

Kliničke značajke i dijagnostika kronične limfocitne leukemije (KLL)

doc. dr. sc. Stefan Mrđenović, dr. med.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Osijek

Katedra za internu medicinu i povijest medicine, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Klinički uvod u limfoproliferativne bolesti

DEFINICIJA

Limfoproliferativne bolesti obuhvaćaju spektar entiteta koji nastaju **zloćudnom transformacijom T-limfocita, B-limfocita ili NK-stanica** u različitim stadijima ontogeneze.

Zajednička značajka je **klonalna proliferacija** s poremećajem mehanizama diferencijacije, proliferacije i apoptoze.

ENTITETI

- Limfomi
- Limfocitne leukemije
- Nasljedne limfoproliferativne poremećaje
- Stečeni poremećaji s imunodeficijencijom
- Plazmastične diskrazije

Patofiziologija

Bolesti nastaju **akumulacijom genetskih i epigenetskih promjena** u limfoidnim progenitorima ili zrelim limfocitima, uzrokovanih brojnim vanjskim i unutarnjim etiološkim čimbenicima.

Limfociti posjeduju **jedinstvenu sposobnost genomske pregradnje** za proizvodnju raznolikosti receptorskih antigena — ti procesi nose rizik za genomske pogreške:

- ▶ **Translokacije** koje uključuju protoonkogene
- ▶ **Poremećaji** u unutarstaničnim signalnim putevima

Podjela neoplastičnih bolesti limfoidnog sustava počiva na integraciji histomorfoloških, imunofenotipskih, genetičko-molekularnih i temeljnih kliničkih obilježja bolesti

HISTOMORFOLOŠKA OBILJEŽJA

Određuju se analizom histološkog uzorka neoplastičnog tkiva:

- ▶ **Uzorak rasta:** difuzan, folikularan, infiltracija plaštene ili marginalne zone
- ▶ **Arhitektura rasta:** struktura germinativnog centra
- ▶ **Citološki izgled:** male, velike i atipične stanice

Ova obilježja često definiraju naziv tumora i osnovnu dijagnostičku kategorizaciju.

IMUNOFENOTIPSKA OBILJEŽJA

Određuju se višestrukim metodama:

1. Imunohistokemijska analiza bioptata
 2. Imunocitokemijska analiza punktata
 3. Protočna citometrija
- ▶ Omogućavaju **razgraničenje B-staničnih, T-staničnih i NK-staničnih linija**
 - ▶ Razlikovanje podskupina linija tumora za preciznu dijagnozu

GENETIČKO-MOLEKULARNA OBILJEŽJA

Određuju se primjenom:

- ▶ **Citogenetskih metoda:** kariogram, FISH
- ▶ **Analizom genskih mutacija:** razne metode sekvencioniranja DNA tumora

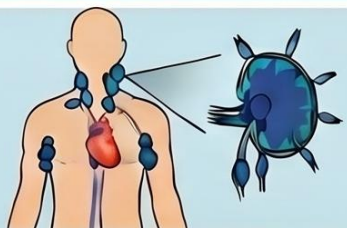
TEMELJNA KLINIČKA OBILJEŽJA

Određuju se kliničkim ponašanjem tumora:

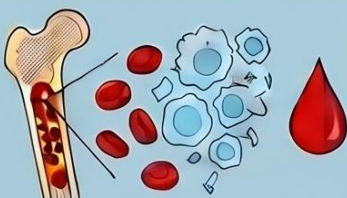
- ▶ **Tip raspodjele tumorske mase**
- ▶ **Biološke agresivnosti**
- ▶ **Pridruženih kliničkih sindroma**

Podjela kliničkih obilježja neoplastičnih bolesti limfoidnog sustava temeljem 3 preklapajuće osi

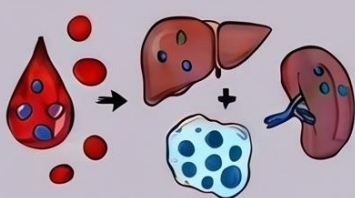
1. os: tip raspodjele tumorske mase



nodalne neoplazme
(limfomi)
dominantno zahvaćeni limfni čvorovi.



leukemijske
(leukemije)
primarna infiltracija koštane srži i periferne krvi.



miješane
istodobna infiltracija koštane srži i organa, s dominacijom jednog odjeljka.



ekstranodalne
razvoj u pridruženom limfatičnom tkivu ili transformacija izoliranih limfocita.

