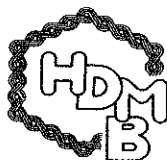


MEDICINA I TEHNIKA 2001.

Međunarodni sajam medicinske opreme,
farmacije i laboratorijske opreme
23. - 26. 05. 2001.



12. simpozij medicinskih biokemičara

SUVREMENA DIJAGNOSTIKA SOLIDNIH TUMORA I CELIJAKIJE U DJECE



Zagrebački Velesajam
Kongresna dvorana Globus
24. svibnja 2001.



12. simpozij medicinskih biokemičara

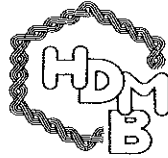
**SUVREMENA DIJAGNOSTIKA
SOLIDNIH TUMORA I CELIJAKIJE
U DJECE**

Zagreb, 24. svibnja 2001.

ORGANIZACIJSKI ODBOR

Vesna Žižić
Elizabeta Topić
Jasna Obuljen
Nada Vrkić
Zora Zakanj

ORGANIZATORI



Hrvatsko društvo medicinskih biokemičara

Domagojeva 2, Zagreb



Zagrebački Velesajam

Avenija Dubrovnik 15, Zagreb

Poštovani kolegice i kolege,

Čast nam je i zadovoljstvo da u okviru sajma *Medicina i tehnika 2001.*, mi djelatnici Klinike za dječje bolesti Zagreb organiziramo 12. simpozij medicinskih biokemičara s temom »*Suvremena dijagnostika solidnih tumora i celijakije u djece*«

Jedan od značajnih zdravstvenih problema naše djece sigurno predstavljaju i maligne bolesti, a solidni maligni tumori s pravom se danas nalaze u žarištu znanstvenog i praktičnog interesa, jer upravo solidni tumori čine približno 50% svih malignih tumora u djece. Uz to, posljednjih se nekoliko godina došlo do bitnih spoznaja da kod neliječenih celijakičnih bolesnika dolazi do poremećaja imunološkog sustava, koji mogu predisponirati nastanak malignog tumora, prvenstveno non-Hodgin limfoma tankog crijeva, ali i drugih. Maligne se bolesti javljaju u 8 - 13% celijakičnih bolesnika, što predstavlja zaseban problem. To je upravo i razlogom odabira ovih tema predavanja.

Cilj i želja Organizacijskog odbora je da Vas upoznamo sa osobitostima pedijatrijske onkološke problematike, te da preporučimo jedinstvenu medicinsku doktrinu u cilju adekvatne dijagnostike, temeljene na suvremenim medicinskim dostignućima. Timski pristup različitih specijalnosti bitan je čimbenik uspješnog postavljanja rane dijagnoze maligne bolesti u djece. Nadamo se da ćemo Vam uspješno prenijeti naša saznanja o kliničkom značaju diferentne laboratorijske dijagnostike, koja bi trebala postati nezaobilaznim dijelom rutinske prakse.

Prof. dr. sc. Elizabeta Topić
Predsjednica HDMB

Mr. sc. Vesna Žižić, dipl.ing.
Predsjednica
Organizacijskog odbora

Program simpozija

Zagreb, 24. svibnja 2001.

11.15 - 11.30 Uvodna riječ

☉ Celijakija (glutenska enteropatija)

11.30 - 11.55 Epidemiologija i kliničke slike celijakije
Josip Grgurić

11.55 - 12.20 Serodijagnostika celijakije
Vesna Žižić

12.20 - 12.30 Rasprava

☉ Solidni tumori

12.30 - 12.50 Solidni tumori u djece
Melita Nakić

12.50 - 13.10 Feritin i NSE u dijagnozi i praćenju terapije
neuroblastoma
Jasna Obuljen

13.10 - 13.30 Citogenetika i FISH analiza konstitucijskih i stečenih
aberracija kromosoma
Iskra Petković

