b)

*Legenda: N – broj ispitanika, DNA – deoksi nukleinska kiselina; KSDNA%SPIK – postotak stanica u vršku DNA histograma limfatičnih stanica koštane srži*

Slika 28. Preživljenje u odnosu na postotak stanica u vršku DNA histograma limfatičnih stanica koštane srži ispitanika s (a) KLLPB i (b) B-KLL+V



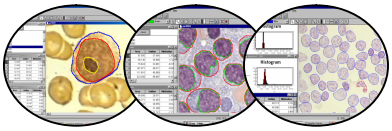

*a)*




*b)*

*Legenda: N – broj ispitanika, DNA – deoksi nukleinska kiselina; LCDNA%SPIK – postotak limfatičnih stanica u vršku DNA histograma; LCDNA%S>4N – postotak limfatičnih stanica koje sadrže količinu DNA >4N u limfnom čvoru*

Slika 29. Preživljenje u odnosu na (a) postotak limfatičnih stanica u vršku DNA histograma limfnog čvora i na (b) postotak limfatičnih stanica koje sadrže količinu DNA > 4N u limfnom čvoru ispitanika s KLLPB



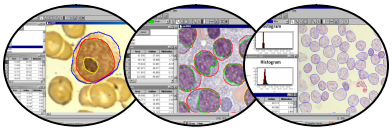
## 4.4. PROLIFERACIJKO-KINETIČKI INDEKS ZA KLLPB I B-KLL+V

Na osnovu statistički značajne razlike u preživljenju bolesnika s KLLPB i B-KLL+V *(tablica 26)* izdvojeno je 9 najreprezentativnijih statistički značajnih (od ukupno 41) ICM i IAgNOR pokazatelja *(tablica 27)* u svrhu određivanja proliferacijsko-kinetičkog indeksa (PKI) kao neovisnog prognostičkog pokazatelja *(tablica 28, slika 30)*.

Tablica 26. Statistički značajni pokazatelji boljeg preživljenja AgNOR-a i statičke DNA citometrije u različitim odjeljcima tumorske mase u bolesnika s KLLPB i B-KLL+V; Kaplan-Meier, razina statističke značajnosti p<0,05

| KOMPJUTERSKA ANALIZA | POKAZATELJI | KS | | PK | | LČ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | KLLPB | B-KLL+V | KLLPB | B-KLL+V | KLLPB | B-KLL+V |
| IAgNOR | AGBHOM | ≤0,25 | | >0,3 | >0,3 | | |
| | AGSHOM (μm$^2$) | ≤0,43 | | >0,3 | >0,3 | | |
| | AGHOM/J | ≤0,004 | ≤0,004 | >0,002 | >0,002 | | |
| | AGSINH (μm$^2$) | ≤3,5 | | ≤3 | ≤3,1 | ≤3,674 | |
| | AGSINH/J | | | ≤0,04 | ≤0,047 | | |
| | AGBPR | | | ≤0,65 | ≤0,65 | | |
| | AGSPR (μm$^2$) | | | ≤2,3 | | | |
| | AGBUKUP | ≤1,6 | ≤1,65 | >1,37 | | | |
| | AGSUKUP (μm$^2$) | ≤6,4 | >4 | ≤6,5 | ≤5 | | |
| | AGSUK/J | ≤0,07 | >0,06 | ≤0,07 | ≤0,07 | ≤0,065 | |
| ICM | DNA%SPIK | ≤47>28,2 | ≤47>33 | | | >35 | |
| | DNA%S<PIK | >20 | >20 | | | | |
| | DNA%S>PIK | ≤55 | ≤55 | ≤45 | ≤45 | | |
| | DNA%S>4N | | | | | ≤2,5 | |
| | DNA%SFC | >4,1 | >4,1 | | | | |

*Legenda: AgNOR-srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije; ICM-statička DNA citometrija; KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; B-KLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; AGBHOM-broj homogenih AgNOR-a; AGSHOM-površina homogenih AgNOR-a; AgSHOM/J-omjer homogenih AgNOR-a i jezgre; AGSINH-površina inhomogenih AgNOR-a; AGSMAINH-najveća površina inhomogenih AgNOR-a; AGSINH/J-omjer inhomogenih AgNOR-a i jezgre; AGBPR-broj prstenastih AgNOR-a; AGSPR-površina prstenastih AgNOR-a; AGSMAPR-najveća površina prstenastih AgNOR-a; AGBUKUP-ukupan broj svih AgNOR-a; AGSUKUP-ukupna površina svih AgNOR-a; AGSUK/J-omjer ukupne površine AgNOR-a i jezgre; DNA%SPIK-postotak stanica u vršku DNA histograma; DNA%S<PIK-postotak stanica koje sadrže manju količinu DNA od stanica u vršku; DNA%S>PIK-postotak stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica u vršku; DNA%S>4N-postotak stanica koje sadrže DNA više od 4N; DNA%SFC-postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa*



Tablica 27. Najreprezentativniji statistički značajni pokazatelji „score“-a proliferacijsko-kinetičkog indeksa (PKI) za KLLPB i B-KLL+V

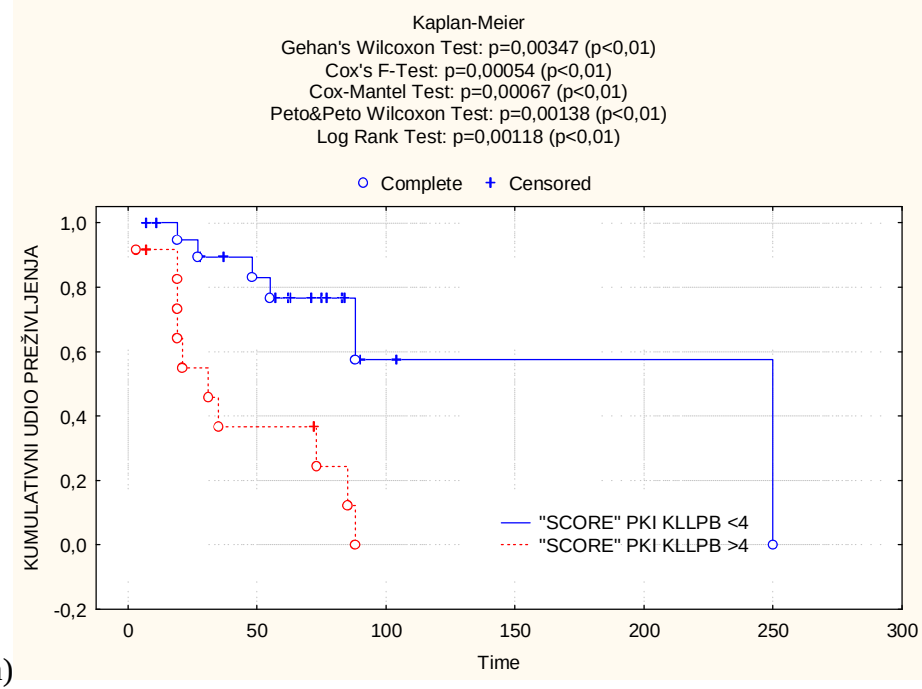
| POKAZATELJI | KLLPB | | B-KLL+V | |
|---|---|---|---|---|
| | GRANIČNE VRIJEDNOSTI | BODOVI | GRANIČNE VRIJEDNOSTI | BODOVI |
| Površina homogenih AgNOR-a (PK) | >0,3 $\mu m^2$ | 0 | >0,3 $\mu m^2$ | 0 |
| | ≤0,3 $\mu m^2$ | 1 | ≤0,3 $\mu m^2$ | 1 |
| Površina inhomogenih AgNOR-a (PK) | ≤3,0 $\mu m^2$ | 0 | ≤3,1 $\mu m^2$ | 0 |
| | >3,0 $\mu m^2$ | 1 | >3,1 $\mu m^2$ | 1 |
| Površina prstenastih AgNOR-a (PK) | ≤2,3 $\mu m^2$ | 0 | | |
| | >2,3 $\mu m^2$ | 1 | | |
| Broj prstenastih AgNOR-a (PK) | | | ≤0,65 | 0 |
| | | | >0,65 | 1 |
| Površina svih AgNOR-a (PK) | ≤6,5 $\mu m^2$ | 0 | >4 $\mu m^2$ | 0 |
| | >6,5 $\mu m^2$ | 1 | ≤4 $\mu m^2$ | 1 |
| % stanica u PIK-u DNA histograma (KS) | 28-47% | 0 | 33-47% | 0 |
| | ≤28% | 1 | ≤33% | 1 |
| | >47% | 1 | >47% | 1 |
| % stanica u <PIK-a DNA histograma (KS) | >20 % | 0 | >20% | 0 |
| | ≤20 % | 1 | ≤20% | 1 |
| % stanica u >PIK-a DNA histograma (PK) | ≤45% | 0 | ≤45% | 0 |
| | >45% | 1 | >45% | 1 |
| %SFC DNA histograma (KS) | >4,1% | 0 | >4,1% | 0 |
| | ≤4,1% | 1 | ≤4,1% | 1 |

*Legenda: PIK-vršak DNA histograma; KS-koštana srž; PK-periferna krv; LČ-limfni čvor; AgNOR-srebrom prikazane regije nukleolarne organizacije; SFC-%stanica u S-fazi staničnog ciklusa*

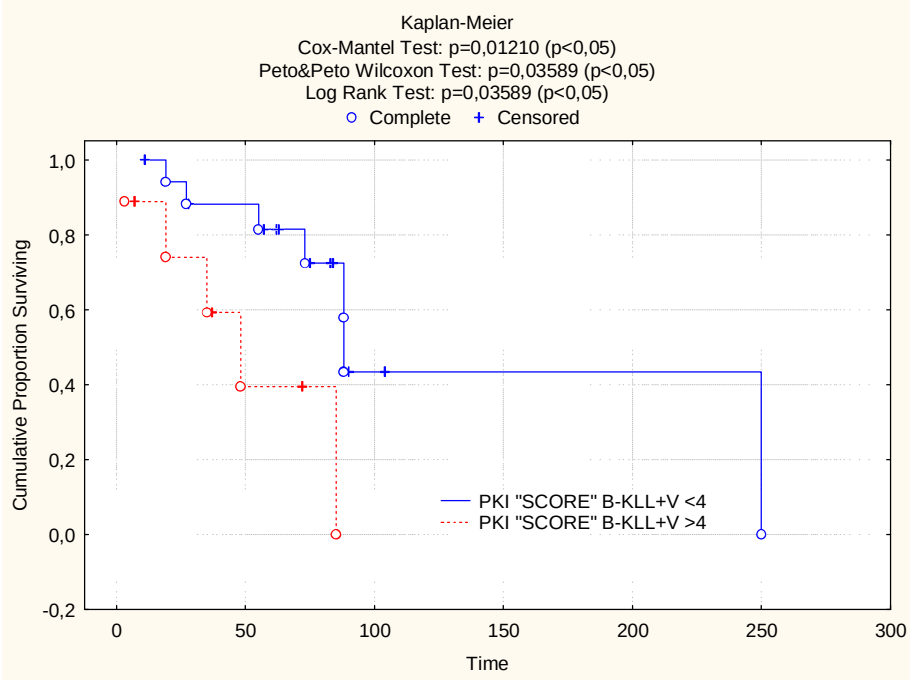
Tablica 28. Prognoza i PKI „score“ za KLLPB i B-KLL+V

| PROGNOZA | PKI «SCORE» ZA KLLPB | PKI «SCORE» ZA B-KLL+V |
|---|---|---|
| **BOLJA** | ≤4 | ≤4 |
| **LOŠIJA** | >4 | >4 |

*Legenda: KLLPB-leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti; B-KLL+V-B kronična limfocitna leukemija s varijantama; PKI-proliferacijsko-kinetički indeks*



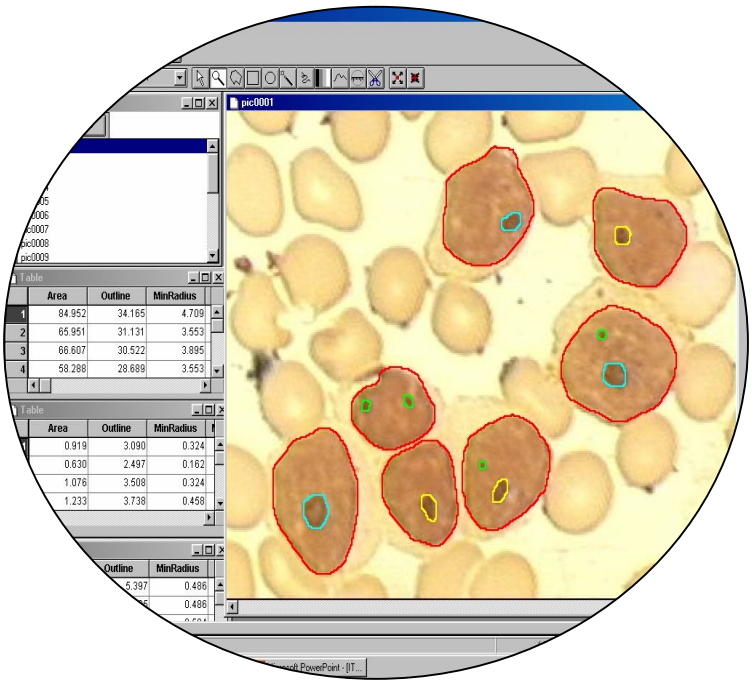

a)




b)

*Legenda: PKI – proliferacijsko-kinetički indeks*

Slika 30. Preživljenje u odnosu na PKI »SCORE» za (a) KLLPB i (b) B-KLL+V


pic0001
Table
Area
Outline
MinRadius
1 84.952 34.165 4.709
2 65.951 31.131 3.553
3 66.607 30.522 3.895
4 58.288 28.689 3.553
Table
Area
Outline
MinRadius
0.919 3.090 0.324
0.630 2.497 0.162
1.076 3.508 0.324
1.233 3.738 0.458
Outline
MinRadius
5.397 0.486
0.486

# 5. RASPRAVA

Klinička slika leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti pokazuje značajnu heterogenost, medijan preživljenja varira od 2-20 godina za različite stadije bolesti. Tako nepredvidiv tijek inspirirao je, preko 30 godina, mnoge kliničke hematologe i onkologe da traže nove pokazatelje koji će predvidjeti preživljenje i progresiju bolesti. Klinički stadiji bolesti po Rai-u[269] i Binet-u[270] uzimani su i za planiranje terapije i za predviđanje tijeka bolesti, iako niti jedan nije mogao izdvojiti bolesnike visokog rizika što se tiče progresije bolesti.[271]

Zbog toga se pokazalo nužno tražiti dodatne prognostičke pokazatelje, koji bi objektivizirali korist od ranog terapijskog pristupa, naročito u ranim stadijima.

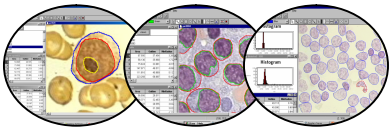
U ovoj studiji je kombinacijom inovativnih proliferacijskih i kinetičkih pokazatelja (homogenih, inhomogenih i prstenastih AgNOR-a i karakteristika diploidnog tipa histograma u različitim odjeljcima tumorske mase) sačinjen prognostički indeks s izrazito visokom prognostičkom snagom te tako potvrdila postavljena hipoteza kako se i unutar relativno nisko malignih neoplazmi kao što je KLLPB i njene podskupine mogu izdvojiti prognostički lošije/bolje podskupine te predvidjeti tijek bolesti.

Na osnovu najreprezentativnih pokazatelja AgNOR-a i DNA (vezanim za preživljenje) u različitim odjeljcima tumorske mase izračunat je «score» za PKI, posebno za cjelokupnu populaciju KLLPB, a posebno za B-KLL+V. Statistički značajno bolju prognozu imali su bolesnici s KLLPB i u skupini B-KLL+V kod je PKI bio manji od 4.

Postoje brojne studije o morfometriji, određivanju količine DNA i osobinama AgNOR-a u različitim benignim, premalignim i malignim lezijama najrazličitijih organa pa i tako i na području leukemija i limfoma.[272,273,274,275,276,277]

Osobine regije nukleolarne organizacije su jednostavan put za razlikovanje stanica u mirovanju od onih koje su uključene u stanični ciklus.[278] Broj i veličina AgNOR-a korelira s razinom rDNA transkripcije,[279,280] stupnjem stanične proliferacije[281] i frakcijom tumorskog rasta,[282] te se kvantifikacija AgNOR-a uzima kao obilježje i/ili stupnjevanje različitih tipova malignih stanica u citološkim i histološkim preparatima.

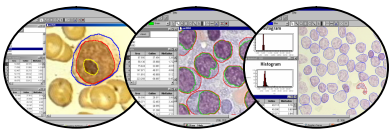
U normalnoj hematopoezi, svaki tip stanica ima svoj vlastiti tip rasporeda AgNOR-a, prema stadiju sazrijevanja.[283,284] Nakupine AgNOR-a nađene su samo u proliferirajućim stanicama, dok su u zrelim neproliferirajućim stanicama nađene samo pojedinačne



točkice. Ti rezultati ukazuju na fiziološke razlike između nakupina i pojedinačnih točkica i opravdavaju njihovo posebno vrednovanje. Bojenjem nukleola i/ili ostalih struktura regija nukleolarne organizacije crne točkice se mogu prikazati u svim stanicama. AgNOR struktura normalnih limfatičnih i plazma stanica u koštanoj srži je vrlo karakteristična. U 80% slučajeva se radi o jednoj velikoj okrugloj točci, najčešće smještenoj periferno, odgovara jezgrici i mjeri 2,5-3 µm.[285] Međutim, maligne limfatične stanice pokazuju kvalitativne i kvantitativne promjene AgNOR-a u odnosu na benigne (reaktivne) limfocite, te kvantitativna studija AgNOR-a pomaže u diferencijalnoj dijagnozi između reaktivne hiperplazije i NHL-a.[286] Mnogi autori su uočili razliku između osobina AgNOR-a nisko i visoko malignih limfoma.[287,288,289,290,291] Analizirajući veličinu AgNOR-a dokazana je manja pojedinačna vrijednost u limfomskim stanicama nego u normalnim limfocitima.[292] Broj nakupina po stanici AgNOR-a u akutnim limfatičnim leukemijama korelira s brojem leukocita.[293] Seili[159] u svom radu opisuje prognostički značaj samo najmanje i najveće nakupine AgNOR-a u limfoblastima akutne limfatične leukemije.

U standardno obojenim razmazima kronična limfatična leukemija ima male do srednje velike limfocite bez jasno vidljivih jezgrica. Prominentne jezgrice se nalaze u srednje do velikim limfatičnim stanicama KLL-a i PLL te velikim stanicama Richterovog sindroma. Struktura AgNOR-a u većini limfatičnih stanica KLL-a je slična onima u normalnim limfocitima odnosno prikazuje se kao jedna velika točka. Međutim, uspoređujući je s normalnim limfocitma često pokazuju razlike u veličini i obliku. Srednje velike do velike stanice PLL-a, HCL ili pak Richterovog sindroma imaju različite strukture i kompleksne konfiguracije AgNOR-a.[197] Međutim postoje i mišljenja da AgNOR struktura nije od pomoći u razlikovanju KLL-a od PLL-a.[294]

Slično strukturi AgNOR-a u akutnim leukemijama, Metze i autori[295] i kod KLL opisuju AgNOR-e kao kompaktne (jedan ili najviše dva) ili veće heterogene precipitate tzv. nakupine (engl. *clusters*) unutar ili pak točkice izvan strukture jezgrica. Diferenciranje između nakupina i malih homogenih AgNOR-a je važno u analizi limfocita kod KLL-a. Limfociti koji sadrže jednu AgNOR nakupinu korespondiraju s cirkulirajućom proliferacijskom frakcijom u bolesnika s KLL-om.[266] Limfociti u mirovanju (engl. *resting lymphocytes*) ne sadrže nakupine.[296] Postoji obrnuta povezanost između ovih pokazatelja te DTL i TTM s jedne strane,[297,298] i pozitivna povezanost sa smanjenjem tumora nakon kemoterapije s druge strane.[299] Postotak stanica s AgNOR nakupinama je također važan neovisni prognostički faktor stabilne faze bolesti, odnosno perioda bez terapije (engl. *treatment-free period*),[300] a dobro korelira i s dobi.[301] Bolesnici s visokim



postotkom AgNOR nakupina i/ili visokim vrijednostima ukupne tumorske mase (progresivni slučajevi) imaju manju sposobnost spontane apoptoze in vitro.[302,303] Mourad i sur.[304] uvode prosječni broj AgNOR-a po jezgri – mAgNOR (engl. mean AgNOR) i AgNOR proliferativni indeks – pAgNOR (postotak jezgara koje sadrže ≥5AgNOR-a po jezgri). mAgNOR je povezan s ploidijom (aneuploidne stanice imaju ≥2,4 mAgNOR-a dok diploidne stanice imaju <2,4 mAgNOR-a po jezgri). Visoki pAgNOR-i je povezan s pozitivnošću interleukin-2 receptora što govori za vezu pAgNOR-a s proliferativnosti stanice. To također indicira korištenje jednostavne metode bojenja srebrom regija nukleolarne organizacije kao alternativne kinetičke metode, u slučajevima nemogućnosti primjene drugih tehnika kao što su protočna citometrija, određivanje Ki-67 indeksa, IL-2R ekspresije ili P53 i BCL2 proteina.[305]

Diferenciranje AgNOR-a u ovoj studiji, u tri *inovativna tipa*: homogeni, inhomogeni i prstenasti pokazali su statističku značajnost s osobinama DNA histograma i morfometrijskim karakteristikama stanice i jezgre, kao i ulogu u preživljenju, tipu distribucije tumorske mase, biološkom ponašanju tumorske bolesti te morfološkim karakteristikama limfatičnih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi.

Dugo je poznato kako je tumorska geneza često udružena s kromosomskim abnormalnostima, promjenama genoma, mjerljivim razlikama u količini DNA tzv. ploidiji i varijacijama u staničnom ciklusu neoplastičnih stanica.[306] Količina DNA i varijacije staničnog ciklusa mogu se brzo izmjeriti protočnim citometrom te kompjuterskom, odnosno statičkom DNA citometrijom.[307]

Prisutna je razlika u DNA ploidiji u različitim podtipovima velikostaničnih limfoma centra folikla[308] a Wojcik[309] je analizirajući količinu DNA između limfoma plaštene i limfoma marginalne zone pokazala da se radi o dva podtipa s različitim biološkim ponašanjem. Opisano je i kako aneuplodija u malignim limfomima korelira s proliferativnim biljezima (Ki67).[310]

Budući je tipična B-KLL nisko maligna neoplazma s diploidnim DNA indeksom i niskom proliferativnom aktivnosti,[311] u literaturi ima malo podataka o tim vrstama analiza.[312] Studije s određivanjem broja limfocita u S-fazi protočnim citometrom pokazale su kako su spomenuti pokazatelji udruženi s lošijom prognozom, ali niti jedna od njih nije testirana u velikim studijama multivarijatnom analizom.[313] Većina je našla niski postotak stanica u S-fazi u perifernoj krvi bolesnika s KLL-om (2±1%)[314]ili (2±2)[315] iako ima i

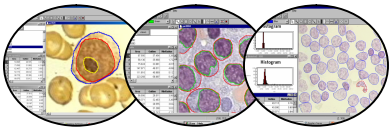
radova s većim ukupnim brojem stanica u S-fazi koji je povezan s kraćim periodom bez terapije i kraćim ukupnim preživljenjem.[316] Uspoređujući količinu DNA također protočnim citometrom, u kroničnoj limfocitnoj leukemiji, s kliničkim podacima Dudko i sur.[317] razlikuju dvije varijante CLL-a: akumulativnu i proliferativnu. Postoje radovi gdje DNA ploidija i kinetika tumora nije pokazivala razlike između limfocita tumora i zdravih osoba, ali je došlo do povećanja ploidije u ranoj fazi maligne transformacije.

U analizi DNA histograma malignih tumora diploidni tipovi histograma su smatrani kao dobri prognostički pokazatelji i kao takvi nisu detaljnije analizirani. Međutim, ova analiza gdje je primijenjen *novi modificirani pristup analize diploidnog tipa histograma: određivanje postotka stanica u vršku DNA histograma; postotka stanica koje sadrže manju i/ili veću količinu DNA od stanica u vršku* uz već standardne karakteristike: postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa te postotak stanica s količinom DNA višom od 4N, pokazala je kako su isti adekvatni za kinetičku analizu metodom statičke DNA citometrije.

Općenito, dobri prognostički pokazatelji su veći postotak stanica u vršku DNA histograma te veći postotak stanica s manjim sadržajem DNA od stanica u vršku, a lošiji veći postotak stanica s većim sadržajem DNA od stanica u vršku, stanice s patološkim mitozama (većim sadržajem DNA od 4N) te više stanica u S-fazi staničnog ciklusa.