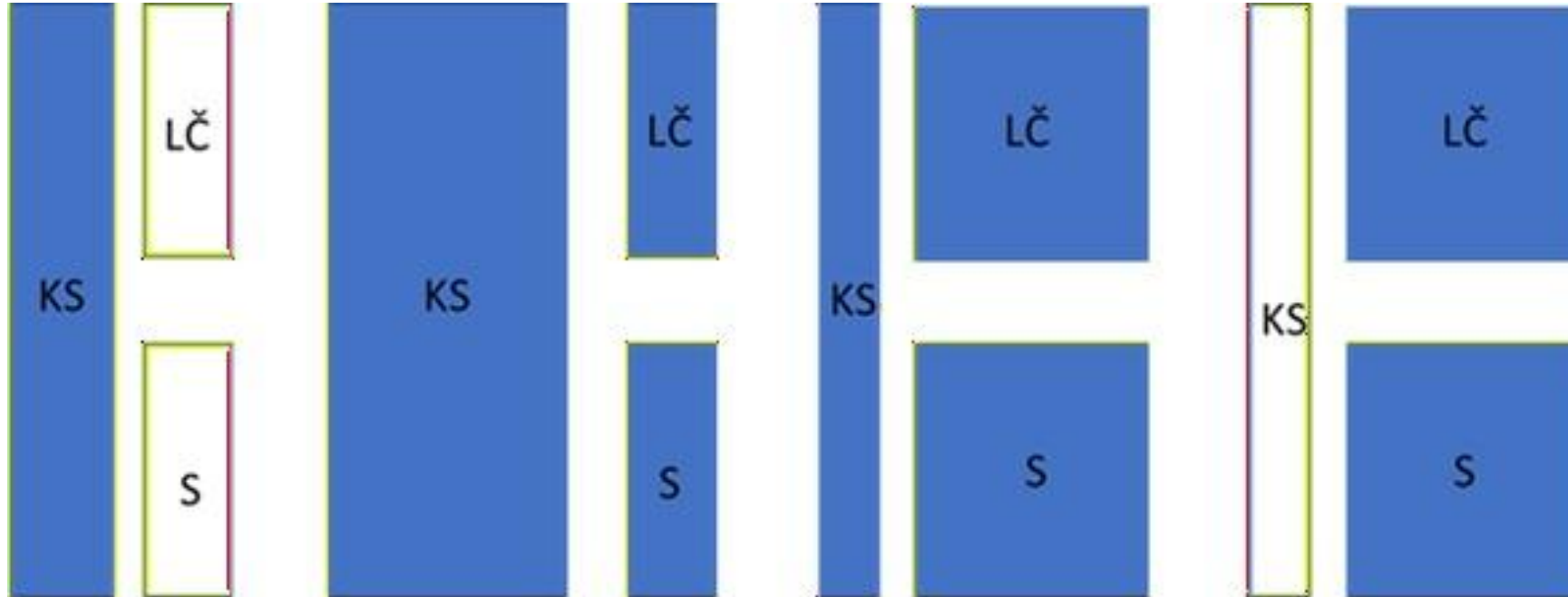
2. os: biološka agresivnost



3. os: osnovni klinički sindrom



Model raspodjele tumorske mase



KS – koštana srž, LČ – limfni čvor, S – slezena.

Zajednička funkcionalna obilježja neoplastičnih bolesti limfoidnog sustava

1 INFILTRACIJA ORGANA NEOPLASTIČKIM STANICAMA

Limfni čvorovi

Značajan rast i formiranje konglomerata, kompresija okolnih struktura (živaca, krvnih žila, kanala, probave, disanja), otežana cirkulacija limfe (edem)



Koštana srž

Insuficijencija mijelopoeze ili zdrave imunopoeze



ANEMIJA TROMBOCIT NEUTROPENIJA
OPENIJA

Probavni sustav

Organomegalija, poremećaj funkcije infiltriranog organa, poremećena apsorpcija hrane, krvarenje iz probavnog trakta, poremećaji peristaltike, stenoza crijeva ili opstrukcija probave