13.30 - 13.40 Rasprava



12. simpozij medicinskih biokemičara

SUVREMENA DIJAGNOSTIKA SOLIDNIH TUMORA I CELIJAKIJE U DJECE

Sadržaj

1. EPIDEMIOLOGIJA I KLINIČKE SLIKE CELIJAKLIJE 3
Prof. dr. sc. Josip Grgurić, dr. med.
Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju
2. SERODIJAGNOSTIKA CELIJAKIJE 7
Mr. sc. Vesna Žižić, dipl. ing. medicinske biokemije
Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku
3. TKIVNA TRANSGLUTAMINAZA (tTG)-endomizijalni 9
autoantigen celijakije
Mr. sc. Vesna Žižić, dipl. ing. medicinske biokemije
Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku
4. SOLIDNI MALIGNI TUMORI U DJECE 11
Prof. dr. sc. Melita Nakić, dr. med.
Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku
5. FERITIN I NSE U DIJAGNOZI I PRAĆENJU TERAPIJE 13
NEUROBLASTOMA
Jasna Obuljen, dipl. ing. medicinske biokemije
Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku
6. CITOGENETSKA I FISH ANALIZA KONSTITUCIJSKIH I 15
STEČENIH ABERACIJA KROMOSOMA
Dr. sc. Iskra Petković, znanstveni savjetnik
Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju

EPIDEMIOLOGIJA I KLINIČKE SLIKE CELIJAKIJE

Grgurić J.

Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju

Prije stotinu godina engleski liječnik Samuel Gee /1888./ uočio je bolest koju je nazvao celijakija. Tu bolest su šesdeset godina kasnije nizozemski autori povezali s hranom koja sadrži gluten. Gluten je biljna bjelanačevina koja se nalazi u pšenici, raži i ječmu dok je zob još uvijek upitna.

Gluten iz brašna dugačka je kompleksna molekula koja se kemijski može podijeliti u 4 heterogene klase proteina: glijadin, glutenin, albumini i globulini. Glijadin se dalje klasificira u 4 grupe proteina, koji se zovu: alfa, beta, gama i omega. Najviše je interes centriran na alfa-frakciju, jer se pokazalo da je alfa-glijadin bitan čimbenik u celijakičnoj bolesti, ali i frakcije beta i gama uzrokuju oštećenje mukoze.

Danas se celijakija definira kao bolest tankog crijeva karakterizirana abnormalnom intestinalnom mukozom i trajnom intolerancijom na gluten.

Učestalost bolesti je različita u pojedinim krajevima svijeta, te prema etničkim pripadnostima. U Europi su razne nacionalne studije pokazale kako je učestalost celijakije zastupljena od 1: 150 do 1: 500., pa je time celijakija i jedna od najčešćih kroničnih bolesti. Ovako visoka učestalost smatra se da je više posljedica boljeg poznavanja bolesti, te bolje dijagnostike posebno u adultnoj dobi. U Hrvatskoj su radjena epidemiološka ispitivanja u Međimurskoj županiji, te je nađena učestalost 1 : 500, a u srednjoškolskoj populaciji 1 : 300.

Patogeneza bolesti. Pored glutena kao čimbenika bolesti, važna je i genetska predispozicija, koja determinira način reagiranja organizma na unos glutena. U čovjeka sa celijakijom nalazi se gen za celijakiju na kratkom kraku 6-og kromosoma. Na tom mjestu izdvojeni su do sada mnogi markeri u sustavu HLA. Zadnjih godina ukazuje se na posebnu značajnost HLA DQ2 i HLA DQ8 koji su prisutni u 90 do 95 % u oboljelih u odnosu na 20 do 30% u populaciji. Navedeni HLA geni odlikuju se imunološkim odgovorom na gluten.

S druge strane, u enterocitima crijeva nalazi se tkivna transglutaminaza koja služi u deaminiranju glutena mijenjajući mu svojstva koja podražuju odgovarajuće stanice CD4+ stanice T, nakon čega slijedi nepoznati sen-

zibilizirajući proces, ali koji u krajnjoj konzekvenciji dovodi do propadanja viloznih stanica crijeva s rezultatom atrofije sluznice crijeva. Na tkivnu transglutaminazu stvaraju se antitijela, te su ona dobar marker u dijagnostici celijakije. Znači da stanice iz lamine proprije u osoba s celijakijom prepoznaju glijadin peptid uz prisutnost HLA DQ1 A 0501 : B 1*0201 molekule.

Kao posljedica tih promjena imamo i patoanatomske promjene koje dovode do atrofije crijevnih resica. Taj proces prolazi kroz nekoliko faza:

1. **infiltrativna faza** u kojoj dolazi do povećanja broja intraepitelijskih limfocita, ali uz još normalnu arhitekturu.
2. **hiperplastična faza** s hiperplazijom kripti
3. **destruktivna faza** s gubitkom arhitekture resice.