Osim s preživljenjem i pokazatelji progresije bolesti (DTM i DTL) te veličina tumorske mase (TTM) pokazali su statističku značajnost ($p<0,05$) u odnosu na inovativne pokazatelje mjerenja DNA: DTM za postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa u perifernoj krvi; DTL za postotak stanica sa sadržajem DNA većim od vrška u perifernoj krvi; visoka i niska TTM za postotak stanica u S-fazi i postotak stanica sa sadržajem DNA većim od vrška također u perifernoj krvi te za postotak stanica sa sadržajem DNA većim od vrška u limfnom čvoru.

Vrijednost morfometrije proučavana je na cijelom nizu različitih tumora, kako u svrhu razlikovanja pojedinih dijagnostičkih kategorija, odnosno benignih i malignih promjena, tako i sa ciljem vrednovanja morfometrijskih karakteristika u predviđanju toka bolesti i prognoze. Morfometrijski podaci pokazali su značajnu razliku između benignih i malignih lezija pankreasa,[318] neoplastičnih i ne-neoplastičnih folikularnih čvorova štitnjače,[319] kao i lezijama prostate,[320,321] te subklasifikaciji tumora dojke.[322] Korisni podaci dobiveni su i u dijagnozi izljeva bogatih limfocitima (benigni, limfomski ili



KLL),[323] analizi limfatičnim stanica u razmazu periferne krvi zdravih osoba i bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom,[324] pojedinih tipova stanica u ne-neoplastičnim limfnim čvorovima,[325] te tipizaciji i subtipizaciji malignih limfoma.[326,327,328,329] Za razliku od prognostičke vrijednosti morfometrijskih parametara u limfoblastičnim leukemijama djece,[330,331] važnost veličine i morfometrijskih karakteristika limfocita u perifernoj krvi je kontroverzan prognostički indikator u kroničnoj limfocitnoj leukemiji.[332] Morfometrijska analiza veličine tumorske infiltracije (>60%) u histološkom uzorku bioptata kosti pokazuje statističku značajnost sa stadijem A i C po Binet-u (ali ne i B) te s intersticijskim i difuznim tipom infiltracije za razliku od nodularnog i miješanog uzorka.[333]

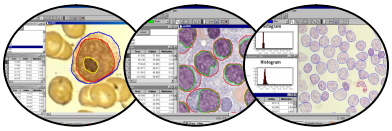
Morfometrijske karakteristike cijele stanice i jezgre određuju podtip KLLPB, a samim time i prognozu. Naši rezultati sukladno tome govore kako su manje stanice (površinom, opsegom, polumjerom) manjih jezgara te nižeg nukleo-citoplazmatskog odnosa pokazatelji bolje prognoze.

Neki literaturni podaci opisuju odsustvo povezanosti AgNOR parametara s DNA pokazateljima.[159] Međutim, Böcking i sur. [334] opisuju multimodalnu staničnu analizu koja uključuje morfometriju jezgre, strukturu kromatina, osobine nukleola, regije nukleolarne organizacije (AgNOR-a) te DNA-ICM u svrhu poboljšanja sigurnosti dijagnoze malignih tumora, analizi uzorka s malim brojem atipičnih stanica te mogućnost rane dijagnostike bolesti.

Na našem materijalu pokazala se povezanost morfometrijskih karakteristika, proliferacijskih karakteristika različitih tipova AGNOR-a i novoopisanih obilježja diploidnog tipa histograma.

Na osnovu toga potvrđena je hipoteza kako su: nisko proliferativne stanice one koje imaju male homogene AgNOR-e te većinu stanica u vršku (PIK-u) DNA histograma; visoko proliferativne one stanice s inhomogenim AgNOR-ima, od kojih većina sadrži količinu DNA veću od stanica u vršku ili s patološkim mitozama (DNA>4N) ili ih je veći broj stanica u S-fazi staničnog ciklusa, a negdje u sredini su stanice sa srednje velikim prstenastim AgNOR-a.

Različita ispitivanja limfatičnih stanica uglavnom su rađena samo u jednom odjeljku tumorske mase i to pretežno na razmazima periferne krvi[335,336,337,338]ili limfnom čvoru.[339]



Jakšić O.[340] je prvi koji je između pojedinih odjeljaka tumorske mase analizirao povezanost adhezijskih molekula, kao važnih faktora u raspodjeli tumorske mase.

Morfometrijska i kinetička obilježja tumorskih stanica, u ovom radu, po prvi put su analizirana i uspoređivana u istog bolesnika u različitim odjeljcima tumorske mase: koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnim čvorovima. U ovim odjeljcima neoplastične stanice se nalaze u različitom mikrookolišu. Iako dobiveni rezultati govore kako se najveći broj prognostičkih pokazatelja nalazi u perifernoj krvi, samo uzorak iz periferne krvi nije reprezentativan i dostatan za istraživanja proliferativnosti ili stabilnosti bolesti te se nameće pitanje brižljive evaluacije parametara u svim odjeljcima tumorske mase kako bi se prognostički pokazatelji što preciznije definirali, što je preduvjet za racionalan terapijski pristup.

Iz naših dobivenih rezultata proizlazi kako limfatične stanice koje imaju afinitet prema akumulaciji u koštanoj srži („oštećeni“ naivni B-limfociti) u pravilu imaju malu proliferativnu aktivnost (najveći postotak stanica u vršku $G_o/G_1$ faze). Stanice koje su „programirane“ i imaju afinitet prema akumulaciji u limfne čvorove migriraju u limfne čvorove gdje se transformiraju do stupnja „programiranog stopa“ (veći broj ukupnih AgNOR-a, veća površina proliferativnijih, inhomogenih AgNOR-a i najmanji postotak stanica u $G_o/G_1$ fazi). Sama migracija stanica iz koštane srži prema limfnim čvorovima te između limfnih čvorova se događa u perifernoj krvi (mješavina stanica s nižom i višom proliferativnom aktivnosti: viši postotak stanica u SFC i istodobno u $G_o/G_1$ fazi staničnog ciklusa kao i prisustvo većih stanica, ali manjih jezgara, s prstenastim AgNOR-ima intermedijalnog stupnja proliferativnosti). Izgleda kako periferna krv ima samo transportnu ulogu.

Kada se analizira veličina stanica i njihova proliferativna aktivnost u različitim odjeljcima tumorske mase uočena je pravilnost unutar ukupne populacije KLLPB te podskupina B-KLL+V i tipičnih B-KLL-a. Dok se stanice u KS i PK ne razlikuju bitno po veličini i proliferativnoj aktivnosti, obrnuta je situacija ako se gleda periferna krv i limfni čvor. Nasuprot očekivanju, kako su male stanice mirnije, a veće proliferativnije, analiza je pokazala da su u PK stanice najveće i najmirnije, za razliku od limfnog čvora gdje su najmanje i najaktivnije.

U analizu su uključeni rutinski preparati. Postavlja se pitanje različite tehnike pripreme razmaza punktata limfnog čvora, koštane srži i periferne krvi. Dobiveni rezultati se mogu potvrditi ili osporiti mjerenjem stanica u nativnom uzorku što će biti naša

slijedeća uloga.

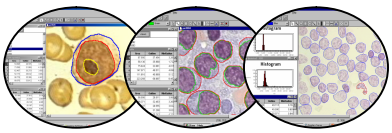
Zanimljivo je opažanje u ovom radu, kako bolje preživljenje pokazuju bolesnici kod kojih je nešto veća proliferativna aktivnost u koštanoj srži (manje od 47% limfatičnih stanica u PIK-u, ali ne manje od 28,2% te veći postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa) što je najvjerojatnije povezano s apoptozom. Potvrđena je hipoteza kako samo stanice koje se dijele mogu ući u apoptozu, koja je mehanizam i terapijskog djelovanja. Proapoptotična aktivnost lijekova koja dovodi do inhibicije RNA sinteze ili alteracije DNA popravka nije moguća ako se stanice ne dijele.[341] Stanice s neobnovljenim ili krivo obnovljenim DNA podliježu apoptozi ili kromosomskim oštećenjima.[342] Slaba proliferativna aktivnost u koštanoj srži dovodi do nakupljanja dugo živućih, funkcionalno inaktivnih neoplastičnih B limfocita zaustavljenih u $G_0$ fazi staničnog ciklusa. Slične rezultate (iako u uzorku periferne krvi) opisuje Vrhovac i suradnici gdje je visoka ekspresija $p27^k$ (proteina uključenog u proces inhibicije rasta) jako povezana s DTL i DTM, a udružena je i s lošim ukupnim preživljenjem.[336]

To potvrđuje teoriju kako je klonalni porast B-limfocita više uzrokovan smanjenjem stanične smrti uzrokovane slabom proliferativnom aktivnošću, nego povećanjem stanične proliferacije.[343] Međutim, neke studije ukazuju na proliferaciju KLL limfocita na visokom nivou, što je donekle u konfliktu s dogmom kako je B-KLL bolest karakterizirana isključivo staničnim nakupljanjem zbog poremećene apoptoze.[344]

Navodeći kontroverze prognostičkih pokazatelja velikih kliničkih studija Hallek i sur.[271] su uspoređivali samo one koje su zadovoljavali tri kriterija: studije s više od 100 bolesnika, pet ili više prognostičkih faktora uz primjenu multivarijatne analize.[345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362]

Dob i spol je neovisan prognostički pokazatelj u većine ispitivanih studija (u 13/20 za dob i 8/17 za spol).[346] Produženjem očekivanog životnog vijeka u općoj populaciji povećana je i incidencija KLL u starijih osoba s medijanom pojavljivanja bolesti u 70-toj godini, za razliku u 60-65-toj godini opisivanoj nekoliko desetljeća ranije. Međutim, 10-20%-tno povećano dijagnosticiranje KLL u bolesnika mlađih od 50 godina posljedica je brojnijih analiza ove bolesti.[363]

Postoji slaganje da je incidencija KLL veća u muškaraca nego u žena. Podaci se kreću od 1,5:1 do 2:1.[364,365] Rezultati naše studije su komparabilni, muškarci su češće obolijevali (1,38:1), podjednaka je bila dob među ispitanicima različitog spola. Međutim,



stariji su značajnije obolijevali od tipične B kronične limfatične leukemije i njenih varijanti, a mlađi od ostalih oblika KLLPB bez razlike na spol.

Muškarci općenito imaju lošiju prognozu nego žene. Razlog za ovu razliku nije jasan. Možda je razlog duži životni vijek žena u općoj populaciji, kao i činjenica da bolest ima tendenciju prezentiranja s blažom slikom u žena nego u muškaraca. Međutim, iako su žene imale duže preživljenje nisu sve studije pokazale statistički značajnu razliku.[364] Spol je u našoj studiji dobar prognostički pokazatelj, žene su imale statistički značajno bolje preživljenje.

Tvrdi se kako i mlađi i stariji bolesnici imaju podjednako preživljenje (oko 10 godina), ali su uzroci smrti različiti. Nasuprot mlađim bolesnicima koji direktno umiru od posljedica leukemije, uzroci umiranja starijih nisu vezani za leukemiju.[366] Brižljiva analiza pokazala je da se smrtnost u bolesnika <50 godina ne razlikuje od onih >50 godina.[367] Bez obzira na to, ne može se zanemariti činjenica kako je dob dobro znani dobar prognostički faktor.[368,369]U registriranim studijama nalazi se podatak o skraćenom očekivanom preživljenju koje ovisi o razdoblju prezentacije bolesti.[370] Rozman i sur. [371] uspoređivali su dvije skupine: jednu kod kojih je dijagnoza postavljena između 1960-1979. g. i grupu između 1980-1989. godine. Primijećeno je kako je dijagnoza u drugoj grupi postavljena u starijoj životnoj dobi što se tiče i muškaraca i žena i u ranijem kliničkom stadiju bolesti (Binet A). Preživljenje je bilo skoro duplo u drugoj skupini, utjecaj bolesti bio je daleko manji u zadnjoj skupini. Autori postavljaju pitanje promjene same prirode bolesti. Studija Faria i sur. [364] našla je veće prosječno preživljenje (78,5 mjeseci) u starijoj životnoj dobi (>65 godina), za razliku od 66,9 mjeseci u mlađih od 65 godina.

Rezultati našeg istraživanja u ukupnoj populaciji KLLPB pokazali su bolje preživljenje kod starijih bolesnika od 62 godine što se može protumačiti kako su tipični oblici B-KLL-a više zastupljeni u ovoj grupi bolesnika. Analiza dobi unutar tipičnih oblika B-KLL nije imala utjecaja na preživljenje. I tu se možda (u klasifikaciji i subklasifikaciji tipičnih i atipičnih leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti) krije uzrok tolike različitosti u prognozi obzirom na dob. Vjerojatno, ipak, dob nije KLL-specifični prognostički parametar.

Pažljiv klinički pregled bolesnika je važan korak u utvrđivanju proširenosti i progresije bolesti i glavna karika u kreiranju individualnog terapijskog pristupa. Klinički pokazatelji

kao broj povećanih limfnih čvorova, prisustvo splenomegalije i hepatomegalije su glavni kriteriji za terapijske odluke. Prognostička vrijednost ovih pokazatelja analizirana je zadnjih 20 godina. Samo 3/14 (21,4%) studija pokazali su prognostičku vrijednost povećane slezene u istraživanju Hallek-a i sur.[346] odnosno 5/10 Zwiebela i sur.[372] I kasnije pojedinačne studije nisu uspjele dokazati prognostičko značenje povećane slezene.[364] Različiti su i podaci o prognostičkoj vrijednosti povećane jetre (od 33,3% studija po Halleku i 7/8 studija po Zwiebelu). Broj regija s povećanim limfnim čvorovima u 27,3% - 33,3% pokazali su se kao neovisan prognostički faktor. Relativno niska prognostička vrijednost navedenih kliničkih pokazatelja u dosadašnjim studijama možda leži u subjektivnim, a ne objektivnim okolnostima budući u većine nisu korištene objektivne kvantitativne tehnike kao npr. abdominalni ultrazvuk ili kompjuterizirana tomografija (CT), već je korištena manualna palpacija jetre, slezene i limfnih čvorova. Zbog toga je za buduću procjenu navedenih prognostičkih faktora: splenomegalije, hepatomegalije ili limfadenopatije vrlo važno objektivizirati pretragu ističu autori.

Naši rezultati pokazali su kako su lošije preživljenje imali bolesnici kod kojih su povećani limfni čvorovi nađeni u više od jedne regije, ako je veličina slezene veća od 1 cm ispod lijevog rebranog luka, odnosno veća od 150 mm mjerena ultrazvukom te ako su limfni čvorovi u ingvinalnim regijama veći od 1 cm. Hepatomegalija nije imala utjecaja na preživljenje.

Početni dobar odgovor na kemoterapiju je dobar prognostički faktor za preživljenje.[346,349,373] Chlorambucil je prvi uveo u terapiju Galton 1961. godine[374] s rezultatom od 77% odgovora na terapiju, dok ostali autori opisuju 38-75% odgovor.[375] Varijacije u odgovoru na terapiju odnosile se su na različite doze, kombinacije s kortikosteroidima u nekim studijama kao i različitim kriterijima odgovora. 90% odgovor na terapiju komparirajući intermitentnu primjenu chlorambucila i prednisona prema samom chlorambucilu opisuje Jakšić i sur,[376] dok Francuska kooperativna skupina za KLL na 612 bolesnika s Binet stadijem A nisu našli statistički značajnu razliku u 5-godišnjem preživljenju između bolesnika koji su uzimali chlorambucil i onih koji su samo praćeni bez terapije.[377]

Naši bolesnici su imali bolje preživljenje ako prije uključivanja u studiju nisu antitumorski liječeni zbog KLLPB. U razdoblju od 1995-2002. godine uključeno je 129 novodijagnosticiranih i neliječenih ispitanika, ostali (21) su bili ranije dijagnosticirani ali 12 nije zahtijevalo antitumorsku terapiju, dok je 9 bolesnika već bilo podvrgnuto terapijskom postupku. Za 5 bolesnika nema podataka o ranijem liječenju.

Bolje preživljenje imali su i bolesnici kod kojih i tijekom praćenja nije primijenjeno liječenje zbog KLLPB (u periodu do 1992. godine kod 50% ispitanika). U bolesnika kod kojih je terapija bila indicirana, prva linija kod 29% ispitanika je bila chlorambucilom, 7% CHOP, 5% FAMP, 3% „Paule-Elrich“ modifikacija protokola prema Knospe-u, po 2% PDN i VAD, te po 1% endoksan, splenektomija u kombinaciji s kemoterapijom ili sama splenektomija.

Prognostičku vrijednost kinetike limfocita prvi je opisao 1966.g. Galton.[378] Udvostručenje limfocita je definirano kao period potreban da se broj limfocita udvostruči. Jednostavan je i vrijedan parametar u određivanju smjernica za terapiju bolesti, naročito u ranom stadiju bolesti (Binet stadij A i Rai stadij I i II). Budući se ovaj pokazatelj nikad ne izračunava kod dijagnoze, moguće ga je lako izračunati kratko nakon dijagnoze. DTL kraći od 12 mjeseci govori za agresivnu sliku i kratko preživljenje, za razliku od bolesnika s dužim periodom DTL i stabilnom limfocitozom koji idu prema indolentnoj slici. Prognostička vrijednost DTL opisana je od mnogih autora. Međutim od tri studije koje su uključivale multivarijatnu analizu komparirajući DTL s ostalim prognostičkim faktorima, samo je jedna pokazala neovisnu prognostičku vrijednost ove varijable. [379]

Analizirani pokazatelji progresije tumorske mase kao što je DTL i DTM manji od 12 mjeseci u našoj studiji imaju značajnu lošiju prognozu.

Stabilnost ili progresivnost bolesti (DTM i/ili DTL) kod male tumorske mase izvrsno je povezana brojnim ispitivanim pokazateljima dobivenim kompjuterskom analizom slike, naročito proliferacijskim i kinetičkim obilježjima AgNOR-a i sadržajem DNA analiziranim u različitim odjeljcima tumorske mase (koštanoj srži, limfnom čvoru i perifernoj krvi).

Opisani akumulacijski udio limfocita (inicijalna vrijednost limfocita podijeljena s DTL)[380] vrijedni su u određivanju statičke prema progresivnoj bolesti. Međutim mnoge druge kinetičke varijable kao vrijeme od dijagnoze do početka terapije, godine od dijagnoze, dijagnostička latencija, potencijalno vrijeme praćenja (engl. *follow-up time*) nisu pokazale prognostičku vrijednost u multivarijatnoj analizi.[271]

Danas primjenjivani stadiji bolesti temelje se na kliničkim i hematološkim pokazateljima: limfadenopatiji, splenomegaliji, hepatomegaliji, trombocitopeniji i anemiji. Prvi model

koji je opisao Rai i sur.[381] razlikuje 5 različitih prognostičkih podskupina koji se vjerojatno može reducirati u tri podskupine: sa slabom, srednjom i lošom prognozom.[382,383,384] Kod novodijagnosticiranih bolesnika ove tri kategorije su predstavljene sa 30%, 60% i 10% učešća s 10, 6 i 2 godine medijanom preživljenja. Binet-ova skupina razlikuje tri stadija (A, B i C) sa različitom prognozom. Zastupljenost kod novodijagnosticiranih bolesnika je 60%, 30% i 10%, s medijanom preživljenja 9, 5 i 2 godine.[385] Internacionalna skupina za KLL (IWCLL) definira subkategorije Binet-ovog sistema u namjeri integriranja kliničkih stadija po Rai-u,[386] a istraživači koriste kontinuirano i Binet-ovu (najčešće upotrebljavanu u Europi) i Rai-ovu (najčešće upotrebljavanu u Americi) klasifikaciju. Poznato je kako stadij bolesti po Binet-u sadrži sve relevantne prognostičke informacije kao što su klinički i hematološki pokazatelji (zahvaćenost limfnih čvorova, anemija, trombocitopenija) potpomognuto je i činjenicom da je u 9/10 studija pokazano da sadrži neovisne prognostičke faktore.[364,387,388] Neovisni prognostički efekt Rai-ove klasifikacije je slabije učestalosti, u svega 4 od 11 studija.[364,389,] IWCLL klasifikacije se mnogo rjeđe koriste, iako je možda i bolja i od Binetove klasifikacije budući sadrži prognostičke informacije iz dvije klasifikacije. GIMEMA skupina definira stadij bolesti na retrospektivnoj evaluaciji 1777 bolesnika s dijagnozom KLL. Kao loši prognostički pokazatelji uzeti su: limfocitoza >60 x $10^9$/L, anemija (Hb <10g/dl), broj povećanih limfnih čvorova (>2) ili palpabilna jetra ili slezena ispod rebranih lukova (>3 cm). Klasifikacija Lee i sur.[390] bazira se na sličnom konceptu: ali su kao pokazatelji slabije prognoze uzeti drugi pokazatelji: dob >60 godina, proširenost limfadenopatije uz neke biokemijske pokazatelje: LDH>325U/dl, APH>80 U/DL, urična kiselina>7 mg/dl.

Totalna tumorska masa je kvantitativna klasifikacija temeljena na kliničkim pokazateljima tumorske mase unutar svih velikih tjelesnih odjeljaka.[365] Ima karakter kontinuirane varijable te može poslužiti za procjenu progresije s jedne strane i procjenu terapijskog efekta s druge strane, tj. može se primijeniti i u toku liječenja i neovisno o simptomima insuficijencije mijelopoeze procjenjivati antitumorski učinak terapije. Navedene značajke čine TTM klasifikaciju osobito prikladnom za planiranje i praćenje kliničkih pokusa u KLL te se sve češće rabi u međunarodnim pokusima i rutinskoj praksi.[49]

Novi klinički parametar kao distribucija tumorske mase (engl. *tumor distribution* - TD)[391] evaluira distribuciju tumorske mase između različitih odjeljaka (periferne krvi, koštane srži, limfnih čvorova i slezene) indolentnih limfoproliferativnih bolesti. Odnos ukupne tumorske

mase i limfocitoze u perifernoj krvi (TTM/$TM_1$) razlikuje 3 kategorije: pravu leukemiju (TD 100%), predominantnu leukemiju (TD 50-99%) i predominantno limfome (TD <50%). Kao novi klinički parametar TD se pokazao prognostički značajan u odgovoru na terapiju i preživljenje.

Klinički pokazatelji s boljim preživljenjem u ovoj studiji su bolesnici s kliničkim stadijem 1 i 2 prema Binet-u, stadijem 0 i 1 prema Rai-u te TTM manja od 9 te $TM_1$ manji od 7 po Jakšiću, u ispitanika s KLLPB.

Veliki broj morfometrijskih, proliferacijskih i kinetičkih pokazatelja pokazuje statistički značajnu povezanost s kliničkim stadijem bolesti po Binet-u i Rai-u te veličinom tumorske mase (TTM) po Jakšiću.

I druge metode mogu biti upotrebljavane za usporedbu proliferacije tumorskih stanica s kliničkim karakteristikama. Cordone i sur.[392] su analizirali učestalost i kliničku značajnost Ki-67 pozitivnih stanica. Postotak i apsolutni broj Ki-$67^+$ stanica našao je u višim i uznapredovalim stadijima bolesti i u slučaju većeg udjela prolimfocita. Isto tako sve limfomske stanice u Richterovu sindromu su bile Ki-$67^+$. S druge strane Del Giglio i sur.[393] su se fokusirali na ekspresiju PCNA (engl. *proliferating cell nuclear antigen*) čiji je nivo povezan sa staničnom proliferacijom, kliničkim stadijem i DTL. Interesantno, niska razina PCNA bila je preduvjet odgovora na terapiju fludarabinom. Korelacija s prognozom nađena je i određivanjem S-faze staničnog ciklusa.[394] Studirane su i molekule udružene s regulacijom staničnog ciklusa. Tako povećan nivo $p27^k$ proteina korelira s DTL, preživljenje je kraće nego kod snižene ekspresije.[395]

Broj staničnih, nelimfoidnih komponenti je često reduciran tijekom progresije bolesti. Anemija i trombocitopenija su kriteriji za uznapredovali stadij bolesti. Oba pokazatelja su uključena u većinu prisutnih kliničkih stadija bolesti. Prisustvo anemije predstavlja slabiju prognozu u 11/17 studija (64,7%), dok se trombocitopenija pokazala kao slabija prognostička vrijednost u 6/17 studija (35,7%).[346] Uzeti zajedno, oba pokazatelja su jednostavni i pouzdani, ako su konstantni, mogu biti velika vrijednost za prognostičko stupnjevanje KLL bolesnika.[346]

Broj leukocita ili broj limfocita u perifernoj krvi su indikator cirkulirajuće tumorske mase. Oni su od velike važnosti u ranom stadiju bolesti, budući se Binet stadij A/B ili Rai stadij I/II mogu subklasificirati u dvije diferentne skupine: s dobrom prognozom (apsolutni broj

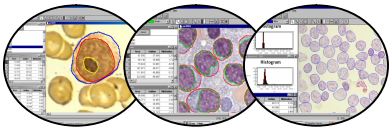
limfocita <40-50x$10^9$/L) i lošijom prognozom (>40-50x$10^9$/L).[396] Apsolutni broj limfocita je slabiji prognostički faktor, samo u 3/13 studija (23,1%) pokazao se kao nezavisan prognostički faktor.[346,397,398,399,400,401,402]

Hematološki pokazatelji lošije prognoze i u našoj studiji su broj eritrocita manji od 2,5x$10^{12}$ /L, količina hemoglobina manja od 100g/L, apsolutni broj leukocita i limfocita >100 x$10^9$/L kao i udio retikulocita veći od 15 $^0/_{00}$ te vrijednost željeza manja od 15 µmol/L.