Probavni sustav CNS



CNS

neurološki simptomi

Osjetni organi

poremećaj osjeta

Dišni sustav

Respiratorna insuficijencija gornjih ili donjih dijelova, infiltracija i obliteracija pluća, nekroza i superinfekcije



Urinarni sustav

Urinarna opstrukcija i krvarenje

Serozne membrane

POJAVA IZLJEVA, PERIKARDITIS, PLEURALNI IZLJEVI, ASCITES



Osjetni organi

poremećaj osjeta



Krvne žile

ishemija, tromboza, krvarenje



Mišićno-koštani

pathological fractures

2 METABOLIČKI POREMEĆAJI I B SIMPTOMI

B SIMPTOMI BOLESTI



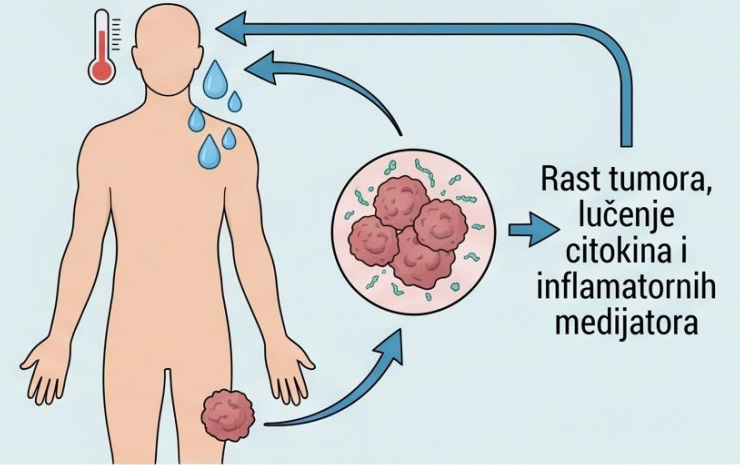
Groznicu
NEOBJAŠNJIVE
SUBFEBRILNE
TEMPERATURE



Znojenje
POJAČANO
NOĆNO ZNOJENJE



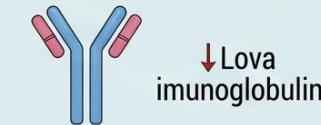
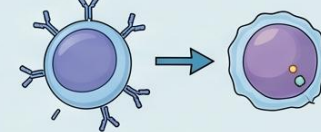
Gubitak težine
GUBITAK NA
TJELESNOJ TEŽINI



3 POREMEĆAJI ODNOSA NEOPLASTIČNOG KLONA I IMUNOLOŠKOG ODGOVORA

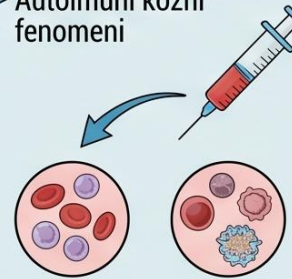
Imunološki poremećaji

Imunodeficijencija: Hipogamaglobulinemija (↓ imunoglobulini), poremećena suradnja T/B limfocita, imunološki defekti



Autoimuni fenomeni

- ▶ Imunotrombocitopenija (↓ trombociti)
- ▶ Autoimuna hemolitička anemija (uništeni eritrociti)
- ▶ Autoimuni kožni fenomeni



Složeni sustavni poremećaji

Hiperviskozni sindrom, krioglobulinemija, AL-amiloidoza, oštećenje funkcije živaca, oštećenje bubrežne funkcije

Rijetki paraneoplastički sindromi (Hiperkalcijemija, hiperaldosteronizam, dermatomiozitis, polimiozitis, paraneoplastična cerebelarna degeneracija)

Rijetki složeni poremećaji (Hemofagocitna limfohistiocitoza, DIK, TTP, POEMS, TAFRO)

Limfoproliferativni sindrom KLL/SLL

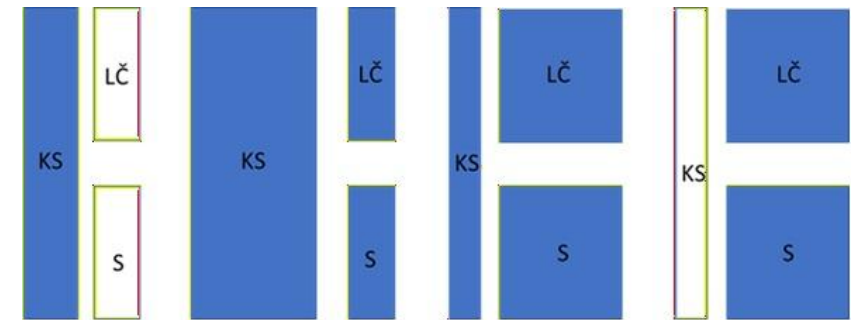
Definicija: Jedinstven histomorfološki, imunofenotipski i molekularni entitet s mnogostrukom prezentacijom.