Klinička slika

U ranoj dječjoj dobi bolest će se manifestirati nakon stanovitog vremena po uvođenju glutena u prehranu djeteta. U tom vremenu bolest će se javiti u klasičnom obliku, a što je organizam stariji javljat će se manje tipični oblici bolesti, koji se sumarno mogu prikazati:

1. **tipični** oblici s kroničnim proljevom
2. **atipični** oblici, mali rast, deficijencija Fe, anemije, opstipacije
3. **tih** oblici, slučajevi koji se otkrivaju u populacijskim i epidemiološkim studijama
4. **latentni** /potencijalni/ oblici, prva biopsija s nespecifičnim abnormalnostima. Nakon stanovitog vremena s jasnom kliničkom slikom.

Međutim, važno je istaknuti da pored tih kliničkih slika imamo i ekstraintestinalnu prezentaciju celijakične bolesti, te asocijaciju s mnogim imunološkim, neurološkim kožnim bolestima.

Dijagnostika

Danas u dijagnostici celijakije pored kliničke slike posebno nam služi biopsija sluznice crijeva i histološki nalaz, te serološke pretrage: anti-glijadinska antitijela, endomizijalna antitijela, te antitijela na tkivnu transglutaminazu.

U djece do 2 godine još uvijek postoji princip o potrebi izvođenja tri biopsije:

1. inicijalna,
2. nakon bezglutenske prehrane,
3. biopsija nakon opterećenja glutenom.

Iza druge godine života dovoljna je jedna tipična biopsija crijeva s daljnjim praćenjem razine antitijela. Serologija nam je od važnosti za praćenje pacijenata, da li se pridržavaju bezglutenske dijeta

Najbolja senzitivnost i specifičnost dobiva se kad se primjenjuje kombinacija AGA IgA , AGA IgG i EMA. U starijoj dobi senzitivnost antiglijadinskih antitijela IgA i IgG pada, ali endomizijalna antitijela zadržavaju visoku osjetljivost u odrasloj dobi. Antitransglutaminaza je senzitivna specifični test za transglutaminazu o čemu će na ovom skupu biti posebno riječi.

Prognoza bolesti

Ukoliko se oboljeli od celijakije konzekventno pridržavaju dijeta bez glutena njihov je razvoj sasvim uredan. Inače nepridržavanje dijeta doводи do mnogih komplikacija, između ostalog i veću učestalost malignih limfoma i karcinoma gornjeg dijela probavnog sustava i tankog crijeva.

Zamijećeno je da mukozno oštećenje neliječene celijakije doводи do premalignih stanja, kao što je povećanje mitotičke aktivnosti u kriptama, te iregularnost i povećanje bazofilije na površini sluznice.

Zaključno, može se reći, da pridržavanje bezglutenske dijeta je svojevrsna paradigma primarne prevencije malignih oboljenja, o čemu će biti riječi u drugom dijelu ovog skupa.

Literatura

1. Kumar P, Walker Smith J. Coeliac Disease. One Hundred Year, London, St. Bartholomew s Hospital, 1988.
2. Tronccone R, Greco J, Auricchio S. The controversial epidemiology of coeliac disease Acta Pediatr 2000; 89: 140 - 3.
3. Ascher H. Childhood coeliac disease in Sweden. Goteberg University, 1996.L

4. Lohiniemi S, Collin P, Maki M. Changing Features of Coeliac Disease. *Tempere, The Finnich Coeliac Society*. 1998.
5. Hegeduš Jungwirth M, Matek Z, Kolaček S, Žižić V. Epidemiologija celijakije. *Paed Croatica* 2000; 44/suppl./: 128.
6. Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr* 1996; 3/suppl./: 412.
7. ESPGAN Working Group, Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Archives of Disease in Childhood* 1990; 65: 909.
8. Bode S, Weile B, Krasilnikoff Gudman Hoyer E. The Diagnostic Value of the Gliadin Antibody Test in Celiac Disease in Children: a Prospective Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 3: 260.
9. Dijagnostički algoritam za celijakiju, Odrednice Hrvatskog društva za pedijatrijsku gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu, *Paed Croatica*, 2000; 44/suppl./: 130.
10. Branski D, Troncone R. Celiac disease: A reappraisal, *The Journal of Pediatrics* 1998; 133: 181.
11. Švel I, Grgurić J. *Zdravstvena zaštita kronično bolesnoga djeteta*. Zagreb, Barbat, 1998.