Limfocitna morfologija u KLL pokazuje značajnu heterogenost. Njezina je uloga u subklasifikaciji KLL u različite morfološke varijante.[4,349,403] Općenito uzevši veličina, povećani broj velikih i „nezrelijih“ limfocita (prolimfocita), prisustvo zarezanih i/ili limfoplazmocitoidnih stanica u perifernoj krvi je udružena s uznapredovalom bolešću i kraćom prognozom.[400,404,405] Vallespi[400] je univarijatnom analizom pronašla korelaciju broja prolimfocita i zarezanih oblika s lošijom prognozom, međutim multivarijatnom analizom samo je povišen broj prolimfocita statistički ostao značajan. Peterson i sur. [406] međutim, nisu našli statistički značajno preživljenje između tri morfološke skupine. Opisuje se, kako atipičnu morfološku sliku prate i različiti imunofenotip kao i agresivnija klinička slika.[407] Nedostaci ovih parametara su što mogu biti relativno nerealni, budući definicija velikih, nezrelih limfocita može jako varirati među morfolozima. Opisani su i slučajevi KLL s binukleiranim limfocitima čija je klinička slika bila različita (kao stabilna tj. indolentna ili progresivna bolest).[408]

Naši rezultati pokazali su prognostičku vrijednost apsolutnog broja limfocita >100x$10^9$/L kao i apsolutnog broja (>5 x$10^9$/L) te relativnog udjela atipičnih limfocita (>10%) u perifernoj krvi.

Apsolutni broj neutrofilnih granulocita ima slabu ulogu u literaturnim podacima dok je na našem materijalu slabije preživljenje rezultiralo uz manje od 10,1% granulocita te manje od 5,1% monocita. Slabije preživljenje našli smo i kad je bilo više od 5,1% Gumprechtovih sjena u razmazu periferne krvi. Ako se prihvati hipoteza kako su Gumprechtove sjene odraz apoptoze, naš rezultat je suprotan budući bi veći broj istih trebao rezultirati boljom prognozom. Ovdje se najvjerojatnije radi o činjenici što se veći broj Gumprechtovih sjena nalazi uz veću limfocitozu, koja sama po sebi znači lošiju prognozu.



Patohistološka slika infiltracije koštane srži malignim limfatičnim stanicama se uzima u različitim klasifikacijama. Općenito se mogu razlikovati četiri tipa infiltracije: nodularni, intesticijski, miješani (nodularno i intersticijski) i difuzni. U odnosu na prognozu ovi tipovi se grupiraju u dvije skupine: difuzni nasuprot nedifuznom[409,410,411] ili nodularni nasuprot nenodularnom (intersticijski).[402] Bolesnici s difuznom infiltracijom imaju medijan preživljenja 4 godine, nasuprot nedifuznom koji je 14 godina.[412] Multivarijatne analize većine studija pokazuju da tipovi infiltracije imaju odraza na prognozu, međutim neke studije nisu mogle potvrditi isto.[398,413,414,415] Montserrat i autori su pokazali kako su tip infiltracije u bioptatu koštane srži te stupanj infiltracije u aspiratima koštane srži komplementarne metode i imaju utjecaja na prognozu.[415]

Ostali pokazatelji koštane srži kao što su celularitet, % limfatičnih,[390,400,415,416,417] eritroidnih[400, 417] te mijeloidnih[400,417] stanica ili pak megakariocita u koštanoj srži u nekim studijama imaju, a u nekim nemaju prognostičko značenje.

Ova studija pokazala je bolje preživljenje kod normo- i hipocelularanog uzorka punktata koštane srži prema hipercelularnom razmazu u aspiratu, ako je postotak limfatičnih stanica manji od 70%, postotak atipičnih limfatičnih stanica manji od 16% odnosno 10% te manji postotak granulocita u mijelogramu od 18%. Difuzni tip infiltracije limfatičnim stanicama prema intersticijskom i nodularnom tipu u bioptatu kosti bolji su prognostički pokazatelji.

Analizirani su brojni serumski pokazatelji u različitim studijama kao: LDH, urična kiselina, alkalna fosfataza, β2 mikroglobulin, timidin kinaza (TK) i IgA. β2 mikroglubulin,[418,419] i timidin kinaza[397,420,421,422] su najutjecajniji pokazatelji, budući je njihova neovisna prognostička vrijednost dokazana u većini studija. Što se tiče LDH, upitno je, budući samo jedna studija od pet pokazuje neovisnu prognostičku vrijednost.[390,423] Za razliku od LDH, TK se pokazala kao preduvjet progresije bolesti unutar godinu dana u bolesnika s Binet stadijem A.[424] Kao serumski pokazatelji bez i s vrlo malom prognostičkom vrijednosti opisuju se: vrijednost albumina, urea u serumu, kalcij, kreatinin, bilirubin, SGOT, totalni imunoglobulini, IgG, IgM, prisustvo monoklonalne gamapatije i pozitivni Coombsov test.[372]

Biokemijski pokazatelji kao objektivni, kvantitativni pokazatelji dobiveni jednostavnom venepunkcijom, nasuprot „istraživač-ovisnim“ pokazateljima (kao što su kvantifikacija

prolimfocita ili histologija koštane srži) može povećati popularnost nekih od njih kao rizičnih faktora u KLL-u.

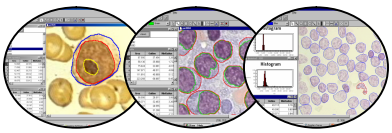
Iako kontroverzni u literaturnim podacima dobar dio biokemijskih pokazatelja pokazali su lošiju prognostičku vrijednost u našem radu: vrijednost LDH veće od 300, SGOT-a veće od 24, CA veće od 2,3, ukupni proteini veći od 66,1 g/L, albumini manji od 40 g/L, $\alpha_2$ globulini manji od 5,9 g/L, β globulini viši od 7,3 g/L, γ globulini viši od 9 g/L, a vrijednosti IgG veće od 10 g/L te IgM veće od 0,91 g/L.

## 5.1. TEORIJA „ZAČARANOG KRUGA“ TE HIPOTEZA «SINGLE» I “MULTIPLIH” PROGRAMIRANIH STOPOVA U NASTANKU TIPIČNIH OBLIKA LEUKEMIJA I LIMFOMA TE SUBAKUTNIH I SUBKRONIČNIH LEUKEMIJA

Povijesno su se leukemijama nazivale bolesti kod kojih se klinička slika prezentirala tipično s abnormalnim i često povećanim brojem bijelih krvnih stanica u perifernoj krvi, nasuprot limfomima kod kojih je predominantna abnormalnost bila povećanje limfatičnih organa.[425] Kod većine bolesnika s leukemijskim oblikom kronične limfoproliferativne bolesti radi se o kroničnoj limfocitnoj leukemiji/limfomu malih stanica, a u većini slučajeva ne KLL/MLL o leukemijskoj slici limfoma (uključujući triholeukemiju) ili prolimfocitnoj leukemiji. Međutim u malog broja bolesnika, ne može se postaviti definitivna dijagnoza (neklasificirana KLLPB).[426]

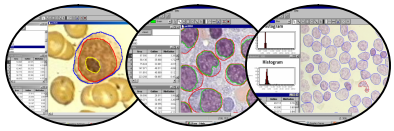
Zašto u jednom slučaju nastaju tipične slike akutnih i kroničnih leukemija te malignih limfoma, a u drugom slučaju različite morfološke i kliničke slike s različitim stupnjevima infiltracije koštane srži, periferne krvi i limfatičnih organa malignim limfatičnim stanicama? Čak i B-KLL, obzirom na mutacijski status (mutirani i nemutirani *IGV* gen) se može podijeliti u dva prognostički različita tipa. ZAP70 [70-kD zeta chain (TCR)-associated protein] je vrlo jaki biljeg *IGV* mutacijskog statusa i snažan prognostički faktor. Prisustvo nemutiranog *IGV* gena udružena je s izražavanjem ZAP-70, koji je snažan prediktor potrebe za terapijom u bolesnika s KLL-om.[63,64,427]

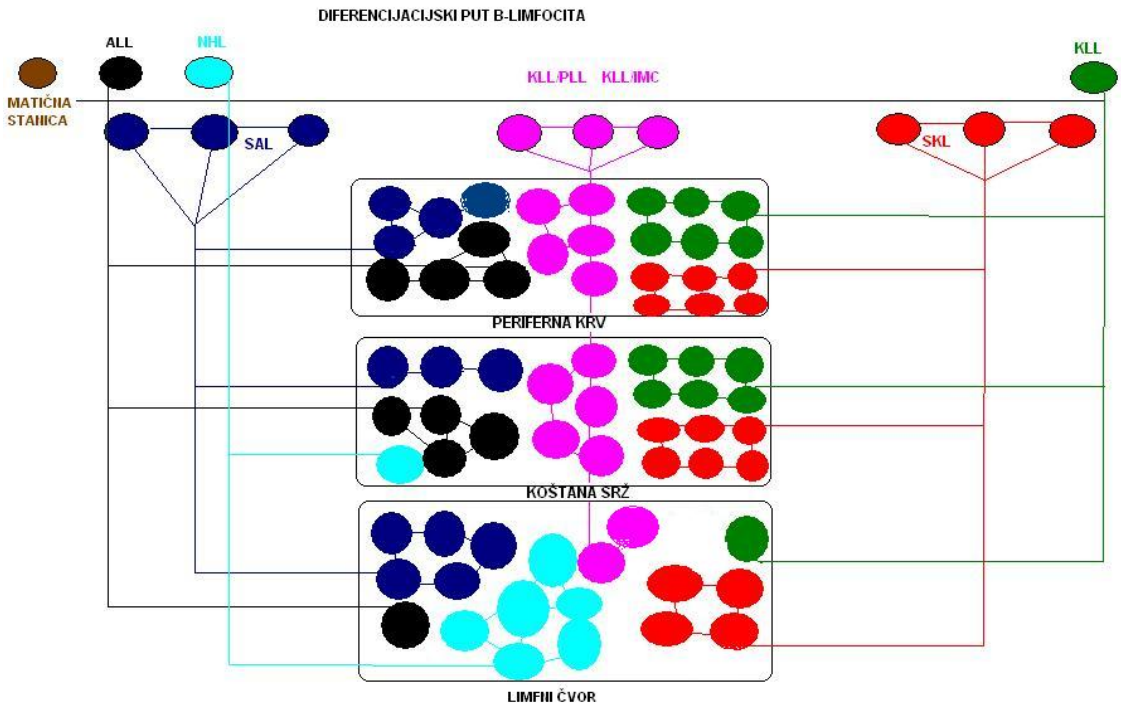
Limfoproliferativne bolesti nastaju zbog poremećaja diferencijacije limfatičnih stanica i posljedične akumulacije dugo živućih, funkcionalno inaktivnih neoplastičnih B-limfocita zaustavljenih u $G_0$ fazi staničnog ciklusa.[341,412] Poremećaj diferencijacije nastaje rano u koštanoj srži, a tako „oštećene“ stanice nastavljaju svoj proliferacijski i diferencijacijski put u primarnim (koštanoj srži) i sekundarnim limfatičnim organima (limfnim čvorovima,



slezeni itd.) oponašajući normalni put reaktivnih stanica do trenutka „programiranog stopa“, kada dolazi do akumulacije limfatičnih stanica zrelijeg ili nezrelijeg morfološkog izgleda. Obzirom na funkcionalnu inaktivnost stanica i kao posljedica imunodeficijencije, nastaje začarani krug: podražaj na koštanu srž da usmjerava matične stanice u imunokompetentne stanice, koje se zbog poremećaja diferencijacije ne mogu diferencirati u funkcionalno aktivne B i/ili T limfocite i zadovoljiti potražnju na periferiji. Akumulacija patoloških stanica u limfnim čvorovima, koštanoj srži i/ili perifernoj krvi dovodi do nastanka limfoproliferativnih bolesti (leukemija i limfoma).

Što dovodi do poremećaja diferencijacije i posljedičnog nakupljanja patoloških stanica? Dokazivanje *BCL2*, *BCL6* i *IGV* gena te njihovih produkta pojasnili su da malignomi koji imaju ili nemaju mutirane gene, spadaju u različite prognostičke grupe. Primjer su i različite skupine DLBCL, klasificirane prema biološkim karakteristikama tumora određenim stupnjem B stanične diferencijacije. Definirane su dvije skupine DLBCL, skupina s prisutnom ekspresijom gena B stanica germinativnog centra (germinal center B-cell-like profile - GCB) i skupina s niskom ekspresijom gena B stanica germinativnog centra i prisutnom ekspresijom gena normalno aktiviranih B stanica (activated B-cell-like profile - ABC). Između ove dvije skupine DLBCL postoji statitstička značja razlika u preživljenju.[428] Slijedi li u budućnosti otkrivanje, za svaki poremećaj diferencijacije i različita mutacija gena (jedna ili više mutacija)? Da li su za različite morfološke i kliničke slike odgovorne samo somatske mutacije gena? Prema trenutačno priznatoj WHO klasifikaciji, neki slučajevi leukemijskih oblika i lokaliziranih bolesti smatraju se kao različiti aspekti jedne te iste bolesti (B-limfoblastična leukemija/B-limfoblastični limfom s jedne strane i B-kronična limfocitna leukemija/B-limfocitni limfom malih stanica s druge strane). Da li između pojedinih odjeljaka tumorske mase igra ulogu i povezanost adhezijskih molekula, kao važnih faktora u raspodjeli tumorske mase.[340] Da li su onda leukemije i limfomi jedna te ista bolest s različitom kliničkom manifestacijom zbog različite distribucije tumorske mase u različitim odjeljcima (limfoidnim organima, koštanoj srži i perifernoj krvi)? Da li je ispravnije razmišljati da su to različite bolesti, nastale zbog poremećaja diferencijacije koja može nastati na bilo kojem stupnju (na jednom ili više mjesta), gdje različito mjesto “stopa” rezultira različitom morfologijom, različitim afinitetom prema akumulaciji u koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnom čvoru (uzimajući u obzir i pitanje mikrookoliša). Ovi slučajevi se ne bi smjeli uključivati u iste terapijske protokole s B-KLL. Buduće genske studije su garancija postavljanja precizne prirode bolesti.[429]






*Legenda: crna boja – „single programirani stop“ na ranijem stadiju razvoja (**tipična akutna limfatična leukemija-ALL**); svijetlo plava boja – „single programirani stop“ također na ranijem stadiju razvoja (**tipični Ne Hodgkinov limfom-NHL**); tamno plava boja – „multipli programirani stopovi“ na ranijem stupnju razvoja (**SAL- subakutna leukemija**); zelena boja – „single programirani stop“ na visokom stupnju diferencijacije (**tipična KLL**); crvena boja – „multipli programirani stopovi“ na višem stupnju diferencijacije (**SKL- subkronična leukemija**); roza boja – „single ili multipli programirani stopovi“ na sredini diferencijacijskog puta ( **KLL/PLL, KLL/IMC)***

Slika 31. Hipoteza «single» i multiplih” stopova u nastanku kroničnih limfoproliferativnih bolesti

Da li se hipotezom „*single*” i “multiplih” stopova može objasniti patogeneza tipičnih leukemija i limfoma te različiti leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti?*(slika 31)*

Pretpostavka, ako “programirani stop” nastane na različitim stupnjevima diferencijacije (ali na jednom mjestu - “*single*”), relativno veće limfatične stanice, krupnijih inhomogenih AgNOR-a, s različitom količinom DNA koja je ili veća ili manja od količine DNA u stanicama u vršku ili veća od 4N (abnormalne mitoze) infiltriraju limfni čvor- **klinička slika malignog limfoma.**

U slučaju kada “stop” nastaje na visokom stupnju diferencijacije također na jednom mjestu dolazi do akumulacije malih indolentnih limfocita (naivnih B-limfocita), sitnih homogenih AgNOR-a od kojih većina stanica sadrži identičnu količinu DNA s najvećim postotkom stanica u vršku – **klinička slika tipične kronične limfocitne leukemije.**

Zaustavljena diferencijacija između ova dva ekstrema (na jednom i/ili više mjesta)

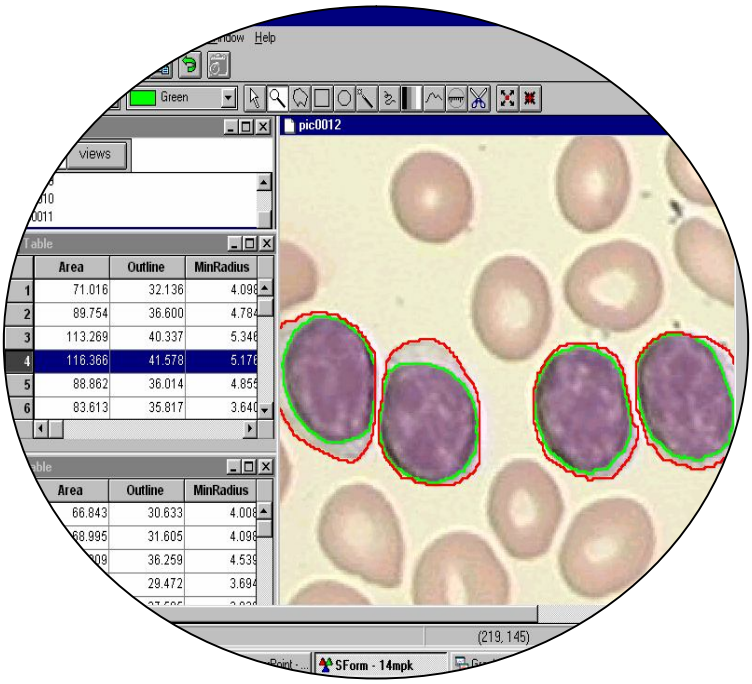
dovodi do nakupljanja srednje velikih limfatičnih stanica srednje velikih prstenastih AgNOR-a koji imaju visoki migracijski potencijal i uzrok su limfocitozi, po proliferativnosti između limfatičnih stanica s homogenih i onih s inhomogenim AgNOR-ima, u obrnutoj korelaciji s brojem Gumprechtovih sjena (apoptotične stanice) - **klinička slika varijante kronične limfocitne leukemije (PLL, KLL/PLL ili KLL/IMC).**

Međutim, kako u onkogenezi limfatičnih stanica "programirani stop" nikad ne nastaje na jednom mjestu već su moguća multipla oštećenja, jasno je kako između ova tri tipična oblika postoje prelazi te u različitim odjeljcima tumorske mase mogu koegzistirati različite morfološke slike, različita proliferativna aktivnost, a samim time i različite kliničke slike.

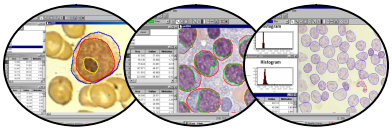
„Multipli stopovi" pomaknuti prema visokom stupnju diferencijacije dovode do akumulacije dobro diferenciranih, indolentnih stanica u koštanoj srži te proliferativnih stanica s predilekcijom za limfni čvor – **klinička slika subkroničnih leukemija (SKL).**

„Multipli stopovi" na ranijem stupnju diferencijacije rezultiraju akumulacijom visokoproliferativnih stanica s predilekcijom za limfni čvor te indolentnijih stanica s migracijskim potencijalom - **klinička slika subakutnih leukemija (SAL).**

Oba podtipa se mogu podijeliti u: ***TIP A*** – leukemijski oblik s >$5x10^9$/L atipičnih limfatičnih stanica u perifernoj krvi uz infiltraciju koštane srži i limfnih čvorova i ***TIP B*** - subleukemični oblik s nalazom čvorova, infiltracijom koštane srži >40% ali manje od $5x10^9$/L malignih stanica u perifernoj krvi.


Help
Green
Views
pic0012
Table
Area
Outline
MinRadius
71.016
32.136
89.754
36.600
113.269
40.337
116.366
41.578
88.862
36.014
83.613
35.817
66.843
30.633
31.605
36.259
29.472
(219, 145)
SForm - 14mpk

# 6. ZAKLJUČCI



## 6.1. OBILJEŽJA ISPITIVANIH BOLESNIKA S LEUKEMIJSKIM OBLICIMA KRONIČNIH LIMFOPROLIFERATIVNIH BOLESTI

- Leukemijski oblici kroničnih limfoproliferativnih bolesti javljaju se u srednjoj i starijoj životnoj dobi.
- Najstariji bolesnici, koji su i najbrojniji, izdvajaju u skupini B-KLL+V, dok su mlađi bolesnici uglavnom s atipičnijim oblicima KLLPB (skupina ne-(B-KLL+V).
- Preko polovica bolesnika pri dijagnozi ima malu ukupnu tumorsku masu (TTM<9), u I ili II kliničkom stadiju po Binet-u , odnosno 0, I ili II kliničkom stadiju po Rai-u.
- Podjednaka je životna dob u oba spola, iako je bolest češće zastupljena u muškaraca.
- Stariji bolesnici sa slikom B-KLL+V imaju niže vrijednosti bilirubina, manje limfne čvorove na vratu te duže vrijeme udvostručenja tumorske mase (DTM).
- Muškarci imaju veće vrijednosti hemoglobina, bilirubina, SGOT-a, kreatinina, UZV veće vrijednosti slezene u mm, palpabilniju jetru ispod rebranog luka, veći postotak limfatičnih stanica u vrhu (PIK-u) DNA histograma koštane srži te izduženije jezgre limfatičnih stanica u limfnom čvoru.
- Kod žena su pravilnije jezgre limfatičnih stanica u limfnom čvoru te veći broj prstenastih AgNOR-a u jezgrama limfatičnih stanica koštane srži.

## 6.2. PROGNOSTIČKI POKAZATELJI

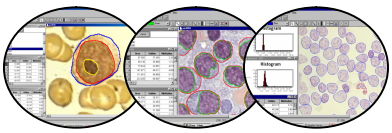
- U ukupnoj populaciji KLLPB klinički pokazatelji boljeg ili lošijeg preživljenja su dob i spol; ranije primijenjena antitumorska terapija zbog KLLPB; dužina perioda bez terapije; klinički stadij bolesti prema Binet-u i Rai-u; podtip KLLPB; veličina slezene; broj regija s povećanim čvorovima kao i veličina čvorova u preponama.
- Anemija, retikulocitoza, leukocitoza, apsolutna limfocitoza te apsolutno povećanje atipičnih limfocita pokazali su se kao hematološki prognostički pokazatelji.
- Vrijednost LDH, SGOT-a, kalcija, ukupnih hipoproteina, albumina, alfa, beta i gama globulina, vrijednosti imunoglobulina IgG i IgM određuju prognozu bolesti.
- Celularitet koštane srži, stupanj ukupne limfocitoze, tip infiltracije limfatičnim stanicama u bioptatu kosti, prisustvo atipičnih oblika te zastupljenost granulocitopoeze u mijelogramu morfološki su pokazatelji u koštanoj srži boljeg

ili lošijeg preživljenja, dok su u razmazu periferne krvi prognostički čimbenici atipične limfatične stanice i Gumprechtove «sjene», te zastupljenost monocita i granulocita u diferencijalnoj krvnoj slici.

- Tumorska masa uzrokovana limfocitozom ili organomegalijom; ukupna tumorska masa; faktori progresije tumorske mase kao što je DTL i DTM prognostički su pokazatelji.

## 6.3. INOVATIVNI PRISTUP ANALIZI DIPLOIDNOG TIPA HISTOGRAMA TE ZNAČENJE NOVOOPISANIH TIPOVA REGIJE NUKLEOLARNE ORGANIZACIJE U BOLESNIKA S KLLPB

- *Novi pokazatelji modificirane analize diploidnog tipa histograma (određivanje postotka stanica u vršku DNA histograma; postotka stanica koje sadrže manju i/ili veću količinu DNA od stanica u vrhu)* uz već standardne karakteristike DNA histograma: postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa te postotak stanica s više od 4N DNA) pokazali su se adekvatni za kinetičku analizu metodom statičke DNA citometrije.
- Isto kao i *novoopisani tipovi AgNOR-a: homogeni, inhomogeni i prstenasti* pokazali su statistički značajnu korelaciju s osobinama DNA histograma i morfometrijskim karakteristikama stanice i jezgre, kao i ulogu u preživljenju, tipu distribucije tumorske mase, biološkom ponašanju tumorske bolesti te morfološkim karakteristikama limfatičnih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi.
- Morfometrijske karakteristike cijele stanice i jezgre određuju podtip KLLPB, a samim time i prognozu. BKLL+V je homogenija što se tiče morfoloških karakteristika, a samim time i manji broj morfometrijskih karakteristika utječe na preživljenje.
- Inhomogeni AgNOR-i brojem i veličinom prognostički su lošiji pokazatelji od prstenastih AgNOR-a. Lošiju ulogu u preživljenju ima i ukupna površina i broj AgNOR-a. Najbolje preživljenje imaju bolesnici čije limfatične stanice imaju sitne, homogene AgNOR-e.
- Pokazatelji bolje prognoze su i viši postotak stanica u vršku DNA histograma (izuzetak umjereno snižen postotak u koštanoj srži, ali ne ispod 28,2%), manji postotak stanica koje sadrže veću količinu DNA od stanica u vršku, manji postotak stanica u S-fazi staničnog ciklusa (iznimka koštana srž) te manji postotak stanica koje sadrže veću količinu DNA od 4N.