Maligne stanice KLL-a i SLL-a imaju **identična patološka i imunofenotipska obilježja** zrelih B-limfocita.

Tipovi prezentacije:

- **Mješana raspodjela** (najčešća): leukemija s infiltracijom organa ili limfom s infiltracijom krvi → **KLL/SLL**
- **Leukemijska neoplazma** (nešto rjeđe): dominira krv → **KLL**
- **Limfomska neoplazma** (najrjeđe): dominiraju limfni čvorovi, <5000 limfocita/ μ L → **SLL**
- **Eksranodalna neoplazma** (izrazito rijetko)

U većini slučajeva **indolentan tijek**; moguće agresivne akcelerirane faze i rijetke histološke transformacije.



Jedinstven način liječenja svih entiteta neovisno o kliničkoj prezentaciji

KLL i SLL – isti entitet, različite manifestacije

KRONIČNA LIMFOCITNA LEUKEMIJA (KLL)

Prezentacija: dominantno **leukemijski sindrom**

Kriterij:

- B-limfociti u perifernoj krvi > **5000/μL**
- Prevladavaju zreli mali limfociti
- Trajanje ≥ 3 mjeseca

Imunofenotip:

- CD5+, CD19+, CD20^{slabo}, CD23+
- Monotipski Ig (κ ili λ)

LIMFOM MALIH STANICA (SLL)

Prezentacija: dominantno **limfomski sindrom**

Kriterij:

- Limfociti u perifernoj krvi < **5000/μL**
- Primarno zahvaćeni limfni čvorovi
- Idenični imunofenotip kao KLL

Histologija:

- Difuzno izbrisana arhitektura
- Proliferacijski centri (pseudofolikuli)

Danas se gotovo uvijek liječe identično. Naziv KLL sve češće obuhvaća oba entiteta neovisno o prezentaciji.

Epidemiološka obilježja KLL

~14%

svih leukemija globalno (najčešća leukemija u kliničkoj praksi)

108.386

novih slučajeva godišnje (ASR 1,04/100.000 stanovnika)

~70 god

srednja dob u trenutku dijagnoze

Demografija:

- Muškarci > žene: omjer **1,2:1 do 1,8:1**
- Incidencija raste s dobi
- Dominantno u **bijelačkoj populaciji** Europe, SAD-a, Australije
- Rijede kod dalekoistočnih azijskih populacija (genetski čimbenici)

Rizični čimbenici:

- Obiteljska anamneza (srodnici prvog koljena)
- Istovremene pojave kod supružnika/domaćinstva
- Profesionalni/okolišni čimbenici nisu jasno dokazani

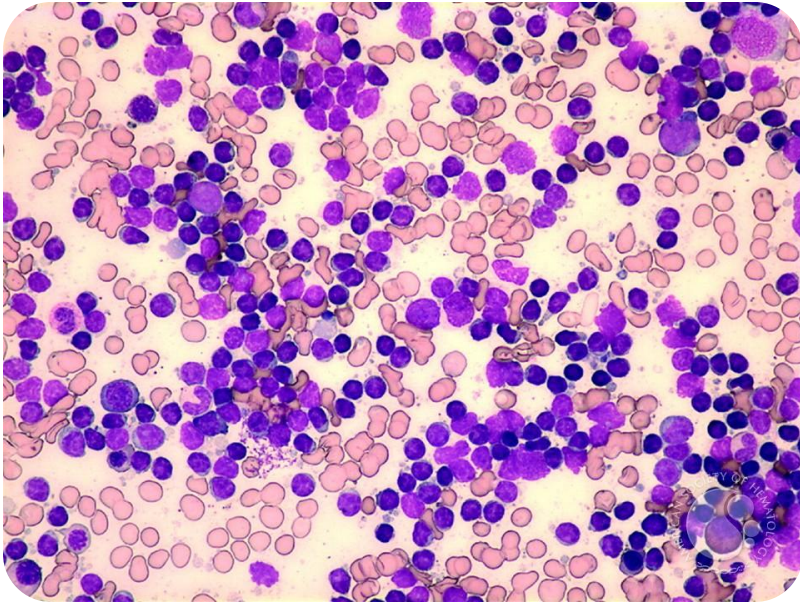
Najčešće mutacije:

- **TP53** (15%) — lošija prognoza
- **SF3B1** (15%)
- **MYD88** (10%)
- **ATM** (9%)
- **NOTCH1** (4%)

Kromosomske anomalije:

- **del(13q)** — bolji ishod
- **del(11q)** — lošiji ishod
- **Trisomija 12**
- **del(17p)** — lošiji ishod

Morfološka i histološka obilježja KLL



CLL — aspirat koštane srži (ASH Image Bank)

Periferna krv:

- Limfocitoza — mali limfociti zrelog izgleda
- Tamna jezgra, kondenzirani kromatin, neupadljivi nukleoli
- Prolimfociti (srednje veličine, mrežasti kromatin, istaknuta jezgrica)
- "Smudge" stanice (Gumprechtove sjene) — krhke stanice

Koštana srž:

- Normalna do povećana celularnost
- Limfociti > 30% svih stanica s jezgrom
- Obrazac: intersticijski, nodularni ili difuzni

Limfni čvorovi: Difuzno izbrisana arhitektura — infiltrat od malih limfocita + prolimfocita i paraimunoblasta grupiranih u "**pseudofolikule**" (**proliferacijski centri**) — patognomoničan nalaz za CLL

Slezena: Infiltracija bijele i crvene pulpe (bijela pulpa izraženija), mogući proliferacijski centri.

Imunofenotipska analiza – ključ dijagnoze

Protočna citometrija s panelom antitijela: CD5, CD19, CD20, CD23, κ i λ lanci

Skupina markera	Markeri	Nalaz u KLL	Klinički značaj
B-stanični markeri	CD19, CD20, CD23	Pozitivni (CD20 slaba ekspresija)	Potvrda B-limfocitne loze
T-stanični marker	CD5	Pozitivan	Atipičan za B-stanice — karakteristično
Površinski Ig	Ig M ± IgD, κ ili λ	Slaba ekspresija, monotipski	Potvrda klonalnosti
Dodatni markeri	CD200, HLA-DR	Pozitivni; ciklin D1-, CD10-	Diferencijacija od MCL i drugih

Dodatne informacije: FMC7, CD22 i CD79b obično negativni. Oko 40% slučajeva CD38+ na >30% stanica. LEF1 bojenje u tkivnim rezovima pomaže u diferencijaciji od drugih tumora malih B-limfocita.

Dijagnostički kriteriji prema iwCLL 2018

KRITERIJ 1: MORFOLOGIJA

- B-limfociti u perifernoj krvi > **5000/μL**
- Trajanje ≥ **3 mjeseca**
- Prevladavaju morfološki zreli mali limfociti

KRITERIJ 2: IMUNOFENOTIP

- Restrikcija lakih lanaca (κ ili λ)
- Ekstremno niski površinski Ig
- CD19, CD20, CD23 pozitivni
- **CD5 pozitivan**

Klasifikacija pri < 5000/μL

Entitet	Kriteriji	Manifestacije
MBL	< 5000/μL klonalnih B-limfocita	Bez limfadenopatije, organomegalije, citopenija
KLL	Citopenije uzrokovane infiltracijom koštane srži	Infiltracija tipičnim stanicama KLL-a
SLL	Zahvaćenost čvorova, slezene, ekstramedularno	Bez citopenija uzrokovanih infiltracijom srži