SERODIJAGNOSTIKA CELIJAKIJE

Žižić V¹, Brumen V², Zakanj Z³, Curić D¹, Tadić I.¹

¹ *Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku*

² *Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, škola narodnog zdravlja "Andrija Štampar"*

³ *Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju*

Celijakija je imunološki izazvana enteropatija, u kojoj dolazi do globalnog imunološkog odgovora, kako celularnog tako i humoralnog (1). Već je dugo poznato da se u krvi neliječenih bolesnika mogu naći cirkulirajuća protutijela na glijadin (2), i da njihove vrijednosti visoko pozitivno koreliraju s nalazima biopsije sluznice tankog crijeva. Po uvođenju bezglutenske prehrane, protutijela potpuno nestaju. Radi se o glijadinskim protutijelima razreda IgA i IgG, a stvaraju se na egzogene antigene kakav je glijadin, te o endomizijalnim IgA protutijelima koja se stvaraju na intermiofibrilarne supstancije glatke muskulature crijeva (3).

Cilj ovog ispitivanja bio je utvrditi vrijednost serodijagnostičkih metoda kao načina utvrđivanja bolesti i praćenja tijeka celijakije u djece, s posebnim naglaskom na mlade dobne skupine.

Ispitivanje je obuhvatilo ukupno 138-ero djece u različitim kliničkim fazama bolesti (akutnoj fazi, fazi remisije tijekom bezglutenske dijeta i fazi relapsa nakon ponovnog opterećenja glutenom). U serumima sve djece određivana su antiglijadinska IgA i IgG, te endomizijalna IgA protutijela.

Primijenjene serološke metode vrednovane su određivanjem parametara osjetljivosti, specifičnosti i pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti. Pri tome je, obzirom na njegovu patognomoničnost, kao uporišna točka za statističku evaluaciju uzet histološki nalaz biopsije sluznice tankog crijeva istih bolesnika. Krajnji je smisao ovakvog vrednovanja utvrditi jesu li serološke metode primijenjene u ovom radu dovoljno objektivno vrijedne da bi ih se kao metode probira uvelo u rutinsku kliničku praksu dijagnosticiranja celijakije, pri čemu bi patognomoničan nalaz biopsije tankog crijeva i dalje ostao ključnim za definitivnu dijagnozu bolesti.

Rezultati ispitivanja su pokazali da serološki test na **EMA-IgA** protutijela pokazuje najveću osjetljivost (93%), i specifičnost (96%). U podskupini ispitanika starijih od 3 godine, osjetljivost testa raste do idealne vrijednosti od 100%. Stoga je ovo najdiferentniji test.

Serološki test na **AGA-IgG** protutijela pokazuje izrazito visoku osjetljivost (97%), ali znatno nižu specifičnost (74%). To ga čini pogodnim za "screening" i trijažu sumnjivih slučajeva.

Serološki test na **AGA-IgA** ima nešto nižu osjetljivost (91%) od AGA-IgG testa, ali mu je specifičnost znatno viša (92%). To ga čini pogodnim za diferenciranje suspektnih slučajeva na stvarno i lažno pozitivne.

Istodobna primjena sva tri serološka testa značajno doprinosi diferentnosti serodijagnostike ovog tipa, značajno skraćuje ukupan dijagnostički postupak i omogućuje praćenje tijeka bolesti u fazama remisije i relapsa.

Literatura

1. Van de Wal, Kooy YMC, Drijfhout JW, Amons R, Koning F. Peptide binding characteristics of the coeliac disease-associated DQ (L1*0501 B1*0201) molecule. *Immunogenetics* 1996; 44: 246-53.
2. Chartrand LJ, Agulnik J, Vanounou T, Russo PA, Baehler P, Seidman EG. Effectiveness of antigliadin antibodies as a screening test for celiac disease in children. *C. Maj*, 1997; 157 (59): 527-33.
3. Garlote JA, Blanco A, Alfonso M, Aranz E, Calvo C. Usefulness of antiendomysial antibodies as serological markers in coeliac children. *Pediatr Allergy Immunol*, 1995;4: 199-208.