## 6.4. MEĐUSOBNA POVEZANOSTI POKAZATELJA DOBIVENIH KOMPJUTERSKOM ANALIZOM SLIKE

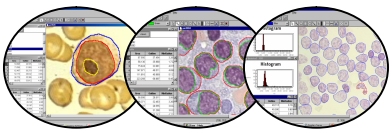
Međusobna usporedba pokazatelja dobivenih kompjuterskom analizom slike pokazala je povezanost morfoloških obilježja, proliferacijskih karakteristika različitih tipova AgNOR-a i novoopisanih obilježja diploidnog tipa histograma te se stanice na osnovu njih mogu podijeliti u:

- nisko proliferativne stanice imaju male homogene AgNOR-e te većinu stanica u vršku DNA histograma
- visoko proliferativne stanice su s inhomogenim AgNOR-ima, od kojih većina sadrži količinu DNA veću od stanica od vršku ili patološke mitoze (DNA>4N) ili ih je veći broj u S-fazi staničnog ciklusa
- srednje proliferativne sa srednje velikim prstenastim AgNOR-ima

## 6.5. RAZLIČITI ODJELJCI TUMORSKE MASE

*Morfometrijska, proliferacijska i kinetička obilježja tumorskih stanica po prvi put su analizirana i uspoređivana u istog bolesnika u različitim odjeljcima tumorske mase: koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnim čvorovima. U ovim odjeljcima neoplastične stanice se nalaze u različitom mikrokolišu. Dobiveni rezultati govore, bez obzira što se najviše pokazatelja vezanih za prognozu nalazi u limfatičnim stanicama periferne krvi, kako sam uzorak iz periferne krvi nije reprezentativan i dostatan za istraživanja. Paralelna analiza u različitim odjeljcima tumorske mase, može jasnije ukazati na procese nastanka, stabilnosti ili progresivnosti bolesti.*

- Analizirajući veličinu stanica i njihovu proliferativnu aktivnost u različitim odjeljcima tumorske mase uočena je pravilnost unutar ukupne populacije KLLPB te podskupina B-KLL+V i tipičnih B-KLL-a. Dok se stanice u koštanoj srži i perifernoj krvi ne razlikuju bitno po veličini i proliferativnoj aktivnosti, obrnuta je situacija ako se gleda periferna krv i limfni čvor. Nasuprot očekivanju, kako su male stanice mirnije, a veće proliferativnije, analiza je pokazala da su u PK stanice najveće i najmirnije, za razliku od limfnog čvora gdje su najmanje i najaktivnije.
- Limfatične stanice koje imaju afinitet prema akumulaciji u koštanoj srži («oštećeni» naivni B-limfociti) u pravilu imaju malu proliferativnu aktivnost.
- Stanice koje su «programirane» i imaju afinitet prema akumulaciji u limfne čvorove migriraju u limfne čvorove gdje se transformiraju do stupnja „programiranog stopa“.



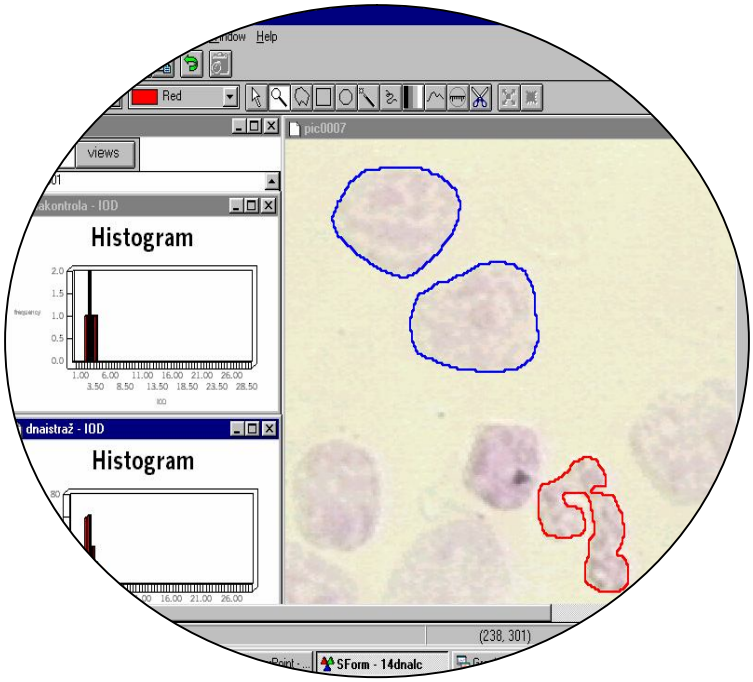
- Sama migracija stanica iz koštane srži prema limfnim čvorovima te između limfnih čvorova se događa u perifernoj krvi (mješavina stanica s nižom i višom proliferativnom aktivnosti). Izgleda kako periferna krv ima samo transportnu ulogu.
- Znatnija proliferativna aktivnost u koštanoj srži prognostički je dobar znak, za razliku od slabije proliferativne aktivnosti u koštanoj srži koja dovodi do akumulacije dugo živućih, funkcionalno inaktivnih neoplastičnih B limfocita zaustavljenih u $G_0$ fazi staničnog ciklusa.
- To dovodi do zaključka, kako je klonalni eksces B-stanica više uzrokovan smanjenjem stanične smrti nego povećanjem stanične proliferacije.

## 6.6. PROLIFERACIJSKO-KINETIČKI INDEKS (PKI)

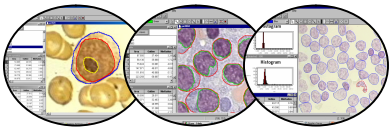
Na osnovu najreprezentativnijih pokazatelja AgNOR-a i DNA (vezanim za preživljenje) u različitim odjeljcima tumorske mase izračunat je «score» za PKI, posebno za cjelokupnu populaciju KLLPB, a posebno za B-KLL+V. Statistički značajno bolju prognozu imali su bolesnici s KLLPB kao i u grupi B-KLL+V kod je PKI bio manji od 4.

*Od svih KLLPB najčešća je B-KLL. U ukupnoj populaciji i posebno predominantnoj subpopulaciji B-KLL+V identificiran je niz kliničkih, hematoloških, biokemijskih, morfoloških te kinetičkih prognostičkih parametara. Kombinacijom inovativnih proliferacijskih i kinetičkih pokazatelja moguće je sačiniti prognostički indeks s izrazito visokom prognostičkom snagom te tako potvrditi postavljenu hipotezu kako se i unutar relativno nisko malignih neoplazmi kao što je KLLPB i njenih podskupina mogu izdvojiti prognostički lošije/bolje podskupine te predvidjeti tijek bolesti.*

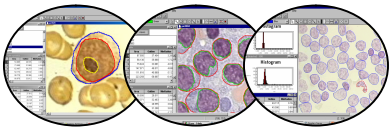
Iz prikazanih rezultata, inovativna analiza diploidnog tipa histograma te novoopisane strukture AgNOR-a, mogu se upotrijebiti i za analizu proliferativnosti drugih niskomalignih, diploidnih tumora (epitelnog, mezenhimnog ili drugog staničnog podrijetla). Isto bi imalo za posljedicu unutar iste morfološke skupine i iste kliničke prezentacije razlikovanje različitih podskupina u smislu kliničkog ponašanja i utjecaja na preživljenje.


Help
Red
views
pic0007
Histogram
Histogram
(238, 301)
SForm - 14dnalc

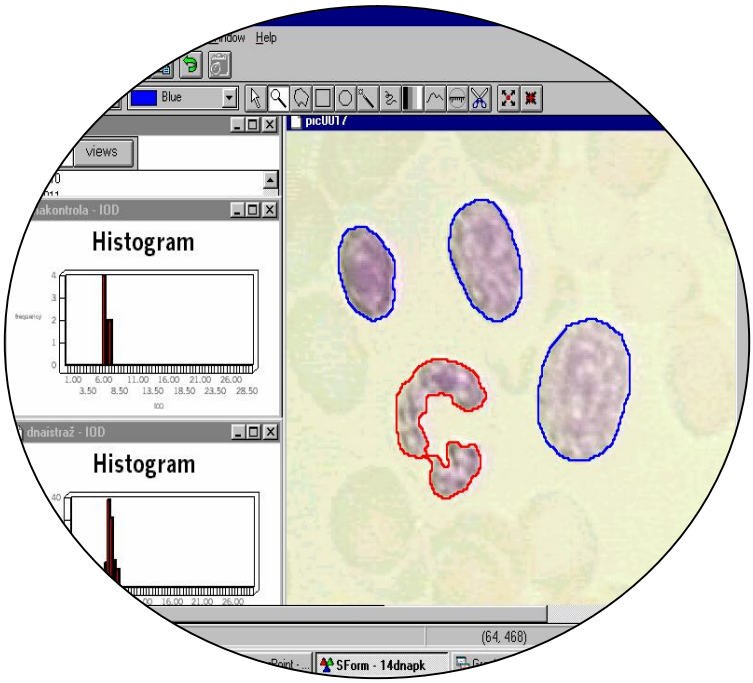
# 7. SAŽETAK



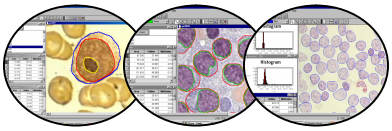
Klinička i morfološka slika leukemijskih oblika kroničnih limfoproliferativnih bolesti (KLLPB) pokazuje značajnu heterogenost. Zbog nepredvidivog tijeka, dosadašnji klinički stadiji i drugi pokazatelji nisu mogli izdvojiti bolesnike visokog rizika za progresiju bolesti. Zbog toga je **cilj** ovog rada bio naći nove morfometrijske, proliferacijske i/ili kinetičke pokazatelje unutar različitih odjeljaka tumorske mase: koštane srži (KS), periferne krvi (PK) i limfnog čvora (LČ) koji će predvidjeti preživljenje i progresiju bolesti sa svrhom definiranja proliferacijsko kinetičkog indeksa (PKI). Uz to, ocijeniti dužinom preživljenja dijagnostičku i prognostičku vrijednost pokazatelja koje karakteriziraju podtip bolesti, kliničke stadije, tumorsku masu, vrijeme udvostručenja tumorske mase i broja limfocita u ukupnoj populaciji KLLPB i njenim podskupinama. Na osnovu proliferacijskih i kinetičkih pokazatelja ocijeniti pokušaj obrazloženja podrijetla i distribucije malignih limfatičnih stanica u različitim kliničkim i morfološkim entitetima. **Ispitanici, materijal i metode.** Istraživanje je obuhvatilo 155 ispitanika dijagnosticiranih kao KLLPB. Ukupno je analizirano 657 razmaza punktata KS (236), LČ (146) i PK (275). Analiza je obuhvatila morfometrijsku analizu, analizu osobina regije nukleolarne organizacije (AgNOR) te statičku DNA citometriju (ICM), ukupno 71895 stanica, na osobnom računalu "SFORM" tvrtke VAMSTEC, Zagreb. Za statističku obradu su korištene univarijatne i bivarijatne analize te Kaplan-Meierova metoda za analizu preživljenja (Statistika 7.1). **Rezultati.** Prognostički su se pokazali brojni klinički, hematološki, biokemijski i imunofenotipski pokazatelji, morfološke karakteristike diferencijalne krvne slike i koštane srži, faktori progresije bolesti te morfometrijski, proliferacijski i kinetički pokazatelji. Postavljena je teorija „začaranog kruga" te hipoteza *«single» i multiplih" «programiranih stopova»* u nastanku tipičnih oblika leukemija i limfoma te subakutnih i subkroničnih leukemija. Poremećaj diferencijacije može nastati na bilo kojem stupnju, a različito mjesto "stopa" rezultira različitom morfologijom, različitim afinitetom prema akumulaciji u koštanoj srži, perifernoj krvi i limfnom čvoru. *Novi pokazatelji modificirane analize diploidnog tipa histograma* pokazali su se adekvatni za kinetičku analizu metodom statičke DNA citometrije. Isto kao i *novoopisani tipovi AgNOR-a: homogeni, inhomogeni i prstenasti* pokazali su statistički značajnu korelaciju s osobinama DNA histograma i morfometrijskim karakteristikama stanice i jezgre, kao i ulogu u preživljenju, tipu distribucije tumorske mase, biološkom ponašanju tumorske bolesti te morfološkim karakteristikama limfatičnih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi. Međusobnom analizom morfometrijskih, proliferacijskih i kinetičkih pokazatelja vidjelo se kako nisko proliferativne stanice imaju male homogene AgNOR-e te većinu stanica u vršku DNA histograma. Visoko proliferativne stanice su s inhomogenim AgNOR-ima, od kojih većina sadrži količinu DNA veću od stanica od u vršku ili patološke mitoze (DNA>4N) ili



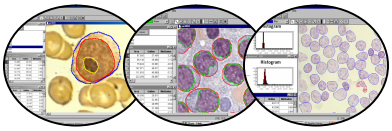
ih je veći broj stanica u S-fazi staničnog ciklusa. Negdje u sredini su srednje proliferativne stanice s prstenastim AgNOR-ima. Analizom u različitim odjeljcima tumorske mase vidljivo je kako limfatične stanice koje imaju afinitet prema akumulaciji u koštanoj srži („oštećeni“ naivni B-limfociti) u pravilu imaju malu proliferativnu aktivnost (najveći postotak stanica u vršku $G_o/G_1$ faze). Stanice koje su „programirane“ i imaju afinitet prema akumulaciji u limfne čvorove, migriraju u limfne čvorove gdje se transformiraju do stupnja „programiranog stopa“ (veći broj ukupnih AgNOR-a, veća površina proliferativnijih, inhomogenih AgNOR-a i najmanji postotak stanica u $G_o/G_1$ fazi). Sama migracija stanica iz koštane srži prema limfnim čvorovima te između limfnih čvorova se događa u perifernoj krvi (mješavina stanica s nižom i višom proliferativnom aktivnosti: viši postotak stanica u S-fazi i istodobno u $G_o/G_1$ fazi staničnog ciklusa kao i prisustvo većih stanica, ali manjih jezgara, s prstenastim AgNOR-ima intermedijalnog stupnja proliferativnosti). Izgleda kako periferna krv ima samo transportnu ulogu. Analizirajući veličinu stanica i njihovu proliferativnu aktivnost u različitim odjeljcima tumorske mase uočena je pravilnost unutar ukupne populacije KLLPB te podskupina B-KLL+V i tipičnih B-KLL-a. Dok se stanice u KS i PK ne razlikuju bitno po veličini i proliferativnoj aktivnosti, obrnuta je situacija ako se gleda periferna krv i limfni čvor. Nasuprot očekivanju, kako su male stanice mirnije, a veće proliferativnije, analiza je pokazala da su u PK stanice najveće i najmirnije, za razliku od limfnog čvora gdje su najmanje i najaktivnije. Na osnovu najreprezentativnijih pokazatelja AgNOR-a i DNA (vezanim za preživljenje) u različitim odjeljcima tumorske mase izračunat je „score“ za *PKI*, posebno za cjelokupnu populaciju KLLPB, a posebno za B-KLL+V. Statistički značajno bolju prognozu imali su bolesnici s KLLPB (p=0,00118) i u grupi B-KLL+V (p=0,03589) kad je PKI bio manji od 4. **Zaključak.** Uzorak samo iz periferne krvi nije reprezentativan i dostatan za istraživanja progresivnosti ili stabilnosti bolesti. Morfometrijska, proliferacijska i kinetička obilježja tumorskih stanica, po prvi put analizirana paralelno u različitim odjeljcima tumorske mase, jasnije obilježavaju procese širenja i progresivnosti bolesti. Morfometrijske karakteristike homogenih, inhomogenih i prstenastih AgNOR-a te karakteristike diploidnog tipa histograma potvrdili su hipotezu kako se i unutar relativno nisko malignih neoplazmi kao što je KLLPB i njene podskupine mogu izdvojiti prognostički lošije/bolje podskupine te predvidjeti tijek bolesti.


Help
Blue
views
pic001 7
kontrola - IOD
Histogram
dnaistraž - IOD
Histogram
(64, 468)
SForm - 14dnapk

# 8. SUMMARY

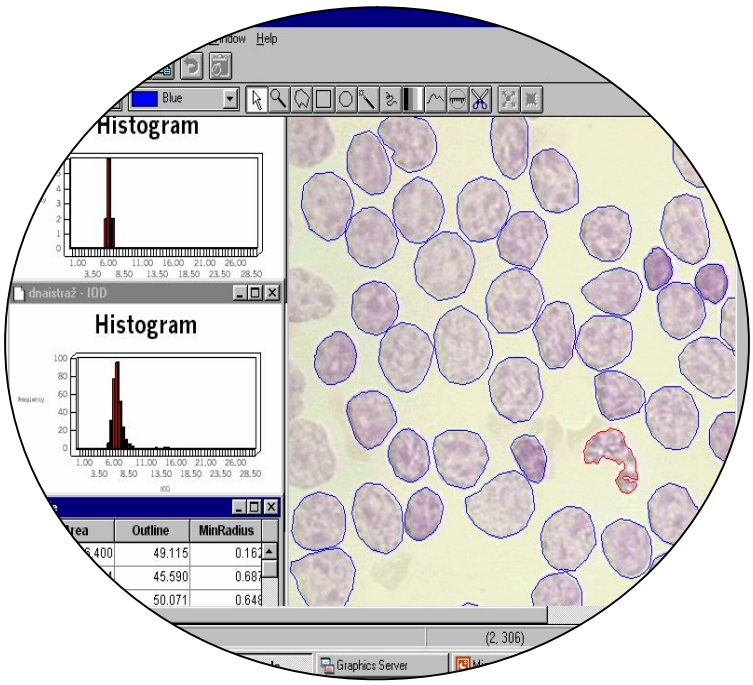


The clinical and morphological picture of the leukemic types of chronic lymphoproliferative disorders (CLLPD) shows considerable heterogeneity. Due to the unpredictable course of the disease, the clinical stages and other parameters used to date have been unable to identify patients at a high risk of disease progression. Therefore, the **aim** of the study was to find new morphometric, proliferative and/or kinetic parameters in different tumor mass compartments, i.e. bone marrow, peripheral blood and lymph node, which would be able to predict survival and disease progression, in order to define the proliferative kinetic index (PKI). In addition, the aim was to evaluate, in terms of survival, the diagnostic and prognostic value of the variables characterizing disease subtypes, clinical stages, tumor mass, time to tumor mass doubling, and lymphocyte count in total CLLPD population and its subgroups. Then, the proliferative and kinetic parameters were used in an attempt to assess the origin and distribution of malignant lymphatic cells in various clinical and morphological entities. **Patients, materials and methods.** The study included 155 patients diagnosed with CLLPD. A total of 657 puncture smears of bone marrow (n=236), lymph nodes (n=146) and peripheral blood (n=275) were analyzed. The analysis consisted of morphometric studies, assessment of the nucleolar organization region (AgNOR) characteristics, and image cytometry (ICM), performed in 71895 cells on a SFORM PC (VAMSTEC, Zagreb). The univariate and bivariate analyses were used on statistical data processing, and Kaplan-Meier method for the analysis of survival (Statistica 7.1). **Results.** Prognostic potential was demonstrated for many clinical, hematological, biochemical, immunophenotypic parameters, morphological characteristics of differential blood count and bone marrow, factors of disease progression, and morphometric, proliferative and kinetic parameters. The "single" and "multiple" programmed stops in the development of typical forms of leukemias and lymphomas, subacute and subchronic leukemias were hypothesized. Differentiation impairment may occur at any stage, and different "stop" locations result in different morphology and affinity to accumulation in bone marrow, peripheral blood and lymph nodes. The new parameters of modified analysis of diploid histogram were found to be appropriate for kinetic analysis by the method of image DNA cytometry. Also, the newly characterized types of AgNOR points, homogeneous, inhomogeneous, and annular, yielded a statistically significant correlation with DNA histogram properties and morphometric characteristics of the cell and nucleus, and were additionally found to play a role in the survival, type of tumor mass distribution, biological behavior of tumor disease, and morphological characteristics of lymphatic cells in bone marrow and peripheral blood. Correlation analysis of the morphometric, proliferative and kinetic characteristics

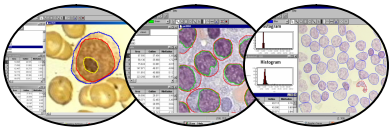


revealed the low proliferative cells to possess small, homogeneous AgNOR, with the majority of cells in the peak of DNA histogram. The high proliferative cells had inhomogeneous AgNOR, mostly containing greater DNA amount than peak cells, or pathologic mitoses (DNA >4N), or the majority of cells being in the S-phase of the cell cycle. Cells with medium proliferative activity and annular AgNOR were in-between. Analysis of different tumor mass compartments showed the lymphatic cells with affinity to accumulation in bone marrow ("damaged" naïve B-lymphocytes) to regularly exhibit low proliferative activity (a lower percentage of cells in SFC and highest percentage of cells in the peak of the $G_0/G_1$ phase). The "programmed" cells with affinity to accumulation in lymph nodes migrated to lymph nodes, where they transformed to the stage of "programmed stop", exhibiting the characteristics of proliferative cells (an increased number of AgNOR, larger more proliferative inhomogeous AgNOR and lowest percentage of cells in the $G_0/G_1$ phase). The migration of cells from bone marrow to lymph nodes and between lymph nodes occurs in peripheral blood (a mixture of cells with low and high proliferative activity: a higher proportion of cells in SFC and at the same time in the $G_0/G_1$ phase of the cell cycle). Analysis of cell size and proliferative activity in different compartments of tumor mass revealed a regular pattern within total CLLPD population, and in the subgroups of B-chronic lymphocytic leukemia with variants (B-CLL+V) and typical B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). Whereas the cells in bone marrow and peripheral blood did not differ substantially according to size and proliferative activity, an inverse pattern was observed between peripheral blood and lymph node. As small cells are inactive and larger cells more proliferative, the analysis quite unexpectedly showed the peripheral blood cells to be largest and most inactive, in contrast to lymph node where the cells were smallest and most active. Based on the most representative AgNOR and DNA characteristics (related to survival) in various tumor mass compartments, the PKI score was calculated for the CLLPD population as a whole and for B-CLL+V in separate. The CLLPD (p=0,00118) and B-CLL+V (p=0,03589) patients had a statistically significantly better prognosis when score of PKI was less than 4. **Conclusion.** Peripheral blood sample is inadequate and not representative for the study of disease progression or stability. The morphometric, proliferative and kinetic properties of tumor cells, now for the first time analyzed simultaneously in different tumor mass compartments, provide better assessment of the disease dissemination and progression. The morphometric characteristics of homogeneous, inhomogeneous and annular AgNOR, and characteristics of diploid histogram have confirmed the hypothesis that prognostically unfavorable/favorable subgroups could be identified and the course of the disease

predicted even within the groups of neoplasms of relatively low malignancy such as CLLPD with subgroups.




# 9. LITERATURA




[1] *Jakšić B, Labar B, Grgičević D. Hematologija i transfuziologija. Medicinska naklada, Zagreb, 1989.*

[2] *Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001.*

[3] *Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood 1994; 84: 1361-92.*

[4] *Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. The French-American-British (FAB) cooperative group. Proposals for the Classification of Chronic (Mature) B and T Lymphoid Leukemias. J Clin Pathol 42: 567-84, 1989.*

[5] *Gale RP, Foon KA. Biology of chronic lymphocytic leukemia. Semin Hemat 1987;24:209-29.*

[6] *Montserrat E. Chronic lymphoproliferative disorders. Curr Opin Oncol 1997;9:34-41.*

[7] *Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. New Engl J Med 1995;16:1052-7.*

[8] *Eek R, Falkson G. The low-grade lymphoproliferative disorders. Oncology 1997;54:441-58.*

[9] *Hernandez JM, Mecucci C, Criel A, Meeus P, Michaux I, Van Hoof A, Verhoef G, Louwagie A, Scheiff J-M, Michaux J-L, Boogaerts M, Van den Berge H. Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. Leukemia 1995;9:2140-6.*

[10] *Jakšić, B. Struktura i funkcija imunopoetskog sustava. U: Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, ur. Interna medicina. Zagreb: Ljevak; 2003.*

[11] *Jurlander J. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. Crit Revn Oncol Hemat 1998;27:29-52.*

[12] *Kipps TJ. The CD 5 cell. Adv Immunol 1989; 47:117-85.*

[13] *Inghirami G, Foiti DR, Sabichi A, Zhu BY, Knowles DM. Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD 5 antigen expression. Blood 1991; 78:1503-15.*

[14] *Du MQ, Diss TC, Xu CF, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Pan LX. Ongoing immunoglobulin gene mutations in mantle cell lymphomas. Br J Haematol 1997; 96:124-31.*

[15] *Sundeen JT, Longo DL, Jaffe ES. CD5 expression in B-cell small lymphocytic malignancies. Am J Surg Pathol 1992;16:130-7.*

[16] *Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. Eur J Immunol 1991; 21:2951-62.*

[17] *MacLennan IC. Germinal center. Annu Rev Immunol 1994; 12:117-39.*

[18] *Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. Blood 1995;86:45-53.*

[19] *Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centers. Nature 1991;354:389-92.*

[20] *Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, Chaganti RS, Klein U, Kuppers R, Rajewsky K, Dalla-Favera R. BCL-6 mutations in normal germinal center B-cell: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:11816-21.*

[21] *Jaffe ES. Classification of natural killer (NK) cell and NK-like T-cell malignancies. Blood 1996;87:1207-10.*

[22] Jaffe ES, Krenacs L, Raffeld M. Classification of T-cell and NK-cell neoplasms based on the REAL classification. Ann Oncol 8 Suppl 1997;2:17-24.