Table 1. Baseline evaluation of patients with CLL

Diagnostic test	General practice	Clinical trial
Tests to establish the diagnosis		
CBC and differential count	Always	Always
Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes	Always	Always
Assessment before treatment		
History and physical, performance status	Always	Always
CBC and differential count	Always	Always
Marrow aspirate and biopsy	When clinically indicated (unclear cytopenia)	Desirable
Serum chemistry, serum immunoglobulin, and direct antiglobulin test	Always	Always
Chest radiograph	Always	Always
Infectious disease status	Always	Always
Additional tests before treatment		
Molecular cytogenetics (FISH) for del(13q), del(11q), del(17p), add(12) in peripheral blood lymphocytes	Always	Always
Conventional karyotyping in peripheral blood lymphocytes (with specific stimulation)	NGI*	Desirable
TP53 mutation	Always	Always
IGHV mutational status	Always	Always
Serum β_2 -microglobulin	Desirable	Always
CT scan of chest, abdomen, and pelvis	NGI	Desirable
MRI, PET scans	NGI	NGI
Abdominal ultrasound†	Possible	NGI

General practice is defined as the use of accepted treatment options for a CLL patient not enrolled on a clinical trial.

CBC, complete blood count; MRI, magnetic resonance imaging; NGI, not generally indicated; PET, positron emission tomography.

*Conventional karyotyping in peripheral blood lymphocytes (with specific stimulation) may be useful before therapy, if established methodology is available.

†Used in some countries to monitor lymphadenopathy and organomegaly.

Klinička slika i tijek bolesti

Inicijalna prezentacija:

- Većina **asimptomatska** — slučajni nalaz limfocitoze
- Bezbolno oticanje limfnih čvorova (cervikalni, supraklavikularni, aksilarni)
- Čvorovi: čvrsti, zaobljeni, zasebni, bezbolni, slobodno pokretni

B simptomi (5–10% pacijenata):

- Gubitak težine > 10% u 6 mjeseci
- Temperatura > 38°C > 2 tjedna
- Noćno znojenje
- Izražen kronični umor

Organomegalija:

- **Slezena** — drugi najčešći povećani organ; bezbolna, oštar rub
- **Jetra** — blago povećana (2–6 cm), bezbolna, glatka
- Waldeyerov prsten u ždrijelu

Rijetke manifestacije:

- GIT sluznica — klinički značajna rijetko
- Meningealna leukemija (0,2–2%)
- MPGN — paraneoplastički glomerulonefritis
- Kožne promjene (infekcija, krvarenje, vaskulitis)

Autoimune komplikacije: AIHA, trombocitopenija, aplazija čiste crvene loze. **Akcelerirani CLL:** povećan broj prolimfocita / visok Ki-67 indeks, često s TP53 mutacijama — lošija prognoza.

Laboratorijski nalazi

Najupečatljivija abnormalnost: Limfocitoza — često $> 100.000/\mu\text{L}$; ekstremno $> 500.000/\mu\text{L}$ može uzrokovati hiperviskoznost (TIA, moždani udar)

Citopenije i autoimunitet:

- **AIHA:** DAT pozitivan do 35% klinički ~10%
- **PRCA:** ~0,5% (do 6% ciljanim traženjem)
- **ITP:** 2–3%
- **Agranulocitoza:** ~0,5%

Hipogamaglobulinemija:

- Snižene IgG, IgA, IgM
- Razvija se kod 2/3 bolesnika
- Povećan rizik bakterijskih infekcija

Dodatni nalazi:

- Monoklonski protein u do 5%
- Lažno povišeni K^+ zbog krhkosti stanica
- Paraneoplastična hiperkalcijemija u akceleriranoj fazi

Neutropenija, anemija, trombocitopenija:

- Uzrok: zamjena koštane srži + autoimuni procesi
- Obično nisu teške pri dijagnozi

SLL: Znaci leukemijske prezentacije izostaju, ali je moguća detekcija male populacije monoklonskih B-limfocita protočnom citometrijom periferne krvi.

Procjena proširenosti bolesti

RAI (0 – IV)

- 0** — Limfocitoza
- I** — Limfadenopatija
- II** — Splenomegalija ± limfadenopatija
- III** — Anemija ± organomegalija
- IV** — Trombocitopenija ± anemija ± organomegalija

BINET (A – C)

- A** — Limfocitoza + limfadenopatija do 3 regije
- B** — Limfadenopatija ≥ 3 regije
- C** — Anemija i/ili trombocitopenija

TTM KLASIFIKACIJA

Tumorska masa (TM):

TM1 — Periferna krv i koštana srž

TM2 — Limfni čvorovi

TM3 — Slezena

Dinamička klasifikacija; neovisna o insuficijenciji mijelopoze; procjena progresije i učinka terapije

$$TM = \sqrt[2]{|N|Ly} + dN(\text{cm}) + dS(\text{cm})$$

Genetska stratifikacija rizika provodi se prije početka liječenja jer bitno utječe na izbor terapije. Očekivano preživljenje kraće je kod bolesnika s velikom tumorskom masom.