[23] Spits H, Blom B, Jaleco AC, Weijer K, Verschuren MC, van Dongen JJ, Heemskerk MH, Res PC. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. Immunol Rev 1998: 165:75-86.

[24] Jaffe ES, Krenacs L, Kumar S, Kingma DW, Raffeld M. Extronodal peripheral T-cell and NK-cell neoplasms. Am J Clin Pathol 1999; 111:S46-S55.

[25] Picker LJ, Weiss LM, Medeiros LJ, Wood GS, Warnke RA. Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Am J Pathol 1987;128:181-201.

[26] Kluin PM, Gaulard P, Jaffe ES, Meijer CJ, Muller-Hermelink HK, Pileri S. Peripheral T/NK-cell lymphoma: a report of the IXth Workshop of the European Association for Haemapathology Conference report. Histopathology 2001;38:250-70.

[27] Greiner TC, Raffeld M, Lutz C, Dick F, Jaffe S. Analysis of T cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction product. Correlation with tumor-specific sequences. Am J Pathol 1995;146:46-55.

[28] Krafft AE, Taubenberger JK, Sheng ZM, Bijwaard KE, Abbondanzo SL, Aguilera NS, Lichy JH. Enhanced sensitivity with a novel TCR gamma PCR assay for clonality studies in 569 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) cases. Mol Diag 1999;4:119-33.

[29] Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. Blood 1996;12:4990-7.

[30] Anon. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood 1997;89:3909-8.

[31] Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 1997;338:1175-6.

[32] Rozman C, Montserrat E. Chronic Lymphocytic Leukemia. N Eng J Med 1995;19: 1052-7.

[33] Lanza F. Towards Standardization in Immunophenotyping Hematological Malignancies. How can we improve the reproducibility and Comparability of Flow Cytometric Results? Eur J Histochem 1996; 40(suppl1): 7-14.

[34] Matutes E, Owusu-Ankoman K, Morilla R, Marco JG, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The Immunological Profile of B-Cell Disorders and Proposal of a Scoring system for the Diagnosis of CLL. Leukemia 1994; 8:1640-5.

[35] Rothe G, Schmitz G. Consensus Protocol for the Flow Cytometric Immunophenotyping of Hematopoietic Malignancies. Leukemia 1996;10: 877-95.

[36] Freedman AS, Nadler LM. B cell development in chronic lymphocytic leukemia. Seminars in Hematology 1987;24:230-9.

[37] Caligaris-Cappio, Gottardi D, Alfarano A, Stacchini A, Gregoretti MG, Ghia P, Bertero MT, Novarino A, Bergui L. The Nature of the B Lymphocyte in B-Chronic Lymphocytic Leukemia, Blood Cells 1993;19: 601-13.

[38] Matutes E, Owusu-Ankoman K, Morilla R, Marco JG, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The Immunological Profile of B-Cell Disorders and Proposal of a Scoring system for the Diagnosis of CLL. Leukemia 1994;8:1640-5.

[39] Salomon-Nguyen F, Valensi F, Merle-Beral H, Flandrin G. A Scoring System for the Classification of CD5-B CLL versus CD5+ B CLL and B PLL. Leukemia and Lymphoma 1995;16: 445-50.

[40] Schroeder HW. Jr., Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. Immunol Today 1994;15:288-94.

[41] Caligaris-Cappio, Gottardi D, Alfarano A, Stacchini A, Gregoretti MG, Ghia P, Bertero MT, Novarino A, Bergui L. The Nature of the B Lymphocyte in B-Chronic Lymphocytic Leukemia, Blood Cells 1993;19: 601-13.

[42] Gagro A, Dašić G, Sabioncello A, Rabatić S, Reckzeh B, Havemann K, Kardum I, Jakšić B, Vitale B. Phenotypic Analysis of Receptor-Ligand Pairs on B-Cells in B-Chronic Lymphocytic Leukemia. Leukemia and Lymphoma 1997;25:301-11.

[43] Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Ferrarini M, Kipps TJ. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Hematology. California: American Society of Hematology; 2003, str. 153-75.

[44] Inghirami G, Foitl DR, Sabichi A, Zhu BY, Knowles DM. Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD5 antigen expression. Blood. 1991;78(6):1503-15.

[45] Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1975;46:219-34.

[46] Binet JL, Auguer A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 1981;48:198-206.

[47] Binet JL, Catovsky D, Dighiero G, Gale RP, Montserrat E, Rai KR, Rozman C, Sawitsky A. Chronic lymphocytic leukemia: recommendation for diagnosis, staging, and response criteria. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Position paper. American College of Physicians 1989; 236-8.

[48] Jakšić B. Neoplastične bolesti limfocitnog sustava. U: Vrhovac B, Francetić I, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, ur. Interna medicina. Zagreb: Ljevak; 2003.

[49] Jaksic B, Vitale B. Total Tumor Mass Score (TTM): A new parameter in chronic lymphocytic leukemia. Br J Haematol 1981;49:405-13.

[50] French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia: A randomized clinical trial of chlorambucil versus COP in stage B chronic Lymphocytic leukemia. Blood 1990;75:1422-5.

[51] Han T, Ozer H, Gavignan M, et al. Benign monoclonal B-cell lymphocytosis - A benign variant of CLL: Clinical, immunologic phenotypic, and cytogenetic studies in 20 patients. Blood 1984;64:244-52.

[52] Montserrat E, Vinolas N, Reverer JC, et al. Natural history of chronic lymphocytic leukemia. On the progression and prognosis of early stages. Nouv Rev Fr Hematol 30:359-61.

[53] Rubin D, Hudnall SD, Aisenberg A, Jacobson JO, Harris NL. Richter's transformation of chronic lymphocytic leukemia with Hodgkin's-like cells is associated with Epstein –Barr virus infection. Mod Pathol 1994;7:91-8.

[54] Brecher M, Banks PM. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome. Report of eight cases. Am J Clin Pathol 1990;93:333-9.

[55] Amouroux I, Mossafa H, Gentilhomme O, Girot R, Flandrin G, Troussard X. Chronic lymphocytic leukemia with binucleated lymphocytes. Leuk Lymphoma 1997;27:533-7.

[56] Malley DPO, Vance GH, Orazi A. Chronic lymphocytic/small lymphocytic lymphoma with trisomy 12 and focal Cyclin D1 expression: a potential diagnostic pitfall. Arch Pathol Lab Med 2005;129:92-5.

[57] Perry DA, Bast MA, Armitage JO, Weisenburger DD. Diffuse intermediate lymphocytic lymphoma. A clinico-pathologic study and comparison with small lymphocytic lymphoma and diffuse small cleaved cell lymphoma. Cancer 1990;66:1995-2000.

[58] Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 1995;333:1052-7.

[59] Montserrat E, Villamor N, Reverter JC, Brugues RM, Tassies D, Bosch F, Aguilar JL, Vives-Corrons JL, Rozman M, Rozman C. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 258 patients. Br J Haematol 1996;93:111-6.

[60] Rothe G, Schmitz G, et al. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Leukemia 1996;10:877-95.

[61] MacLennan IC, Liu YJ, Oldfield S, Zhang J, Lane PJ. The evolution of B-Cell clones. Curr Top Microbiol Immunol 1990;159:37-63.

[62] Kipps TJ. Immunoglobulin Genes in chronic lymphocytic leukemia. Blood Cells 1993; 615-25.

[63] Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Duvillier H, Massy M, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. Quantification of ZAP70 mRNA in B Cells by Real-Time PCR Is a Powerful Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukemia. Clinical Chemistry 2007;53:1757-1766.

[64] Rassenti ZL, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, Kay NE, Greaves A, Weiss A, Kipps TJ. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. NEJM 2004; 351:893-901.

[65] Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gilliangham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. Br J Haematol 1996;92:382-8.

[66] Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 1999;94:748-53.

[67] Dohner H, Stilgenbauer S, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell Chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. J Mol Med 1999;77:266-81.

[68] Matutes E, Carrara P, Coignet L, Brito-Babapulle V, Villamor N, Wotherspoon A, Catovsky. FISH analysis for BCL-1 rearrangements and trisomy 12 helps the diagnosis of atypical B cell leukaemias. Leukemia 1999;13:1721-6.

[69] Melo JV, Catovsky D, Galton DA. The relationship between Chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization o fan intermediate group. Br J Haematol 1986; 63:377-87.

[70] Brito-Babapulle V, Pittman S, Melo JV, Pomfret M, Catovsky D. Cytogenetic studies on prolymphocytic leukemia. 1. B-cell prolymphocytic leukemia. Hematol Pathol 1987;1:27-33.

[71] Lens D, De Schouwer PJ, Hamoudi RA, Abdul-Rauf M, Farahat N, Matutes E, Crook T, Dyer MJ, Catovsky D. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. Blood 1997;89:2015-23.

[72] Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Moulopoulos LA, Sfikakis P, Dalakas M. Waldentrom's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. J Clin Oncol 2000;18:214-26.

[73] BergerF, Felman P, Thieblemont C, Pradier T, Baseggio L, Bryon PA, Salles G, Callet-Bauchu E, Coiffier B. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. Blood 2000; 95:1950-6.

[74] Mollejo M, Menarguez J, Lloret E, Sanchez A, Campo E, Algara P, Cristobal E, Sanchez E, Piris MA. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinico-pathological study of 13 cases. Am J Surg Pathol 1995;19:1146-57.

[75] Mulligan SP, Matutes E, Dearden C, Catowsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: natural history and response to therapy in 50 cases. Br J Haematol 1991;78:206-9.

[76] Melo JV, Hedge U, Parreira A, Thompson I, Lampert IA, Catovsky D. Splenic B cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: differential diagnosis of B cell leukaemias with large spleens. J Clin Pathol 1987;40:642-51.

[77] *Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankoman K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. Blood 1994;83:1558-62.*

[78] *Savilo E, Campo E, Mollejo M, Pinyol M, Piris MA, Zukerberg LR, Yang WI, Koelliker D.D., Nguyen PL, Harris NL. Absence of cyclin D1 protein expression in splenic marginal zone lymphoma. Mod Pathol 1998;11:601-6.*

[79] *Savilo E, Campo E, Mollejo M, Pinyol M, Piris MA, Zukerberg LR, Yang WI, Koelliker D.D., Nguyen PL, Harris NL. Absence of cyclin D1 protein expression in splenic marginal zone lymphoma. Mod Pathol 1998;11:601-6.*

[80] *Zhu D, Oscier DG, Stevenson FK, Splenic lymphoma with villous lymphocytes involves B cells with extensively mutated Ig heavy chain variable region genes. Blood 1995;85:1603-7.*

[81] *Dunn-Walters DK, Boursier L, Spencer J, Isaacson PG. Analysis of immunoglobulin genes in splenic marginal zone lymphoma suggests ongoing mutation. Hum Pathol 1998;29:585-93.*

[82] *Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukaemic reticuloendotheliosis. Blood 1958;13:609-30.*

[83] *Bouroncle BA. Thirty-five years in the progress of hairy cell leukemia. Leuk Lymphoma 1994;14(Suppl 1):1-12.*

[84] *Tallman MS, Peterson LC, Hakimian D, Gillis S, Polliack A. Treatment of hairy-cell leukemia: current views. Semin Hematol 1999;36:155-63.*

[85] *Dearden CE, Matutes E, Hilditch BL, Swansbury GJ, Catovsky D. Long-term follow-up of patients with hairy cell leukaemia after treatment with pentostatin or cladribine. Br J Haematol 1999;106:515-19.*

[86] *Foucas K. Chronic lymphoid leukemias and lymphoproliferative disorders. Mod Pathol 1999;12:141-50.*

[87] *Kroft SH, Finn WG, Peterson LC. The pathology of the chronic lymphoid leukaemias. Blood Rev 1995;9:234-50.*

[88] *Frassoldati A, Lamparelli T, Federico M, Annino L, Capnist G, Pagnucco G, Dini E, Resegotti L, Damasio EE, Silingardi V. Hairy cell leukemia: a clinical review based on 725 cases of the Italian Cooperative Group (ICGHCL). Italian Cooperative Group for Hairy Cell Leukemia. Leuk Lymphoma 1994;13:307-16.*

[89] *Wagner SD, Martinelli V, Luzzatto L. Similar patterns of V kappa gene usage but different degrees of somatic mutation in hairy cell leukemia, prolymphocytic leukemia, Waldenstrom's macroglobulinemia, and myeloma. Blood 1994;83:3647-53.*

[90] *Sainati L, Matutes E, Mulligan S, de Oliveira MP, Rani S, Lampert IA, Catovsky D. A variant form of hairy cell leukaemia resistant to alfa-interferon: clinical and phenotypic characteristics of 17 patients. Blood 1990;76:157-62.*

[91] *Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, Ellis J, Morilla R, Dearden C, Sempere A, Catovsky D. Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. Blood 1991;78:3269-74.*

[92] *Matutes E, Garcia TJ, O9Brien M, Catovsky D. The morphological spectrum of T-prolymphocytic leukaemia. Br J Haematol 1986;64:111-24.*

[93] *Pawson R, Matutes E, Brito-Babapulle V, Maljaie H, Hedges M, Mercieca J, Dyer M, Catovsky D. Sezary cell leukaemia: a distinct T cell disorders or a variant form of T prolymphocytic leukaemia? Leukemia 1997;11:1009-13.*

[94] *Maljaei SH, Brito-Babapulle V, Hiorns LR, Catovsky D. Abnormalities of chromosomes 8, 11, 14, and X in T-prolymphocytic leukemia studied by fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 1998;103:110-6.*

[95] *Stern MH, Soulier J, Rosenzwajg M, Nakahara K, Canki-Klain N, Aurias A, Sigaux F, Kirsch IR. MTCP-1: a novel gene on the human chromosome Xg28 translocated to the T cell alpha/delta locus in mature T cell proliferations. Oncogene 1993;8:2475-83.*

[96] Virgilio L, Lazzeri C, Bichi R, Nibu K, Narducci MG, Russo G, Rothstein JL, Croce CM. Deregulated expression of TCL1 causes Tcell leukemia in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3885-9.

[97] Pandolfi F, Loughran TP, Jr., Starkebaum G, Chisesi T, Barbui T, Chan WC, Brouet JC, De Rossi G, McKenna RW, Salsano F. Clinical course and prognosis of the lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. A multicenter study. Cancer 1990;65:341-8.

[98] Oshimi K, Yamada O, Kaneko T, Nishinarita S, Lizuka Y, Urabe A, Inamori T, Asano S, Takahashi S, Hattori M. Laboratory findings and clinical courses of 33 patients with granular lymphocyte-proliferative disorders. Leukemia 1993;7:782-8.

[99] Semenzato G, Zambello R, Starkebaum G, Oshimi K, Loughran TP, Jr. The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. Blood 1997;89:256-60.

[100] Chan WC, Link S, Mawle A, Check I, Brynes RK, Winton EF. Heterogenity of large granular lymphocyte proliferation: delineation of two major subtypes. Blood 1986;68:1142-53.

[101] Loughran TP, Jr., Starkebaum G, Aprile JA. Rearrangement and expression of T-cell receptor genes in large granular lymphocyte leukemia. Blood 1988;71:822-4.

[102] Vie H, Chevalier S, Garand R, Moisan JP, Praloran V, Devilder MC, Moreau JF, Soulillou JP. Clonal expansion of lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in a patient with large granular lymphocyte disorder. Blood 1989;74:285-90.

[103] Loughran TP, Jr., Kadin ME, Starkebaum G, Abkowitz JL, Clark EA, Disteche C, Lum LG, Slichter SJ. Leukemia of large granular lymphocytes: association with clonal chromosomal abnormalities and autoimmune neutropenia, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. Ann Intern Med 1985;102:169-75.

[104] Lamy T, Loughran TP, Jn. Current concepts: large granular lymphocyte leukemia. Blood Rev 1999;13:230-40.

[105] Bunn PA, Jr., Schechter GP, Jaffe E, Blayney D, Young RC, Matthews MJ, Blattner W, Broder S, Robert-Guroff M, Gallo RC. Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States. N Engl J Med 1983;309:257-64.

[106] Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia/lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). Br J Haematol 1991;79:428-37.

[107] Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. Blood 1995;86:3619-39.

[108] Jaffe ES, Blattner WA, Blayney DW, Bunn PA, Jr., Cossman J, Robert-Guroff M, Gallo RC. The pathologic spectrum of adult T-cell leukemia/lymphoma in the United States. Human T-cell leukemia/lymphoma virus-associated lymphoid malignancies. Am J Surg Pathol 1984;8:263-75.

[109] Ohshima K, Suzumiya J, Sato K, Kanda M, Sugihara M, Haraoka S, Takeshita M, Kikuchi M. Nodal T-cell lymphoma in an HTLV-1-endemic area: proviral HTLV-1 DNA, histological classification and clinical evaluation. Br J Haematol 1998;101:703-11.

[110] Ohshima K, Suzumiya J, Kato A, Tashiro K, Kikuchi M. Clonal HTLV-1-infected CD4+ T-lymphocytes and non-clonal non-HTLV-1-infected giant cells in incipient ATLL with Hodgkin-like histologic features. Int J Cancer 1997;72:592-8.

[111] Taheshita M, Akamatsu M, Ohshima K, Kobari S, Kikuchi M, Suzumiya J, Uike N, Okamura T. CD30 (Ki-1) expression in adult T-cell leukaemia/lymphoma is associated with distinctive immunohistological and clinical characteristics. Histopathology 1995;26:539-46.

[112] Tsukasaki K, Tsushima H, Yamamura M, Hata T, Murata K, Maeda T, Atogami S, Sohda H, Momita S, Ideda S, Katamine S, Yamada Y, Kamihira S, Tomonaga M. Integration patterns of HTLV-1 provirus in relation to the clinical course of ATL: frequent clonal change at crisis from indolent disease. Blood 1997;89:948-56.

[113] Ohshima K, Mukai Y, Shiraki H, Suzumiya J, Tashiro K, Kikuchi M. Clonal integration and expression of human T-cell lymphotropic virus type 1 in carriers detected by polymerase chain reaction and inverse PCR. Am J Hematol 1997;54:306-12.

[114] Radaszkiewicz T, Dragosic B, Bauer P. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. Gastroenterology 1992;102:1628-38.

[115] Price SK. Immunoproliferative small intestinal disease: a study of 13 cases with alpha heavy-chain disease. Histopathology 1990;17:7-17.

[116] Qin Y, Greiner A, Trunk MJ, Schmausser B, Ott MM, Muller-Hermelink HK. Somatic hypermutation in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type B-cell lymphoma. Blood 1995;86:3528-34.

[117] Du M, Diss TC, Xu C, Peng H, Isaacson PG, Pan L. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. Leukemia 1996;10:1190-7.

[118] Campo E, Miguel R, Krenacs L, Sorbara L, Raffeld M, Jaffe ES. Primary nodal marginal zone lymphomas of splenic and MALT type. Am J Surg Pathol 1999;23:59-68.

[119] Nizze H, Cogliatti SB, von Schilling C, Feller AC, Lennert K. Monocytoid B-cell lymphoma: morphologic variants and relationship to low-grade B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue. Histopathology 1991;18:403-14.

[120] Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, Stefanova M, Hinz K, Van den BH, Hagemeijer A, Hossfeld DK. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. Hematol Oncol 2000;18:1-13.

[121] Glass Ag, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma. Cancer 80:2311-20.

[122] Nathwani BN, Metter GE, Miller TP, Burke JS, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Dixon DO, Winberg CD, Whitcomb CC. What should be the morphologic criteria for the subdivision of follicular lymphomas? Blood 1986:68:837-45.

[123] Zukerberg LR, Medeiros LJ, Ferry JA, Harris NL. Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. Am J Clin Pathol 1993; 100:373-85.

[124] Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM. Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. Mod Pathol 1998; 11:864-9.

[125] Harris NL, Nadler LM, Bhan AK. Immunohistologic characterization of two malignant lymphomas of germinal center type (centroblastic/centrocytic and centrocytic) with monoclonal antibodies. Follicular and diffuse lymphomas of small-cleaved-cell type are related but distinct entities. Am J Pathol 1984;117:262-72.

[126] Ottensmeier CH, Thompsett AR, Zhu D, Wilkins BS, Sweetenham JW, Stevenson FK. Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. Blood 1998;91:4292-9.

[127] Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, Faffeld M. Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. Blood 1998;91:4677-85.

[128] Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. Blood 1997; 89:2067-78.

[129] Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. Am J Surg Pathol 1992;16:637-40.

[130] Zucca E, Stein H, Coiffier B. European Lymphoma Task Force (ELTF): Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). Ann Oncol 1994;5:507-11.

[131] Gagneten D, Hijazi YM, Jaffe ES, Solomon D. Mantle cell lymphoma: a cytopathological and immunocytochemical study. Diag Cytopathol 1996;14:326.

[132] De Boer CJ, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Schuuring E. Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. Oncogene 1995;10:1833-40.

[133] Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisse C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. Am J Pathol 1999;154:1449-52.

[134] Ott G, Kalla J, Hanke A, Muller JG, Rosenwald A, Katzenberger T, Kretschmar R, Kreipe H, Muller-Hermelink HK. The cytomorphological spectrum of mantle cell lymphoma is reflected by distinct biological features. Leuk Lymphoma 1998;32:55-63.

[135] Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. Semin Hematol 1999;36:115-27.

[136] Ott G, Kalla J, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG, Muller-Hermelink HK. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation clusters region and tetraploid chromosome clones. Blood 1997;89:1421-429.

[137] De Boer CJ, Schuring E, Dreef E, Peters G, Bartek J, Kluin PM, Van Krieken JH. Cyclin D1 protein analysis in the diagnosis of mantle cell lymphoma. Blood 1995;86:2715-23.

[138] Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non Hodgkin's Lymphoma Classification Project. J Clin Oncol 1998;16:2780-95.

[139] Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, Thiel E, Wilmanns W, Aydemir U, Bierwolf S, Greisser H, Tiemann M, Lennert K. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. Blood 1997;89:2291-7.

[140] Chittal SM, Brousset P, Voigt JJ, Delsol G. Large B-cell lymphoma rich in T-cells and simulating Hodgkin's disease. Histopathology 1991;19:211-20.

[141] Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, Pileri S, Roncador G, Gatter KC, Delsol G, Mason DY. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. Br J Haematol 2000;109:584-91.

[142] Doggett RS, Wood GS, Horning S, Levy R, Dorfman RF, Bindl J, Warnke RA. The immunologic characterization of 95 nodal and extranodal diffuse large cell lymphomas in 89 patients. Am J Pathol 1984;115:245-52.

[143] Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Braziel RM, Banks PM, Foucar K, Kjeldsberg CR, Levy N, Nathwani BN. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. Blood 1994;83:1460-6.

[144] Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. N Engl J Med 1987;317:1185-9.

[145] Van Diest PJ, Baak JPA. Morphometry. In: Bibbo M. Comprehensive cytopathology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1991, str. 946-64.

[146] Bartels PH, Thompson D, Koss LG. Digital analysis of cells and tissues. U. Koss LG i sur, ur. Cytopathology; 2005, str.1681-708.

[147] Russack V. Image cytometry: current applications and future trends. Crit Rev Clin Lab Scien 1994;31:1-34.

[148] Bartlels PH. Quantification in histopathology. Objectives, origins, digital image analysis, and unresolved issues. U Image Analysis. A Primer for Pathologists, ur. AM Machevsky, i sur. 1994; 2- 28.

[149] Machevsky AM, Erler BS. Morphometry in pathology. U. Machevsky AM, ur. Image Analysis. A Primer for Pathologists. 1994, str.125-80.

[150] *Kisner HJ. Principles and clinical application of image analysis. Clin Lab Med 1988;8:723-36.*

[151] *Dalton LW. Computer-based image analysis of prostate cancer: comments with emphasis on use of commercially available system. Hum Pathol 1992;23:280-6.*

[152] *International Academy of cytology Committee on Quantative Morphology. Data on Automated cytology systems as submitted by their developers. Anal Quant Cytol Histol 1991;13:300-6.*

[153] *Askensten U, Moberger BAG. Methodological aspects of cytochemical DNA assessment of adenocarcinoma of the endometrium by means of image and flow cytometry using conventionally formalin-fixed and paraffin-embedded specimens. Arch Geschwulstforsch 1990;60:209-16.*

[154] *Frost JK. The cell in health and disease. An evaluation of cellular morphologic expression of biologic behavior. Monogr Clin Cytol 1986:2:2-10.*

[155] *Baak JPA. Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis. New York: Springer Verlag; 1991, str. 19-26.*

[156] *Arnerlov C; Emdin SO, Roos G, et al. Static and flow cytometric DNA analysis compared to histologic prognostic factors in a cohort of stage T2 breast cancer. Eur J Surg Oncol 1990;16:200-8.*

[157] *Badalament RA, O'Toole RV, Young DC, Drago JR. DNA ploidy and prostate-specific antigen as a prognostic factors in clinically respectable prostate cancer. Cancer 1991;67:3014-23.*

[158] *Seili-Bekafigo I, Kardum-Skelin I. Kompjuterizirana analiza slike. U. Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj, 50 godina poslije. Prvi internacionalni zannstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić". Zagreb; 2003, str. 261-73.*

[159] *Seili – Bekafigo I. Primjena novih citoloških tehnika u dijagnozi i prognozi akutnih limfatičnih leukemija u odraslih. /magistarski rad/ Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2000.*

[160] *Baak JPA. The Principies and Advances of Quantitative Pathology. Anal Quant Cytol Histol 1985;9: 89-95.*

[161] *Oberholzer M, Christen H, Ettlin R, Buser M, Oestereicher M, Gschwind R. Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on a simple, multipurpose analysis system. Analyt Quant Cytol Histol 1991;13: 316-20.*

[162] *Baak JPA, Wisse-Brekelmans ECM, Langley FA, Talerman A, Delemarre JFM. Morphometric data to FIGO stage and histological type and grade for prognosis of ovarian tumours. J Clin Pathol 1986; 39: 1340-6.*

[163] *Schmidt JA, Black J. Determination of three-dimensional morphometry of adherent cells by surface profilometry. Biomaterials 1992;13:483-7.*

[164] *Van Diest PJ, Baak JPA. Morphometry. In: Bibbo M. Comprehensive cytopathology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1991, str. 946-64.*

[165] *Crocker J, Jones EL, Curran RC. A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. J Clin Pathol 1983; 36(3): 298-302.*

[166] *Crocker J, Jones EL, Curran RC. The form factor of alpha-naphthyl acetate esterase-positive cells in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. J Clin Pathol 1983; 36(3): 303-6.*

[167] *Tosi P, Miracco C, Luzi P, Cintorino M, Kraft R, Cottier H. Morphometric distinction of granulomas in tuberculosis and sarcoidosis. Difference in nuclear profiles. Analyt Quant Cytol Histol 1986; 8(3): 233-40.*

[168] *Collan Y, Torkkeli T, Pesonen E, Jantunen E, Kosma VM. Application of morphometry in tumor pathology. Analyt Quant Cytol Histol 1987; 9:79-88.*

[169] *Antonangelo L, Saldiva PHN, Amaro E, Capelozzi VL. Utility of computerized morphometry combined with AgNOR staining in distinguishing benign from malignant pleural effusions. Analyt Quant Cytol Histol 1994; 16(4): 247-52.*

[170] Collan Y, Torkkeli T, Pesonen E, Jantunen E, Kosma VM. Application of morphometry in tumor pathology. Analyt Quant Cytol Histol 1987; 9:79-88.

[171] Oberholzer M, Christen H, Ettlin R, Buser M, Oestereicher M, Gschwind R. some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on a simple, multipurpose analysis system. Analyt Quant Cytol Histol 1991;13(5): 316-20.

[172] Egan MJ. Crocker J. Nucleolar organizer regions in pathology. Br J Cancer 1992;65:1-7.

[173] Criscuolo M, Martinelli AM, Migaldi M, Zunarelli E, Bergamaschi M, Falchi AM, De Gaetani E. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in ovarian epithelial tumors. Int J Gynecol Pathol 1993;12:259-63.

[174] Mauri FA, Scampini S, Aldovini D. AgNOR distribution in serous tumours of the ovary. Pathologica 1990;82:487-92.

[175] Mahovlić V, Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A, Bilušić M, Veldić M, Babić D, Božikov J, Danilović Ž. Digital image analysis of silver-stained nucleolar organizer region-associated proteins in endometrial cytologic samples. Anal Quant Cytol Histol 1998;21:47-53.

[176] Brustmann H, Riss P, Naude S. Necleolar organizer regions as markers of endometrial proliferation: a study of normal, hyperplastic, and neoplastic tissue. Hum Pathol 1995;26(6):664-7.

[177] Allen JP, Gallimore AP. Necleolar organizer regions in benign and malignant glandular lesions of the cervix. J Pathol 1992;166:153-6.

[178] Rüschoff J, Bittinger A, Neumann K, Schmitz-Moormann P. Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of sigmoid colon and rectum. Path Res Pract 1990;186:85-91.

[179] Chern JH, Lee YC, Yang MH, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. Chest 1997;111:1591-5.

[180] Lesty C, Chleq C, Contesso G, Jacquillat C. Nucleoli and AgNOR proteins in 32 cases of primary breast carcinoma. spatial pattern of interactions between 50 clinical and histometric criteria. Analyt Quant Cytol Histol 1992; 14(3): 175-86.

[181] Munakata S, Hendricks JB. Morphometric Analysis of AgNORs in Imprints and Sections from Non-Hodgkin's Lymphoma. An Approach to Standardization. Anal Quant Cytol Histol 1993;15: 329-34.

[182] Trere D, Farabegoli F, Cancellieri A, Ceccarelli C, Eusebi V, Derenzini M. AgNOR Area in Interphase Nuclei of Human Tumours Correlates with the Proliferative Activity Evaluated by Bromodeoxyuridine Labelling and Ki-67 Immunostaining. J Pathol 1991;165: 53-9.

[183] Hall PA, Crocker J, Watts A, Stansfeld AG. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. Histopathology 1988; 12: 373-81.

[184] Rüschoff J, Neumann K, Contractor H, Plate K, Thomas C. Assessment of nucleolar organizer regions by automatic image analysis in breast cancer: correlation with DNA content, proliferation rate, receptor status and histopathological grading. J Cancer Res Clin Oncol 1990;116:480-5.

[185] Mennel HD, Rickert D. AgNOR content and PCNA expression in transplanted malignant neurinoma in rats. Path Res Pract 1994;190:423-8.

[186] Ghazizadeh M, Sasaki Y, Araki T, Konishi H, Aihara K. Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and AgNOR analyses. Anatomic Pathol 1996;107:451-8.

[187] Nagao T, Ishida Y, Yamazaki K, Kondo Y. Nucleolar organizer regions in hepatocellular carcinoma related to the cell cycle, cell proliferation and histologic grade. Path Res Pract 1995; 191: 967-72.

[188] Leek RD, Alison R, Sarraf CE. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. J Pathol 1991; 165:45-51.

[189] Derenzini M, Pession A, Trere D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. Lab Invest 1990; 63:137-40.

[190] *Marković-Glamočak M, Boban D, Sučić M, Oberman B, Šćukanec-Špoljar M. Significance of proliferative epithelial changes in breast fine-needle aspiration. Cancer 1992 ;15;70(4):781-3.*

[191] *Olert J, Sawatzki G, Kling H, Gebauer J. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolus organizer regions (NORs). Histochemistry 1979;60:91-9.*

[192] *Barsotti P, Ascoli V, Nardi F, Marinozzi V. Silver staining of interphase nucleolar organizer regions in cytologic smears previously stained by the Papanicolaou and May-Grünwald-Giemsa techniques. Diagn Cytopathol 1990; 6:289-96.*

[193] *Cardillo MR. AgNOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. Acta Cytol 1992; 36: 147-51.*

[194] *Fouchier J, Rigaut JP, Pechinot D. A combined AgNOR-Feulgen staining technique. J Histocem Cytochem 1990;38:1591-7.*

[195] *Crocker J, Boldy DAR, Egan MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. J Pathol 1989; 158: 185-8.*

[196] *Nikicicz EP, Norback DH. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. J Clin Pathol 1990; 43:723-7.*

[197] *Nikicicz EP, Norback DH. Spectrum of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in chronic and transformed B-cell leukemias. Arch Pathol Lab Med 1992;116:265-8.*

[198] *Evans AT, Orrell JM, Grant A. Re-evaluating silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions: a study with quantitation and pattern analysis. J Pathol 1991; 165: 61-7.*

[199] *Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Hufnagl P, Martin H, Oefner D, et al. Guidelines of AgNOR quantitation. Zentralbl Pathol 1994; 140: 107-8.*

[200] *Rüschoff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. J Pathol 1990;161:113-8.*

[201] *Hufnagl P, Guski H, Schulz HJ. Measuring of AgNORs using image analysis. Zentralbl Pathol 1994; 140: 31-35.*

[202] *Smith PJ, Skilbeck N, Harrison A, Crocker J. The effect of series of fixatives on the AgNOR technique. J Pathol 1988;155:109-12.*

[203] *Derenzini M, Romagnoli T, Ceccarelli, Eusebi V. Fixatives and silver stainability of NOR proteins at the light microscopic level. J Histochem Cytochem 1988;36:1453-1454.*

[204] *Derenzini M, Trere D. Standardization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. J Pathol 1991; 165: 337-42.*

[205] *Ploton D, Visseaux-Coletto B, Canellas JC, Bourzat C, Adnet JJ, Lechki C, Bonnet N. Semiautomatic quantification of silver-stained nucleolar organizer regions in tissue sections and cellular smears. Analyt Quant Cytol Histol 1992; 14(1): 14-23.*

[206] *Rüschoff J, Fauser G, Knuechel R, Hofstaedter F. AgNOR quantification with special reference to staining patterns. Zentralbl Pathol 1994; 140: 23-30.*

[207] *Hufnagl P, Guski H, Schulz HJ. Measuring of AgNORs using image analysis. Zentralbl Pathol 1994; 140: 31-35.*

[208] *Boldy DAR, Crocker J, Ayres JG. Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue. J Pathol 1989;157: 75-9.*

[209] *Xu LZ, Wang LF. Nucleolar organizer regions in aspirates of malignant lymphomas and benign disorders of the lymph nodes. Analyt Quant Cytol Histol 1992;14(2):148-52.*

[210] *Weeks SC, Beroukas D, Jarvis LR, Whitehead R. Video image analysis of AgNOR distribution in the normal and adenomatous colorectum. J Pathol 1992; 166(2): 139-45.*

[211] *Munakata S, Hendricks JB. Morphometric analysis of AgNORs in imprints and sections from non-Hodgkin's lymphomas. An approach to standardization. Analyt Quant Cytol Histol 1993;15(5): 329-34.*

[212] *Rüschoff J, Plate KH, Contractor H et al: Evaluation of nucleolar organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. J Pathol 1990; 161: 113-8.*

[213] *Canet V, Montmasson MP, Usson Y, Giroud F, Brugal G. Correlation between silver-stained nucleolar organizer region area and cell cycle time. Cytometry 2001;43:110-6.*

[214] *Muhonen T, Pyrhoenen S, Laasonen A, Wasenius VM, Asko SS. Tumour growth rate and DNA flow cytometry parameters as prognostic factors in metastatic melanoma. Br J Cancer 1992;66:528-532.*

[215] *Peters GJM, Miles BJ, Cerny JC, Gaba AR, Jacobsen G, Crissman JD. Prognostic significance of DNA quantification in stage D1 prostate carcinoma with the use of image analysis. Cancer 1992;70:1159-65.*

[216] *Lee S, Tolmachoff T, Marchevsky M. DNA content analysis («ploidy») by image analysis. Clinical Applications and comparison with flow cytometry. U. Machevsky AM, ur. Image Analysis. A Primer for Pathologists. 1994, str. 261- 307.*

[217] *Aziz DC, Peter JB. DNA ploidy and cell-cycle analysis: tools for assessment of cancer prognosis. J Clin Lab Anal 1991;5:422-38.*

[218] *Borgman V, al-Abadi H, Nagel R. Prognostic relevance of DNA ploidy and proliferative activity in urothelial carcinoma of the renal pelvis and ureter: a study on a follow-up period of 6 years. Urol Int 1991;47:7-11.*

[219] *Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. Cytometry 1993;14:472-7.*

[220] *Yu DS, Wang J, Chang SY, Ma CP. Flow cytometryc analysis of DNA ploidy, cell cycle and cytomorphometry in sarcomatoid renal cell carcinoma. Eur Urol 1991;20:227-31.*

[221] *Vučković J. Citofotometrijska analiza DNA u citološkim preparatima non-Hodgkin limfoma /doktorska disertacija/. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet Split; 1988.*

[222] *Atkin NB. The clinical usefulness of determining ploidy patterns in human tumors as measured by slide-based Feulgen microspectrophotometry. Anal Quant Cytol Histol 1991;2:463-7.*

[223] *Abramowsky CR, Taylor SR, Anton AH, Berk AI, Roeder M, Murphy RF. Flow cytometry DNA ploidy analysis and catecholamine secretion profiles in neuroblastoma. Cancer 198);63:1752-6.*

[224] *Hansson J, Tribukait B, Lewensohn R, Ringborg U. Flow cytofluorometric DNA analyses of metastases of human malignant melanomas. Anal Quant Cytol 1981;4:99-104.*

[225] *Berchuck A, Boente MP, Kerns BJ, et al. Ploidy analysis of epithelial ovarian cancers using image cytometry. Gynecol Oncol 1992;44:61-5.*

[226] *Falkmer UG. Methodologic sources of errors in image and flow cytometric DNA assessments of the malignancy potential of prostatic carcinoma. Hum Pathol 1992; 23:360-7.*

[227] *Mahovlić V,Kardum-Skelin I, Ilić-Forko J, Mirt M, Škrablin-Kučić S. Statična i protočna DNA citometrija kod adenokarcinoma endometrija. U: Audy-Jurković S, ur. Ginekološka citologija u Hrvatskoj, 50 godina poslije. Prvi internacionalni zanstveni simpozij kliničke citologije „Jasna Ivić". Zagreb: 2003, str. 213-9.*

[228] *Wojcik EM, Katz RL, Johnston DA, Sembera D, El-Naggar A. Comparative Analysis of DNA Ploidy and Proliferative Index in Fine Needle Aspirates of Non-Hodgkin's Lymphomas by Image Analysis and Flow Cytometry. Anal Quant Cytol Histol 1993;15: 151-7.*

[229] *Bauer TV, Tubbs R, Edinger MG, Suit PF, Gephardt GN, Levin HS. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. Am J Clin Pathol 1990; 93:322-26.*

[230] Cornelisse CJ, de Koning HR, Moolenaar AJ, van de Velde CJ, Ploem JS. Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer. Relation to estrogen receptor content and lymph node involvement. Analyt Quant Cytol Histol 1984; 6(1): 9-18.

[231] Fausel RE, Burleigh W, Kaminsky DB. DNA quantification in colorectal carcinoma using flow and image analysis cytometry. Analyt Quant Cytol Histol 1990; 12(1): 21-7.

[232] Fischler DF, Wongbunnate S, Johnston DA, Katz RL. DNA content by image analysis- an accurate discriminator of malignancy in pericardial effusions. Analyt Quant Cytol Histol 1994; 16(3): 167-73.

[233] Clemo FAS, Crabtree WN, Walker E, DeNicola DB. Comparison of image analysis and flow cytometric measurements of DNA content of canine transitional cell carcinomas. Analyt Quant Cytol Histol 1993; 15(6): 418-26.

[234] McFadden PW, Clowry LJ, Daehnert K, Hause LL, Koethe SM: Image analysis confirmation of DNA aneuploidy in flow cytometric DNA distributions having a wide coefficient of variation of the G0/G1 peak. Am J Clin Pathol 1990; 93: 637-42.

[235] Peet FG, Sahota TS. A computer-assisted cell identification system. Analyt Quant Cytol Histol 1984; 6(1): 59-70.

[236] Uyterlinde A, Smeulders AWM, Baak JPA. Reproducibility and comparison of quantitative DNA histogram features obtained with a scanning microdensitometer and a flow cytometer in breast cancers. Analyt Quant Cytol Histol 1989; 11(5): 353-60.

[237] Berryman I, Sterrett GF, Papadimitriou JM. Feulgen DNA cytophotometry in histologic sections of mammary neoplasms. Analyt Quant Cytol Histol 1984; 6(1): 19-23.

[238] Atkin NB. Cytophotometric DNA determination correlated to karyotype, particularly in cancer. Analyt Quant Cytol Histol 1987; 9(2): 96-104.

[239] Bibbo M, Bartels PH, Dytch HE, Wied GL. Ploidy measurements by high-resolution cytometry. Analyt Quant Cytol Histol 1985; 7(2): 81-8.

[240] Reith A, Danielsen H. Assessment of DNA ploidy in tumor material: preparation and measurement by image cytometry. U: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenck U, ur. Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. Chicago: Tutorial of Cytology; 1994, str. 185-93.

[241] Gardikas C, Israels M. The Feulgen reaction applied to clinical haematology. J Clin Pathol 1948; 1: 226.

[242] Bőcking A, Striepecke E, Auer H, Fuzesi L. Static DNA cytometry: biological background, technique and diagnostic interpretation. U: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenck U, ur. Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. Chicago: Tutorial of Cytology; 1994, str. 107-28.

[243] Forsslund G, Zetterberg A. A quantitative evaluation of cytophotometric DNA analysis in retrospective studies using archival tumor specimens. Analyt Quant Cytol Histol 1990; 12(4): 259-66.

[244] Aubele M, Burger G, Rodenacker K. Problems concerning the quality of DNA measurements on Feulgen-stained imprints. A study of five fixation techniques. Analyt Quant Cytol Histol 1994; 16: 226-32.

[245] Berryman I, Sterrett GF, Papadimitriou JM. Feulgen DNA cytophotometry in histologic sections of mammary neoplasms. Analyt Quant Cytol Histol 1984; 6(1): 19-23.

[246] Böcking A, Chatelain R, Homge M, Daniel R, Gillissen A, Wohltmann D. Representativity and reproducibility of DNA malignancy grading in different carcinomas. Analyt Quant Cytol Histol 1989; 11(2): 81-6.

[247] Greenebaum E, Yee HT, Liu J. DNA ploidy of ovarian and adnexal cyst fluid. A useful adjunct to cytology. Acta Cytol 1994; 38: 201-208.

[248] Visscher DV, Shaheen C, Drozdowicz S, Crissman JD. Image cytophotometric DNA histogram heterogeneity in adenocarcinoma of the breast. Analyt Quant Cytol Histol 1993; 15(3): 206-12.

[249] Pak HY, Ashdjian V, Yokota SB, Teplitz RL. Quantitative DNA determinations by image analysis. I. Application to human pulmonary cytology. Analyt Quant Cytol Histol 1982; 4(2): 95-8.

[250] *Babiarz J, Peters JM, Miles B, Crissman JD. Comparison of DNA content in primary and lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. Analyt Quant Cytol Histol 1993;15(3): 158-64.*

[251] *Bõcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of DNA image cytometry. Anal Cell Pathol 1995; 8: 67-74.*

[252] *Haroske G, Giroud F, Reith A, Bocking A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol 1998;17(4):189-200.*

[253] *Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Boecking A. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Anal Cell Pathol 2001;23:89-95.*

[254] *Hiddeman W, Schumman J, Andreff M, Barlogie B, et al. Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry 1984;5:445-6.*

[255] *Eskelinen M, Lipponen P, Majapuro R, Syrjaenen K, Nordling S. DNA ploidy, S phase fraction and $G_2$ fraction as prognostic determinants in prostatic adenocarcinoma. Eur Urol 1991;20(1):62-6.*

[256] *Auer GU, Askensten U, Erhardt K, Fallenius A, Zetterberg A. Comparison between slide and flow cytophotometric DNA measurements in breast tumors. Analyt Quant Cytol Histol 1987; 9(2): 138-46.*

[257] *Smets LA, Slater R, van Wering ER, van der Does- van den Berg A, Hart AA, Veerman AJ, Kamps WA. DNA index and %S-phase cells determined in acute lymphoblastic leukemia of children: a report from studies ALL V, ALL VI, and ALL VII (1979-1991) of the Dutch childhood leukemia study group and the Netherlands workgroup on cancer genetics and cytogenetics. Med Pediatr Oncol 1995; 25(6): 437-44.*

[258] *Fausel RE, Burleigh W, Kaminsky DB. DNA quantification in colorectal carcinoma using flow and image analysis cytometry. Analyt Quant Cytol Histol 1990; 12(1): 21-27.*

[259] *Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. Cytometry 1993;14:472-7.*

[260] *Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. Analyt Quant Cytol Histol 1980;2(3):161-5.*

[261] *vanVelthoven R, Petein M, Oosterlinck WJ, Zandona C, Zlotta A, Van der Meijden APM, et al. Image cytometry determination of ploidy level, proliferative activity and nuclear size in a series of 314 transitional bladder cell carcinomas. Hum Pathol 1995; 26(1): 3-11.*

[262] *Cornelisse CJ, de Koning HR, Moolenaar AJ, van de Velde CJ, Ploem JS. Image and flow cytometric analysis of DNA content in breast cancer. Relation to estrogen receptor content and lymph node involvement. Analyt Quant Cytol Histol 1984; 6: 9-18.*

[263] *Haroske G, Giroud F, Reith A, Bocking A. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. European Society for Analytical Cellular Pathology. Anal Cell Pathol 1998;17:189-200.*

[264] *Sarker SK, Mendiola R, Spigelman A, Walker M, Coleman D. DNA ploidy on cytologic and tissue sections of breast lumps. Anal Quant Cytol Hist 1995;18:19-22.*

[265] *Hanselaar AGJ, Bõcking A, Gundlach H, Palcic B, Markovic N, Patterson B, Ueda M. Summary statement on quantitative cytochemistry (DNA and molecular biology). Acta Cytol 2001;45:499-501.*

[266] *Lorand-Metze I, Metze K. AgNOR clusters as a parameter of cell kinetics in chronic lymphocytic leukeamia. J Clin Pathol: Mol Pathol 1996;49 (6)357-60.*

[267] *Ivanković D, i sur. Osnove statističke analize za medicinare. Zagreb: Biblioteka udžbenici i priručnici Medicinskog fakulteta u Zagrebu, 1988.*

[268] *Statistika 7.1 –Electronic Textbook StatSoft [serial online] 2006 [cited November 28 [9 screens] Avaliable from: URL:http://statsoftinc.com/*

[269] Adachi M, Cossman J, Longo D, et al. Variant translocation of the bcl-2 gene to immunoglobulin lambda light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. Proc Nalt Acad USA 1989;86:2771-4.

[270] Anastasi J, Lee BM, Vardiman JW, Fernald AA, Larson RA, Rowley JD. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. Blood 1992;79:1786-801.

[271] Hallek M, Kuhn-Hallek J, Emmerich B. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. U: Hallek M, ur. Individual Risk Assessment for Patients with Haematological Malignancies. New York: Georg Thime Verlag; 1999, str. 15-27.

[272] Alanen KA, Joensuu H, Klemi PJ. DNA content analysis of fine needle aspirates obtained from lymphatic tissue. Anal Quant Cytol Histol 1993;15: 259-64.

[273] Boldy DAR, Crocker J, Ayres JG. Application of the agnor method to cell imprints of lymphoid tissue. J Pathol 1989;157: 75-9.

[274] Crocker J. Morphometric and related quantitative techniques in the study of lymphoid neoplasms. A Review. J Pathol 1984;143: 69-80.

[275] Crocker J, Macartney JC, SmithPJ. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. J Pathol 1988;154: 151-6.

[276] Chrocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. J Path 1987;151: 111-8.

[277] Mamaev NN, Salogub GN, Nefedova IB. Interphase ribosomal RNA ciston silver staining in refractory anaemias with and without excess blasts. J Clin Pathol: Mol Pathol 1997;50:92-95.

[278] Lorand-Metze I, Carvalho MA, Metze K. Relationship between morphometric analysis of nucleolar organizer regions and cell proliferation in acute leukemias. Cytometry 1998;32:51-6.

[279] Hofgartner FJ, Krone W, Jain K. Correlated inhibition of ribosomal RNA synthesis and silver staining by actinomycin D. Hum Genet 1979;47:329-33.

[280] Morton CC, Brown JA, Holmes WM, Nance WE, Wolf B. Stain intensity of human nucleolus organizer region reflects incorporation of uridine into mature ribosomal RNA. Exp Cell Res 1983;145:405-13.

[281] Field DH, Fitzerald PH, Sin FYT. Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes. Citobios 1984;41:23-33.

[282] Raymond WA, Leong AS. Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. Huma Pathol 1989;20:741-6.

[283] Metze K, Lorand-Metze IGH. Interpretation of the agnor pattern in hematologic cytology. Acta Haematol 1993;89:110-11.

[284] Grotto HZW, Lorand-Metze I, Metze K. Nucleolus organizer regions in normal hematopoiesis: relationship to cellular proliferation and maturation. Nouv Rev Fr Hematol 1991;33:1-4.

[285] Nikicicz EP, Norback DH. Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. J Clin Pathol 1990; 43:723-7.