Kriteriji za početak liječenja

- Kriteriji za početak liječenja **Kronične limfocitne leukemije (KLL)** definirani su prema međunarodnim smjernicama **iwCLL-a (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia)**.

- Asimptomatski pacijenti sa ranim stadijem bolesti (Rai 0, Binet A) se prate do pojave znakova simptomatske ili progresivne bolesti.
- Pacijenti srednjeg stadija bolesti (Rai I-II, Binet B) i pacijenti visokog stadija bolesti (Rai III-IV, Binet C) imaju korist od početka liječenja no moguće praćenje, posebno pacijenata srednjeg stadija, ukoliko nemaju znakove simptomatske ili progresivne bolesti (**aktivne bolesti**).
- Aktivna bolest se definira prisutnošću **jednog** od navedenih kriterija:
 - Dokaz insuficijencije mijelopoeeze – progresivna citopenija: 1. Anemija: Hgb < 100 g/L 2. Trombocitopenija: Trombociti < $100 \times 10^9/L$ uz napomenu da izolirana, stabilna, dugotrajna, umjerena trombocitopenija ne zahtjeva nužno početak liječenja.
 - Opsežna (≥ 6 cm ispod lijevog rebrenog luka), progresivna ili simptomatska splenomegalija.
 - Opsežna (≥ 10 cm), progresivna ili simptomatska limfadenopatija.
 - Progresivna limfocitoza definirana kao povećanje broja limfocita za $\geq 50\%$ unutar dva mjeseca ili indeksom udvostručenja broja limfocita (LDT) < 6 mjeseci uz napomenu isključenja čimbenika koji mogu pridonositi limfocitozi (infekcije, primjena kortikosteroidne terapije).
 - Autoimune komplikacije anemije i trombocitopenije koje ne odgovaraju adekvatno na liječenje kortikosteroidnom terapijom.
 - Simptomatska ili funkcionalna ekstranodalna infiltracija (koža, bubreg, pluća, kralježnica, jetra).
 - Gubitak na tjelesnoj težini $\geq 10\%$ unutar 6 mjeseci.
 - Značajan kronični umor (npr. ECOG 2 ili više koje pacijenta onemogućava za rad ili obavljanje svakodnevnih aktivnosti)*.
 - Povišena tjelesna temperatura $\geq 38.0^\circ C$ unutar 2 tjedna bez dokaza infekcije.
 - Noćno znojenje ≥ 1 mjeseca bez dokaza infekcije.

* Pitanje kliničke procjene ili indeksa procjene izraženosti i značajnosti umora (FACIT-F, BFI, EORTC QLQ-C30)

Diferencijalna dijagnoza

Neneoplastička stanja:

- Virusne infekcije, pertusis
- Infekciozna mononukleoza
- Tuberkuloza, toksoplazmoza

Neoplastička stanja (ne-KLL):

- Leukemijska faza limfoma
- Leukemija vlasastih stanica
- Prolimfocitna leukemija
- LGL leukemija

Ključne razlike od infektivne limfocitoze:

- Infektivna limfocitoza **nije klonalna**
- Bez karakterističnog imunofenotipa KLL-a
- Broj limfocita se vraća u normalu nakon nekoliko tjedana
- KLL zahtijeva **postojanu limfocitozu ≥ 3 mjeseca**

SLL vs drugi limfomi:

- Proliferacijski centri (pseudofolikuli) — **patognomonični** za SLL
- Ostali entiteti nemaju proliferacijske centre

Monoklonska limfocitoza B-stanica (MBL): $< 5000/\mu\text{L}$ klonalnih B-limfocita, bez limfadenopatije, organomegalije ili citopenija. **Richterova transformacija:** transformacija u agresivniju histologiju, moguća već u trenutku dijagnoze.