[286] Gan X. Quantitative Study of AgNOR in differential diagnosis between non-Hodgkin's lymphoma and reactive hyperplasia. Chin Med J 1995;108:132-7.

[287] Jakić-Razumović J, Užarević B, Petrovečki M, Marušić M, Radman I, Labar B. AgNORs predictive value of prognosis in non-Hodgkin's lymphoma: comparison with flow cytometric cell cycle analysis. Leuk Lymphoma 1992; 7(1-2):165-79.

[288] Jakić-Razumović J, Tentor D, Petrovečki M, Radman I. Nucleolar organizer regions and survival in patients with non-Hodgkin's lymphomas classified by the working formulation. J Clin Pathol 1993; 46: 943-7.

[289] Jakić-Razumović J, Petrovečki M, Dominis M. AgNORs predictive value of prognosis in non-Hodgkin's lymphoma according to the Kiel classification. Mod Pathol 1995; 8(2):143-9.

[290] *Munakata S, Hendricks JB. Morphometric analysis of AgNORs in imprints and sections from non-Hodgkin's lymphoma. an approach to standardization. Anal Quant Cytol Histol 1993;15:329-34.*

[291] *Takahashi H, Fujita S, Okabe H, Tsuda N, Tezuka f: Estimation of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in lymphoproliferative disorders of gastrointestinal tract. Path Res Pract 1994;190:350-361.*

[292] *Xu LZ, Wang LF. Nucleolar organizer regions in aspirates of malignant lymphomas and benign disorders of the lymph nodes. Anal Quant Cytol Histol 1992;14:148-52.*

[293] *Grotto Hz, Metze K, Lorand-Metze I. pattern of nucleolar organizer regions in human leukemic cells. Anal Cell Pathol 1993;5:203-12.*

[294] *Kaur P, Milligan DW, Crocker J. Nucleolar organiser regions in lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Pathol 1988;41:1337-9.*

[295] *Grotto HZW, Lorand-Metze I, Metze K. Pattern of nucleolus organizer regions in human leukemic-cells. Anal Cell Pathol 1993;5:203-12.*

[296] *Wachtler F, Schwarzacher HG, Ellinger A. The influence of the cell cycle on structure and number of nucleoli in cultured human lymphocytes. Cell Tissue Res 1982;255:155-63.*

[297] *Metze K, Lorand-Metze I. Methods for analysis AgNORs. J Clin Pathol 1999;52:550-2.*

[298] *Metze K, Chiaru AC, Andrade FL, et al. Nucleolar organizer regions as a proliferation marker in chronic lymphoid leukemia. Eur J Histoch 1998;42: (suppl 1):19.*

[299] *Metze K, Chiaru AC, Andrade FL, Lorand-Metze I. Changes in AgNOR configuration during the evolution and treatment of chronic lymphocytic leukemia. Hematol Cell Ther 1999;41:205-10.*

[300] *Metze K, Kobo AM, Lorand-Metze I. Nucleolus organizer regions and total tumours mass are independent prognostic parameters for treatment-free period in chronic lymphocytic leukemia. Int J Cancer 2000;89:440-3.*

[301] *Metze K, Lorand-Metze I. Age related decrease of AgNOR activity in acute and chronic lymphocytic leukaemias. J Clin Pathol-Mol Pathol 1999;52:52.*

[302] *Oliveira GB, Pereira FG, Metze K, Lorand-Metze I. Spontaneous Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia and Its Relationship to Clinical and Cell Kinetic Parameters. Cytometry 2001; 46:329-35.*

[303] *Metze K, Oliveira GB, Pereira FG, Adam RL, Lorand-Metze I. Spontaneous apoptosis in chronic lymphocytic leukemia is not an independent prognostic factor for stability of disease when compared with combined AgNOR and TTM score. Cell Oncol 2005;27:199-201.*

[304] *Mourad WA, Pugh WC, Huh YO, Keating MJ. Cell kinetic analysis of interleukin-2 receptor-tested chronic lymphocytic leukemia using the agnor silver stain. Am J Clin Pathol 1994;101:300-4.*

[305] *Klobusicka M, Kusenda J, Babusikova O. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in relation to p53 and bcl-2 protein expression in leukemia patients. Neoplasma 2003;50:408-15.*

[306] *Muhonen T, Pyrhoenen S, Laasonen A, Wasenius VM, Asko SS. Tumour growth rate and DNA flow cytometry parameters as prognostic factors in metastatic melanoma. Br J Cancer 1992;66:528-32.*

[307] *Peters GJM, Miles BJ, Cerny JC, Gaba AR, Jacobsen G, Crissman JD. Prognostic significance of DNA quantification in stage D1 prostate carcinoma with the use of image analysis. Cancer 1992;70:1159-65.*

[308] *Salmon I, Swan F, Dargent JL, Pasteels JL, Kiss R, Katz RL: Relationship between DNA ploidy level, nuclear size, and survival in large cell lymphoma. Am J Clin Pathol 1995;103: 568-73.*

[309] *Wojcik EM, Katz RL, Fanning TV. Johnston. Morphonuclear comparison of the mantle zone and diffuse subtype of mantle cell lymphoma. Anal Quant Cytol Histol 1994;16:287-92.*

[310] *Czader M, Porwit A, Tani E, Öst A, Mazur J, Auer G. DNA image cytometry and the expression of proliferative markers (proliferating cell nuclear antigen and Ki67) in Non-Hodgkin's lymphomas. Mod Pathol, 1995;8:51-8.*

[311] Caligaris-Cappio, Gottardi D, Alfarano A, Stacchini A, Gregoretti MG, Ghia P, Bertero MT, Novarino A, Bergui L. The nature of the B lymphocyte in B-chronic lymphocytic leukemia, Blood cells 1993;19:601-13.

[312] Kardum-Skelin I, Jakšić O, Šušterčić D, Seili-Serdoz I, Antulov J, Horvat S, Soldo D, Putarek K, Jakšić B. Kvantitativne metode (image analyses) u razvrstavanju leukemijskih oblika limfocitnih neoplazmi. I Hrvatski kongres hematologa i transfuziologa . Zbornik sažetaka. Zagreb, 1995.

[313] Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukemia: prognostic factors and natural history. Baillieres Clin Haematol 1993;6:849-66.

[314] Andreeff M. Cell kinetics of leukemia. Semin Hematol 1986;23:300-14.

[315] Kusenda J, Glasova M, Babušikova O. Analysis of the phenotype and cellular DNA content in some leukemias by flow cytometry. Neoplasma 1995;42:347- 52.

[316] Kimby E, Mellstedt H, Nilsson B, Tribukait B, Bjőrkholm M, Holm G. S-Phase Lymphocytes in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) in Relation to Immunoglobulin Isotypes on the Leukemic Clone and to Disease Activity. Leukemia 1987;5:432-6.

[317] Dudko ET, Tischenko LM, Kalinovskii AK, Krivozubov VB. The flow cytometry of lymphocyte deoxyribonucleic acid in chronic lympholeukemia. Vrach Delo 1993;1:41-4.

[318] Killough BW, Nichols CA, Nicholson JA, Gansler TS. Diagnosis of pancreatic carcinoma by fine needle aspiration cytology and computerized cytomorphometry. Analyt Quant Cytol Histol 1989;11(4):238-42.

[319] Crissman J, Drozdowicz S, Johnson C, Kini SR. Fine needle aspiration diagnosis of hyperplastic and neoplastic follicular nodules of the thyroid. A morphometric study. Analyt Quant Cytol Histol 1991;13(5): 321-8.

[320] Hutchinson ML, Schultz DS, Stephenson RA, Wong KL, Harry T, Zahniser DJ. Computerized microscopic analysis of prostatic fine needle aspirates. Comparison with breast aspirates. Analyt Quant Cytol Histol 1989; 11(2):105-10.

[321] Petein M, Michel P, van Velthoven R, Pasteels JL, Brawer MK, Davis JR, et al. Morphonuclear relationship between PIN and cancers as assessed by digital cell image analysis. Am J Clin Pathol 1991; 96: 628-34.

[322] Hodak I, Kardum-Skelin I, Šušterčić D, Fabijanić I, Jakić-Razumović J, Šeparović V, Manojlović S. Image analysis of breast cancer. U: Abstracts of the 31 th European Congress of Cytology. Paris 2005. Cytopathol 2005; 16 (Suppl 2): 8.

[323] Waltz AE, Morimoto R, Machevsky. Computerized interactive morphometry and the diagnosis of lymphoid-rich effusion. A J C P 1993;99:570-5.

[324] Strojny P, Traczyk Z, Rozycka M, Bem W, Sawicky W. Fourier analysis of nuclear and cytoplasmic shape of blood lymphoid cells from healthy donors and chronic lymphocytic leukemia patients. Anal Quant Cytol Histol 1987; 9:475-9.

[325] Ricco R, De Benedictis G, Giardina C, Bufo P, Resta L, Pesce Delfino V. Morphometric analytical evaluators of lymphoid populations in nonneoplastic lymph nodes. Analyt Quant Cytol Histol 1985;7(4): 288-293.

[326] Crocker J. Morphometric and related quantitative techniques in the study of lymphoid neoplasms. A review. J Pathol 1984; 143: 69-80.

[327] Crocker J, Jones EL, Curran RC. A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. J Clin Pathol 1983; 36:298-302.

[328] Stevens MW, Fazzalari NL, Crisp DJ. Quantitation of nuclear shape in non-Hodgkin's lymphoma. Alternate shape descriptors. Analyt Quant Cytol Histol 1987; 9(6):459-68.

[329] Wojcik E, Katz RL, Fanning TV, Johnston DA. Morphonuclear comparison of the mantle zone and diffuse subtypes of mantle cell lymphoma. Analyt Quant Cytol Histol 1994;16:287-92.

[330] Jukema JW, van Diest PJ, Baak JPA. Prognostic value of morphometry in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Anal Quant Cytol Histol 1992;14:120-8.

[331] Seshardi R, Jarvis LR, Jamal O, Skinner JM. A morphometric classification of acute lymphoblastic leukemia in children. Med Ped Oncol 1985;13:214-20.

[332] Ghani AM, Krause JR. Investigation of cell size and nuclear clefts as prognostic parameters in chronic lymphocytic leukemia. Cancer 1986; 58:2233-8.

[333] Lerma-Puertas E, Gonzales-Campora R, Amerigo-Navarro J, Rubi-Uria J, Galera-Davidson H. Morphometric study of bone marrow in chronic lymphocytic leukemia. Anal Quant Cytol and Histol 1988;10:28-32.

[334] Böcking A, Nietzke N, Metzger A, Henning C, Nguyen H, Stockhausen J, Wurflinger T, Bell A, Meyer-Ebrecht D. Multimodal and monocellular measurements of markers and morphology. U: Final programme and proceedings of 3o$^{th}$ European Congress of Cytology, Athens: 2004.

[335] Keating MJ. Treatment of chronic lymphocytic leukemia. U: Freireich EJ, Kantarjian H, ur. Therapy of hematopoietic neoplasia. New York; Dekker; 1991, str. 175-204.

[336] Vrhovac R, Delmer A, Tang R, et al. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27$^{kip1}$ in chronic B-cell lymphocytic leukemia. Blood 1998;91:4694-700.

[337] Orfao A, Ciudad J, Gonzales M, et al. Prognostic value of S-phase white blood cell count in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 1992;6:47-51.

[338] Mauro FR, De RG, Burgio VL, Caruso R, Giannarelli D, Monarca B, Romani C, Baroni CD, Mandelli F. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. Acta Haematol 1994;79:334-41.

[339] Rai KR, Rabinowe SN. Chronic lymphocytic leukemia. U. Holland JF, ur. Cancer Medicine. Philadelphia: Lea&Febiger; 1993, str. 1971-88.

[340] Jakšić O. Izražaj adhezijskih molekula u B-staničnoj kroničnoj limfocitnoj leukemiji /doktorska disertacija/. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet Zagreb;2005.

[341] Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J. Nucleoside transporter in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia 2004;18:385-93.

[342] Deriano L, Guipaud O, Merle-Beral H, et al. Human chronic lymphocytic leukemia B cell can escape DNA damage-induced apoptosis through the nonhomologous end-joining DNA repair pathway. Blood 2005;12:4776-83.

[343] Gale RP, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Keating M, et al. Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. International workshop on chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 1994;9:1610-14.

[344] Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, Murphy EJ, Koduru P, Ferrarini M, Zupo S, Cutrona G, Damle RN, Wasil T, Rai KR, Hellerstein MK, Chiorazzi N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cell. J Clin Invest 2005,115:755-64.

[345] Adachi M, Tefferi A, Greipp PR, Kipps TJ, Tsujimoto Y. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med 1990; 171:559-64.

[346] Hallek M, Kuhn-Hallek I, Emmerich B. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia (Suppl 2) 1997;S4-S13.

[347] Baccarani M, Cavo M, Lauria F, Tura S. Staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 1982;59:1191-6.

[348] Butturini A, Gale RO. Oncogenes in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia Res 1988;12:89-92.

[349] Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRCCLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. Br J Haematol 1989:72:141-9.

[350] De Rossi G, Mandelli F, Covelli A, Luciani M, Martelli M, Resegotti L, Alberti A, Gajozzo A, Deriu L, De Biasi R, Broccia G, Abbadessa A, Caronia F, Leone P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) in younger adults: a retrospective study of 133 cases. Hematol Oncol 1989;7:127-37.

[351] Dhodapkar M, Tefferi A, Su J, Phyliki RL. Prognostic Features and survival in young adults with early/intermediate chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a single institution study. Leukemia 1993:7:1232-5.

[352] Dighiero G, Travade P, Chevret S, Fenaux S, Chastang C, Binet JL. The French Cooperative Group on CLL B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. Blood 1991;78:1901-14.

[353] Döhner G, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenh D, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A, Huntein W, Lichter P. P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. Blood 1995;85:1580-9.

[354] Döhner G, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, Fischer K, Huntein W, Hansen K, Lichter P. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involment and inferior prognosis. Blood 1997;89:2516-22.

[355] Dyer MJS, Zani VJ, Lu WZ, et al. BCL-2 translocations in leukemias of mature B-cells. Blood 1994;83:3682-8.

[356] El Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. Blood 1993;82:3452-9.

[357] Engelhard M, Brittinger G, Heinz R, Theml H, Bartels H, Binder T, Fülle HH, Gerhartz H, Gunzer U, Ludwig F, Ludwig WD, Nowicki L, Oertel J, Pees HW, Pralle H, Rühl U, von Schilling C, Spann W, Stacher A, Szeimies U, Wetzel HJ, Zwingers T, Feller AC, Stein H, Lennert K. Chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and immunocytoma (LP-IC): clinical and prognostic relevance of this distinction. Leuk Lymphoma 1991 (Suppl);161-73.

[358] Erlanson M, Osterman B, Jonsson H, Lenner P. Chronic lymphocytic leukemia: a retrospective study of 122 cases. Eur J Haematol 1994;52:108-14.

[359] Faguet GB. Chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol 1994;52:108-14.

[360] Fenaux P, Preudhomme C, Laï JL, Quiquandon I, Jonveaux P, Vanrumbeke M, Sartiaux C, Morel P, Loucheux-Lefebvre MH, Bauters F, Berger R, Kerckaert JP. Mutations of p53 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia. A report on 39 cases with cytogenetic analysis. Leukemia 1992;6:246-50.

[361] Foon Ka, Rai KR, Gale RP. Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. Ann Intern Med 1990;113:525-39.

[362] French Cooperative Group on Chronic lymphocytic Leukaemia. Natural history of stage A chronic lymphocytic leukaemia untreated patients. Br J Haematol 1990;76:45-7.

[363] Bosch F, Montserrat E. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. Rev Clin Exp Hematol 2002;6(4):335-49.

[364] De Faria JR, de Oliveira JSR, de Faria RMD, Silva MRR, Goihman S, Yamamoto M, Kerbauy J. Prognosis related to staging system for chronic lymphocytic leukemia. Sao Paulo Med J/Rev Paul Med 2000;118:83-8.

[365] Jaksić B, Vitale B, Hauptmann E, et al. The roles of age and sex in the prognosis of chronic leukaemias: a study of 373 cases. Br J Cancer 1991;64:345-8.

[366] Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. Blood 1999;94:448-54.

[367] Montserrat S, Gomis F, Vallespi T, Rios A, Romero A, Soler J, Alcala A, Morey M, Ferann C, Diaz-Mediavilla J, Flores A, Woesner S, Batlle J, Gonzales-Aza C, Rovira M, Reverter J, Rozman C. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. Blood 1991;78:1545-51.

[368] Molica S, Brugiatelli M, Callea V, Morabito F, Levato D, Nobile F, Alberti A. Comparison of younger versus older B-cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. Eur J Haematol 1994;52:216-21.

[369] Pangalis G, Reverter JC, Boussiotis VA, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukaemia in younger adults in preliminary results of a study based on 454 patients – IWCLLL Working Group. Leuk Lymphoma 1991;5 (Suppl):175-8.

[370] Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The Nacional Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer 1999;86:2684-92.

[371] Rozman C, Bosch F, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia: a changing natural history? Leukemia 1997;11:775-8.

[372] Zwiebel JA, Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: Staging and prognostic factors. Semin Oncol 1998;25:42-59.

[373] Gale RP, Caligaris CF, Dighiero G, Keating M, Montserrat E, Rai K. Recent progress in chronic lymphocytic leukemia. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Leukemia 1994;8:1610-4.

[374] Galton DAG, Wuiltshaw E, Szur L, et al. The use of chlorambucil and steroids in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. Br J Haematol 1961;7:73

[375] Keating MJ. Treatment od chronic lymphocytic leukemia. U: Therapy of hematopoietic neoplasia, ur. Freireich EJ, Kantarjian H. pp 175-204. New York Dekker, 1991.

[376] Jaksic B, Brugiatelli M, Krc I, Losonczi H, Holowiecki J, Planinc-Peraica A, Kusec R, Morabito F, Iacopino P, Lutz D. High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. Cancer 1997;79(11):2107-14.

[377] The French Cooperative Group in Chronic Lymphocytic Leukemia: Effects of Chlorambucil and therapeutic decision in initial forms of chronic lymphocytic leukemia (Stage A): Results of randomized clinical trial on 612 patients. Blood 1990;75:1414

[378] Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Canad Med Assoc J 1966;94:1005-10.

[379] Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf WU, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E, Emmerich B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high of disease-progression in early, non-smoldering chronic lymhocytic leukemia. Blood 1999;93:1732-7.

[380] Molica S, Reverter JC, Alberti A, Montserrat E. Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of their clinical significance. Eur J Haematol 1990;44:277-81.

[381] Rai KR, Sawicky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukaemia. Blood 1975;46:219-34.

[382] Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. U. Gale RP, Rai KR. Alan R. Liss R, ur. Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions. New York: 1987; str. 253-64.

[383] Rai KR, Han T. Prognostic factors and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 1990;447-56.

[384] Rai KR, Rabinowe SN. Chronic lymphocytic leukemia. U: Cancer Medicine. ur. Holland JF i sur. 2 izd. Lea&Febiger, Philadelphia 1993;1971-88.

[385] Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbles S, Gremy F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. Cancer 1981;48:198-204.

[386] International Workshop on CLL. Chronic lymphocytic leukemia: proposals for revised prognostic staging system. Br J Haematol 1981;48:365-7.

[387] Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockill G, Mackie MJ, Parker Ac, Castoldi GL, Cuneo AC, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphatic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. N Eng J Med 1990;323:720-4.

[388] Rozman C, Montserrat E, Vinolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. Cancer 1988;61:279-83.

[389] Geisler CH, Larson JK, Hansen NE, Hansen MM, Christensen BE, Lund B, Nielsen H, Plesner T, Thorling K, Andersen E, Andersen PK. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 1991;78:1795-802.

[390] Lee JS, Dixon DO, Kantarijan HM, Keating MJ, Taplaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: A multivariate regression analysis of 325 untreated patients. Blood 1987;69:929-36.

[391] Jaksic O, Vrhovac R, Kusec R, Kardum MM, Pandzic-Jaksic V, Kardum-Skelin I, Planinc-Peraica I, Morabito F, Brugiatelli M, Jaksic B. Clinical tumor cell distribution pattern is a prognostically relevant parameter in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Haematologica 2001;86:827-36.

[392] Cordone I, Matutes E, Catovsky D. Monoclonal antibody Ki-67 identifies B and T cells in cycle in chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease activity. Leukemia 1992;6:902-6.

[393] Del Giglio A, O'Brien S, Ford RJ, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Leuk Lymphoma 1993;10:265-71.

[394] Orfao A, Ciudad J, Gonzales M, et al. Prognostic value of S-phase white blood cell count in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 1992;6:47-51.

[395] Vrhovac R, Delmer A, Tang R, et al. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor $p27^{kip1}$ in chronic B-cell lymphocytic leukemia. Blood 1998;91:4694-700.

[396] Rozman C, Montserrat E, Feliu E, Granena A, Marin P, Nomdedeu B, Vives-Corrons JL. Prognosis of chronic Lymphocytic Leukemia: a multivariate survival analysis of 150 cases. Blood 1982;59:1001-5.

[397] Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, Emmerich B. Thymidine kinase: a tumour marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. Ann Hematol 1992;65:1-5.

[398] Mauro FR, De RG, Burgio VL, Caruso R, Giannarelli D, Monarca B, Romani C, Baroni CD, Mandelli F. Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution. Acta Haematol 1994;79:334-41.

[399] Molica S, Reverter JC, Alberti A, Montserrat E. Timing of diagnosis and lymphocyte accumulation patterns in chronic lymphocytic leukemia: analysis of their clinical significance. Eur J Haematol 1990;44:277-81.

[400] Vallespi T, Montserrat E, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. Br J Haematol 1991;77:478-85.

[401] Anastasi J, Le BM, Vardiman JW, Fernald AA, Larson RA, Rowley JD. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. Blood 1992; 79:1796-801.

[402] Frisch B, Bartl R. Histologic classification and staging of Chronic lymphocytic leukemia. A retrospective and prospective study of 503 cases. Acta Haematol 1988;79:140-52.

[403] Orfao A, Gonzales M, San Miguel J. Clinical and immunological findings in large B-chronic lymphocytic leukemia. Clin Immunol Immunopathol 1988;46:177-85.

[404] Melo JV, Catovsky D, Gregory Wm, Galton DA. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. Br J Haematol 1987;65:23-9.

[405] *Molica S, Alberti A. Investigation of nuclear clefts as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Haematol 1988;41:62-5.*

[406] *Peterson LC, Bloomfield CD, Brunning RD. Relationship of Clinical Staging and Lymphocyte Morphology to Survival in Chronic Lymphocytic Leukaemia. Br J Haematol 1980;45:563-7.*

[407] *Frater JL, McCarron KF, Hammel JP, Shapiro JL, Miller ML, Tubbs RR, Pettay J, Hsi ED. Typical and atypical chronic lymphocytic leukemia differ clinically and immunophenotypically. Heamatopathology 2001;116:655-64.*

[408] *Amouroux I, Mossafa H, Gentilhomme O, Girot R, Flandrin G, Toussard X. Chronic lymphocytic leukaemia with binucleated lymphocytes. Leukemia and Lymphoma 1997;27:533-7.*

[409] *Lipshutz MD, Mir R, Rai KR, Sawitsky A. Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. Cancer 1980;46:1422-7.*

[410] *Montserrat E, Rozman C. Bone marrow biopsy in chronic lymphocytic leukemia: a review of its prognostic importance. Blood Cells 1987;12:315-26.*

[411] *Rozman C, Hernandez NL, Montserrat E, Brugues R. Prognostic significance of bone-marrow patients in chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol 1981;47:529-37.*

[412] *Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 1995;333:1052-7.*

[413] *Rozman C, Montserrat E, Rodriquez-Fernandez JM, Ayats R, Vellespi T, Parody R, Rios A, Prados D, Morey M, Gomis F, et al. Bone marrow histologic pattern. The best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. Blood 1984;64:642-8.*

[414] *Montserrat E, Sanchez BJ, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of its prognostic significance. Br J Haematol 1986:62:567-75.*

[415] *Montserrat E, Villamor N, Reverter J, Brugues R, Tassies D, Bosch F, Aguilar J, Vives-Corrons J, Rozman M, Rozman C. Bone marrow assessment in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: aspirate or biopsy? A comparative study in 258 patients. Br J Haematol 1996;93:111-6.*

[416] *French Cooperative Group on Chronic lymphocytic Leukaemia. Comparison of the (A, B, C) staging and Rai's staging from a large prospective series (935 patients). Nouv Rev Fr Hematol 1988;30:363-7.*

[417] *Mandelli F, Rossi G, Mancini P, Cajozzo A, Grignani F, Leoni P, Liso V, Martelli M, Neri A, Resegotti L, Torlontano G. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from GIMEMA group. J Clin Oncol 1987;5:398-406.*

[418] *Keating MJ, Lerner S, Kantarjian H, Freireich EJ, O'Brien S. The serum $\beta_2$-microglobulin ($\beta_2$-m) level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Blood 1995; 86(Suppl 1):606a.*

[419] *Simonsson B, Wibel L, Nilsson K. $\beta_2$-microglobulina in chronic lymphocytic leukaemia. Scand J Haematol 1980;24:174-80.*

[420] *Gronowitz JS, Hagberg H, Källandr CFS, Simonsson B. The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin9s lymphoma. Br J Cancer 1983;47:487-95.*

[421] *Hallek M, Emmerich B, Strohmeyer S, Busch R, Reichle A, Senekowitsch R. Activity of serum thymidine kinase in non-Hodgkin lymphoma: relationship to other prognostic factors. Klin Wochenschr 1988;66:718-23.*

[422] *Hallek M, Strohmeyer S, Wanders L, Emmerich B. Thymidine kinase. U: Ballesta A, Torre G, Bombardieri E, Gion M, Molina R, ur. Updating on tumour markers in tissues and biological fluids. Basic aspects and clinical applications. Torino: Edizioni Minerva Medica; 1993, str. 363-71.*

[423] *Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, Schick H-D, Kuhn-Hallek I, Emmerich B. Serum $\beta_2$-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. Leuk Lymphoma 1996;22:439-47.*

[424] *Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Adolph S, Hallek M, Dietzfelbinger H, Maubach P, Ziegler-Heitbrock HWL, Thiel E, Emmerich B. Interferon alpha 2b in the treatment of early stage CLL with risk for progression. Results of a randomized multicenter study. Br J Haematol 1996;94:362-9.*

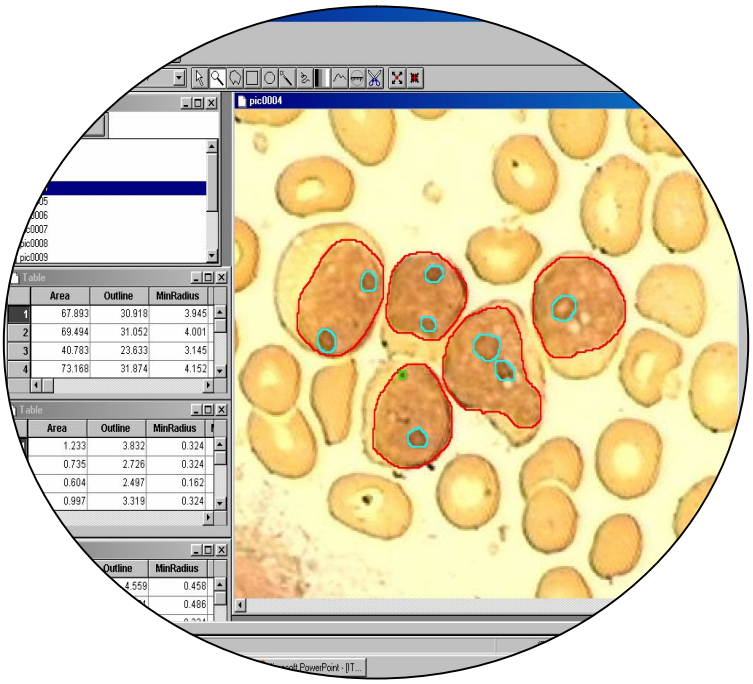
[425] *Caligaris-Cappio F, Ghia P. The normal counterpart to the chronic lymphocytic leukemia B cell. Best Pract Res Clin Haematol. 2007;20(3):385-97.*

[426] *Zent CS. Chronic B-cell lymphoproliferative disorders: How many diseases? Leukemia&Lymphoma 2006;47:2006-7.*

[427] *Kipps TJ. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. Best Pract Res Clin Haematol 2007;20(3):415-24.*

[428] *Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000;403:503-11.*

[429] *Ugo V, Leporrier N, Salaun V, Letestu R, Radford-Weiss I, Ramond S, Nataf J, Guesnu M, Picard F, Brouze C, Perrot JY, Valensi F, Levy V, Ajchenbaum-Cymbalista F, Troussard X. Deciphering leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. Leukemia&Lymphoma 2006;47:2088-95.*




# 10. ŽIVOTOPIS

Rođena 01. 11. 1953. godine u Sitnom-Kaštela, udana, majka dvoje djece.
Živi i radi u Zagrebu.

*Edukacija i stručna aktivnost:*

- 1972-1977, diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
- 1977-1978, pripravnički staž u Općoj bolnici Sveti duh
- 1977/78, poslijediplomski studij iz Medicinske citologije
- od 1978 radi u Laboratoriju za citologiju i hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KB «Merkur»
- 1980-1983, specijalizacija iz Medicinske citologije
- 1988, Voditelj Laboratorija za citologiju i hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KB «Merkur»
- 1986, magistrirala na temu: «Morfološka studija limfatičnih stanica u citološkom razmazu u odnosu na histološke klasifikacije malignih limfoma»
- 2007, primarijus, odlukom Povjerenstva za priznavanje naziva primarijus Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske

*Članstvo u strukovnim udrugama:*

- kontinuirano od 1985. godine član Upravnog odbora Hrvatskog društva za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog
- 1985-1989 i 1989-1993 prva Tajnica Hrvatskog društva za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora
- član Upravnog odbora Hrvatskog senološkog društva HLZ za područje citologije od 1999
- član Hrvatskog društva za hematologiju i tranfuziologiju HLZ
- od 2001, predsjednik Hrvatskog društva za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora
- Nacionalni prestavnik u Cytopathology, časopisu Europskog udruženja citologa, od 2005

*Organizacija i sudjelovanje na stručnim i znanstvenim sastancima:*

- Domaći i svjetski kongresi i simpoziji: aktivni učesnik, pozvani predavač, moderator okruglog stola, član ili predsjedatelj sekcijama
- Pozvana predavanja ili «slide» seminari:
  - 1. i 2. i 3. Hrvatski citološki kongres, Zagreb 1995, 2000 i 2005
  - 1. i 2. Hrvatski senološki kongres, Zagreb 2000 i Cavtat 2003

- Internacionalni simpozij o Gaucheovoj bolesti, Zagreb, 2002
- International Course on Thyroid Surgery s temom «Possibility of cytologic classification of thyroid gland tumors»- Zagreb, 2002
- 3. Hrvatski kongres hematologije i transfuzijske medicine, Opatija 2003
- 7. i 9. Simpozij o spolno prenosivim bolestima i urogenitalnim infekcijama, Opatija 2005 i 2007
- 14. Svjetski senološki kongres, Zagreb, 2006
- Međunarodna konferencija o HPV, Cavtat 2007
- 21. Europski kongres patologa, Instambul 2007
- 33. Europski kongres citologa, Madrid 2007

- Član internacionalnih znanstvenih odbora:
  - 28. Europski citološki kongres, Antwerpen 2002
  - 30. Europski citološki kongres, Atena, 2004
  - 32. Europski citološki kongres, Venecija 2006
  - 33. Europski citološki kongres, Madrid 2007

- Inicijator održavanja Internacionalnih znanstvenih simpozija kliničke citologije «Jasna Ivić» pod pokroviteljstvom Akademije medicinskih znanosti Hrvatske i Europskog udruženja citoloških društava, 2002
- Predsjednik Hrvatskog društva za kliničku citologiju HLZ, 2001-2005 i 2005-
- Predsjednik 3. Hrvatskog kongresa kliničke citologije, Opatija 2005
- Dopredsjednik lokalnog organizacijskog odbora 14. Svjetskog Senološkog kongresa, Zagreb 2006
- Član predsjedništva International Workshop on Human Papillomaviruses and Consensus Recommendations for Cervical Cancer Prevention & Colposcopy Training, Cavtat 2007
- Član predsjedništva 3rd European Conference on head and neck oncology, Zagreb 2008
- Član Organizacijskih odbora Simpozija o spolno prenosivim bolestima i urogenitalnim infekcijama od 2004-2008

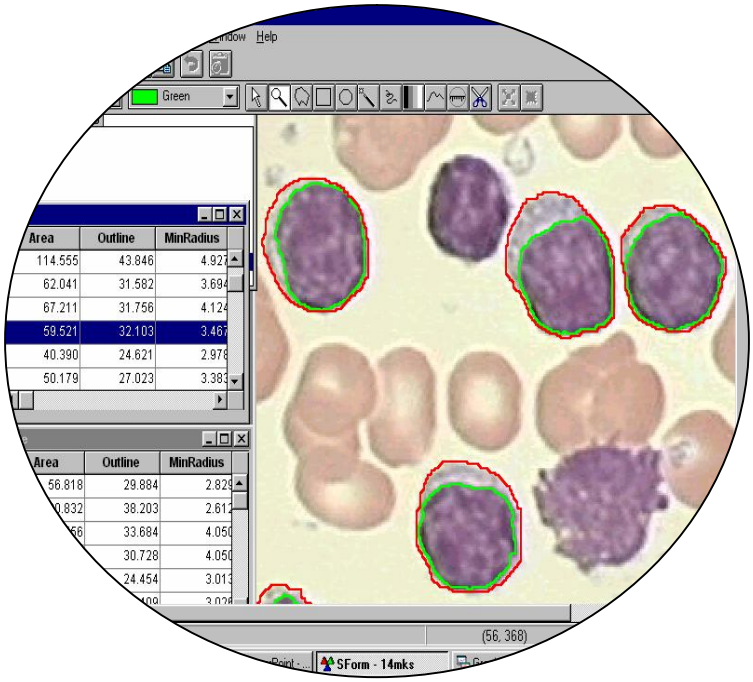
*Nastavne i stručne aktivnosti:*

- dodiplomska nastava izbornog predmeta «Uvod u citodijagnostiku» na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

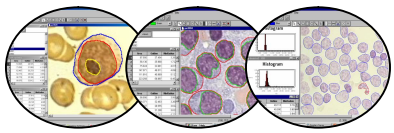
- poslijediplomska nastava na više stručnih poslijediplomskih studija u nastavi hematološke i gastroenterološke citologije te primjene novih tehnologija (Klinička citologija, Infektologija i Pedijatrija)
- nastava na znanstvenim poslijediplomskim studijima «Medicinske znanosti» na kolegiju «Sindrom kronične limfocitne leukemije» te «Embriogeneza i kancerogeneza»
- predavač na tečajevima trajnog usavršavanja
- organizacija i izobrazba citotehnologa
- glavni mentor specijalizantima iz Medicinske/Kliničke citologije
- mentor specijalizantima iz hematološke i gastroenterološke citologije te primjene novih tehnologija
- sudjelovala u izradi postojećeg programa specijalizacije iz Kliničke citologije, programa Poslijediplomskog studija iz Kliničke citologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te programa trajnog usavršavanja citotehnologa
- voditelj Tečaja trajne edukacije citotehnologa koji organizira Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi i Hrvatsko društvo za kliničku citologiju Hrvatskog liječničkog zbora od 2008
- Predsjednik Povjerenstva za citologiju pri Ministarstvu zdravstva RH 2001-2003
- Član više Povjerenstava pri Ministarstvu zdravstva RH:
  - Povjerenstva za rak dojke (izrada Smjernica za dijagnozu, liječenje i praćenje žena oboljelih od raka dojke) 2002-2004
  - Povjerenstva za medicinsko laboratorijske inženjere (donošenje plana i programa školovanja citotehnologa) 2003
  - Povjerenstva za izradu stručno - medicinske podloge za donošenje Pravilnika o utvrđivanju uvjeta u pogledu prostora, opreme i djelatnika za obavljanje zdravstvene djelatnosti 2002-2004
  - Povjerenstva za Kliničke morfološke struke -izrada novog programa specijalizacije 2003-2008

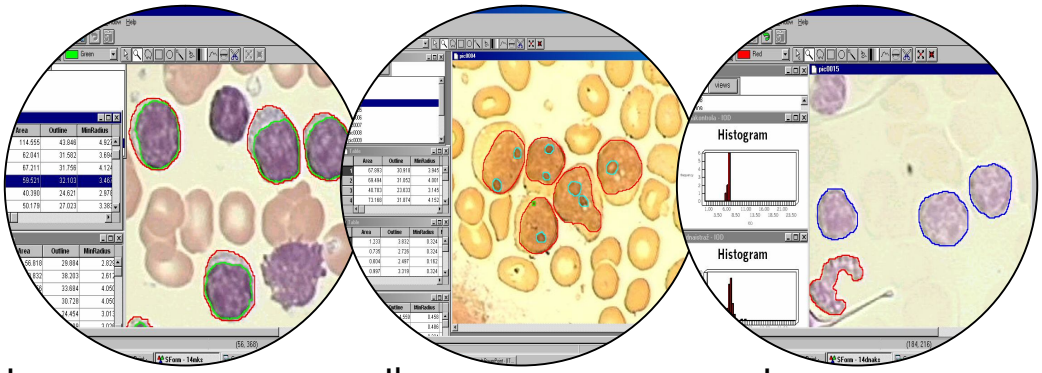
*Znanstveni rad:*

- 1987, izbor u zvanje znanstveni asistent
- autor i koautor 266 radova, kongresnih priopćenja i nastavnih tekstova
  - u CC (Current Contents) 19 radova i 34 kongresna sažetka
  - u ostalim indeksiranim časopisima 17 radova i 70 kongresnih sažetaka

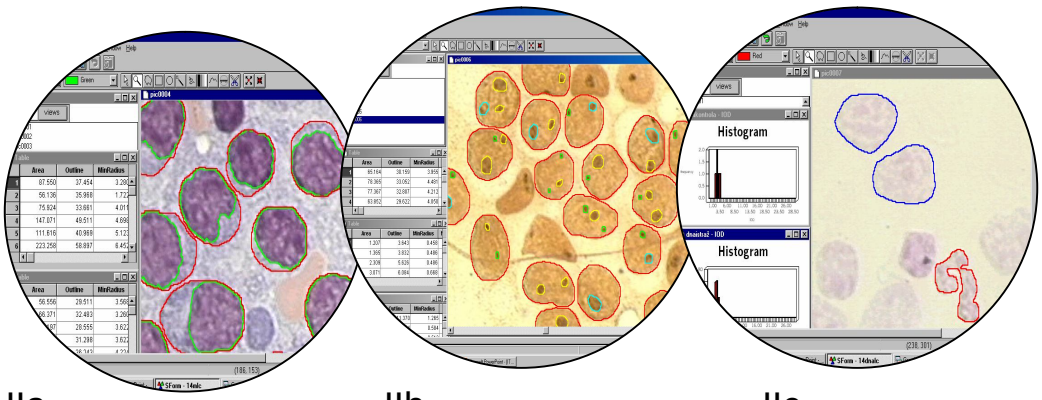

Help
Green
Area
Outline
MinRadius
114.555
43.846
62.041
31.582
67.211
31.756
59.521
32.103
40.390
24.621
50.179
27.023
Area
Outline
MinRadius
56.818
29.884
38.203
33.684
30.728
24.454
(56, 368)
SForm - 14mks

# 11. PRILOZI

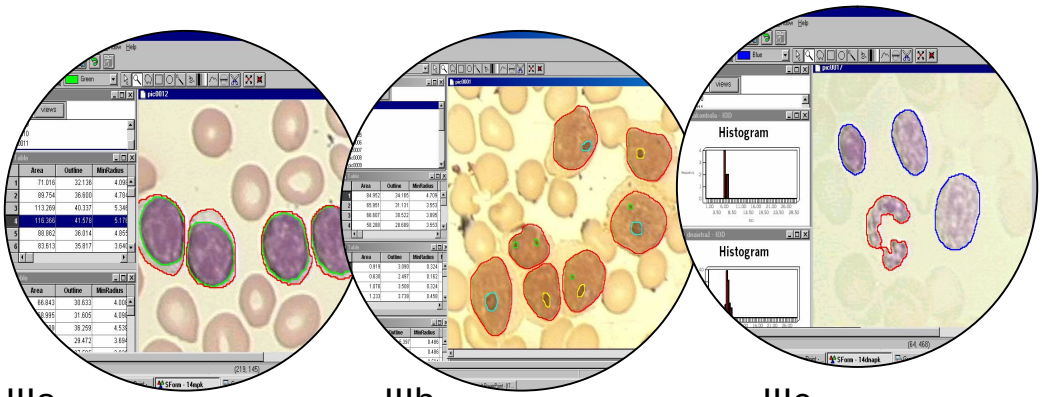





Ia Ib Ic

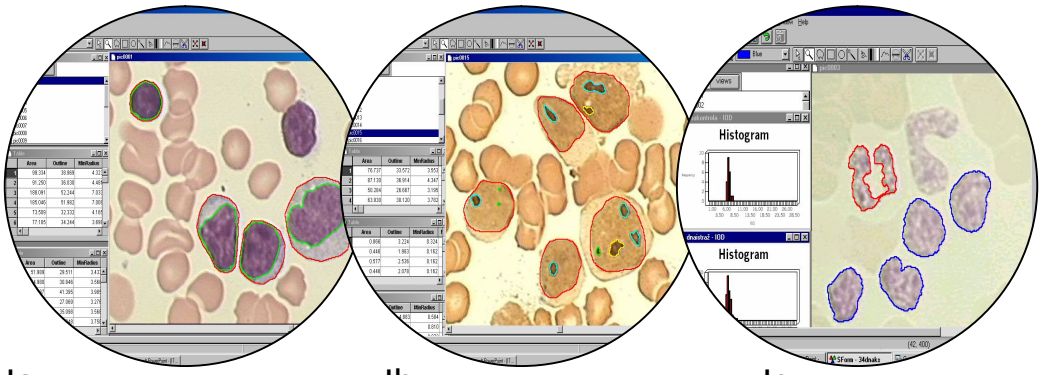



IIa IIb IIc

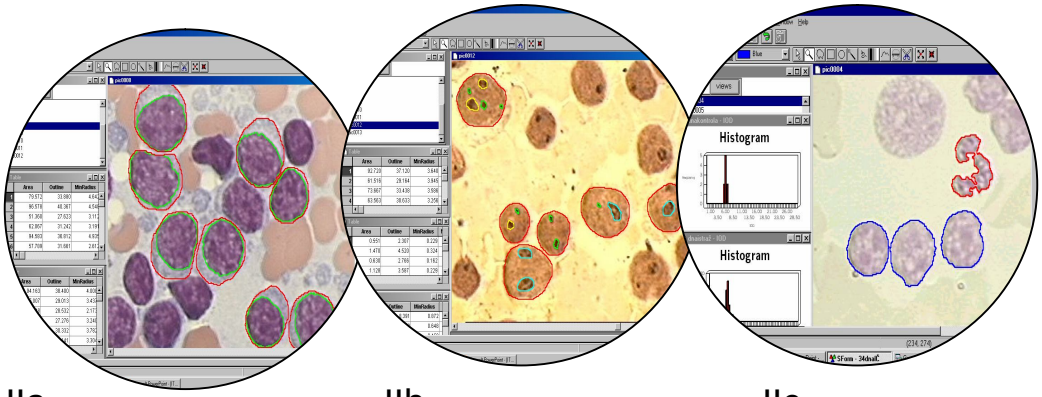



IIIa IIIb IIIc

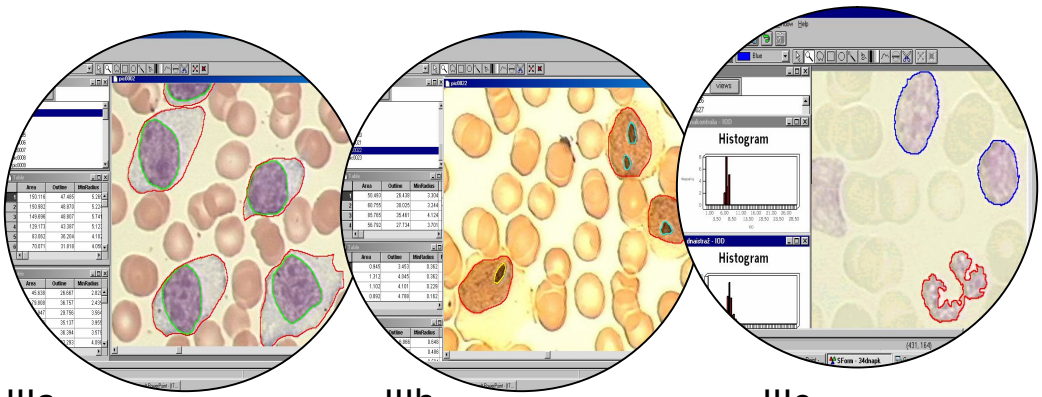
Prilog 1. Image analiza u bolesnika s B-KLL+V (KLL/IMC): I-koštana srž (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA); II-limfni čvor (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA); III-periferna krv (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA)



Ia Ib Ic

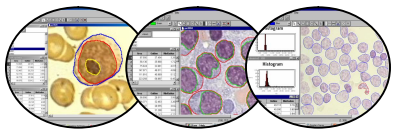


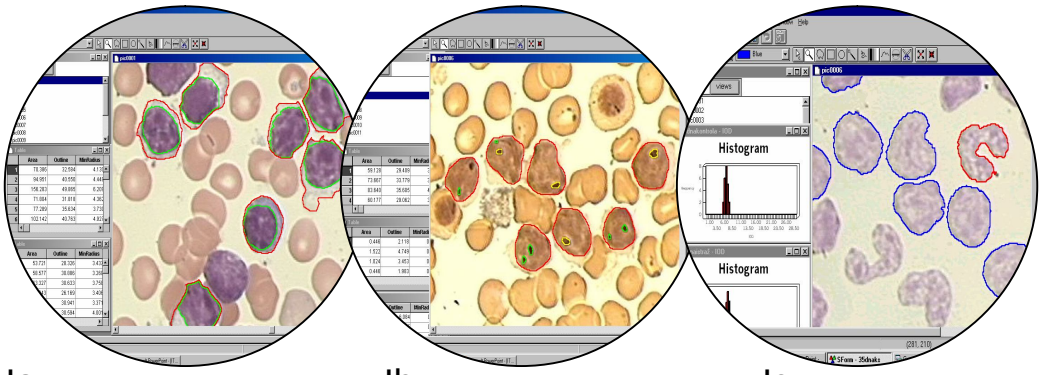
IIa IIb IIc



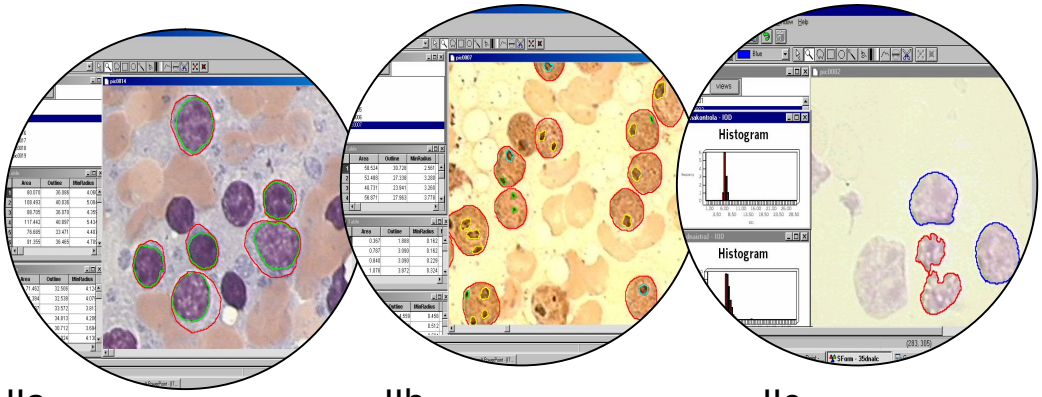
IIIa IIIb IIIc

Prilog 2. Image analiza u bolesnika s B-KLL+V(KLL/PLL): I- koštana srž (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA); II-slezena (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA); III-periferna krv (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA)

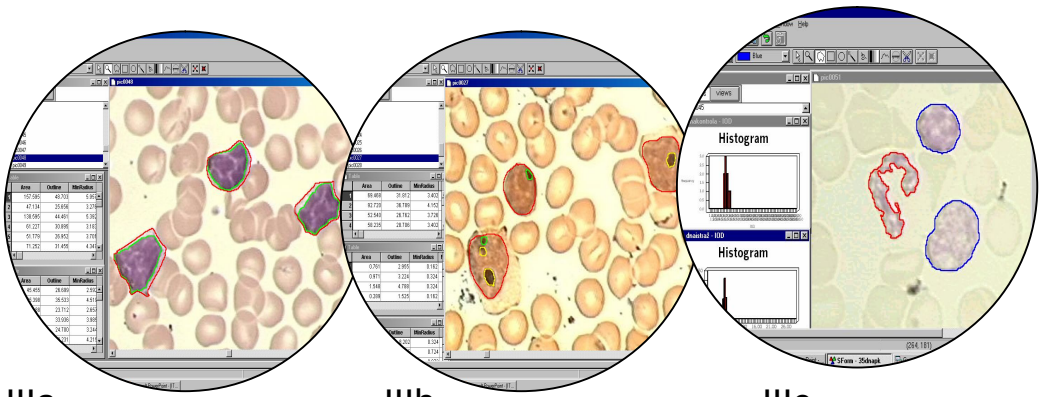





Ia Ib Ic




IIa IIb IIc




IIIa IIIb IIIc

Prilog 3. Image analiza u bolesnika s B-KLL: I-koštana srž (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA); II-limfni čvor (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA); III-periferna krv (a-morfometrija, b-AgNOR, c-DNA)