TKIVNA TRANSGLUTAMINAZA (tTG)- ENDOMIZIJALNI AUTOANTIGEN CELIJAKIJE

Žižić V¹, Linarić I¹, Brumen V³, Obuljen J¹, Zakanj Z²

¹ *Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku*

² *Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju*

³ *Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, škola narodnog zdravlja "Andrija Štampar"*

Novija su istraživanja pokazala značajnu ulogu tkivne transglutaminaze (tTG) kao ciljnog endomizijalnog autoantigena (1) u bolesnika s celijakijom, a njeno određivanje donosi nam novu koncepciju u dosad nedostatnom razumijevanju patogeneze te bolesti.

Glijadin je preferirani supstrat za tTG. Zbog toksičnosti glutenske frakcije u genetički osjetljivih osoba, dolazi do oštećenja ili hiperpermeabilnosti crijevnog epitela, te značajnog izvanstaničnog otpuštanja tTG iz citosola, prvenstveno mononukleara lamine proprije ili mezenhimalnih stanica. Ovaj enzim katalizira ireverzibilno proteinsko umrežavanje (stvaranje poprečnih veza), formiranjem izopeptidnih veza između glutaminskih ostataka kojima obiluje glijadin (2). Posljedica unakrsnog vezanja glijadina rezultira glijadin-glijadin ili glijadin - tTG kompleksima i na taj način se stvaraju novi antigenični epitopi, koji potiču imuni odgovor celijakičara. U ovih je bolesnika nađena uska povezanost osnovne bolesti s prisustvom HLA-DQ dimeonom molekulom (Klase II) (3). Enzimatski promijenjeni epitopi glijadina spajaju se sa DQ-dimeonom molekulom, a tako vezani kompleks prepoznaju i vežu T-limfociti preko svojih antigenih receptora CD4+ (4) te dolazi do stvaranja IgA auto-protutijela na tTG.

Cirkulirajuća IgA-tTG protutijela određuju se ELISA metodom, koja omogućava ekonomičan i brz "screening" populacije a sa svrhom otkrivanja latentnih i subkliničkih slučajeva celijakije, kao prateće patologije šećerne bolesti tipa I, hipoplazije zubne cakline, sideropenične anemije rezistentne na terapiju željezom, nekih oblika epilepsije, osteoporoze itd.

Prema dosad objavljenim rezultatima, test na IgA-tTG pokazuje visoku dijagnostičku osjetljivost (98%) i specifičnost (94%)(1).

Želeći pratiti najnovije svjetske trendove u serodijagnostici ove bolesti, započeli smo studiju vrednovanja testa na IgA-tTG protutijela u ranom

otkrivanju i prevenciji bolesti. Za svrhe ovog ispitivanja serološki je obradeno ukupno sto i tri djeteta. Analizirani su serumi bolesnika s celijakijom s poznatim titrom antiendomizijalnih IgA protutijela (određenim imunofluorescencijom) kao i kontrolni uzorci (serumi zdrave djece). Ishodi serodijagnostičkih testova korelirani su s nalazima biopsije sluznice tankog crijeva, koji se smatraju uporištem kliničke dijagnoze.

Rezultati studije pokazali su da je osjetljivost testa na IgA-tTG protutijela 96%, a specifičnost 94%. Također su uspoređivani parametri osjetljivosti i specifičnosti testova na IgA-EMA i IgA-tTG protutijela u istih ispitanika. Test na IgA-EMA protutijela pokazao je nešto nižu osjetljivost (91%) i specifičnost (92%) u odnosu na IgA-tTG test. Nešto lošiji rezultati IgA-EMA testa proizlaze iz činjenice da je starosna dob ispitanika ove studije bila manja od tri godine, a upravo u toj kategoriji ispitanika IgA-EMA test je manje pouzdan kako je to i naša prethodna studija potvrdila.

Stoga preliminarni rezultati ove studije ukazuju da je u dobnoj skupini do tri godine starosti IgA-tTG test bolji serološki pokazatelj od IgA-EMA testa.

Literatura

1. Dieterich W, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Med* 1997; 3: 797-801.
2. Aeschlimann D, Kaupp O, Paulsson M. Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: Identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J Cell Biol* 1995; 129: 881-92.
3. Van der Wal Y, et al. Peptide binding characteristics of the coeliac disease-associated DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) molecule. *Immunogenetics* 1996; 44: 246-53.
4. Molberg Q, et al. CD4+ T cells with specific reactivity against astrovirus isolated from normal human small intestine. *Gastroenterology* 1998; 114: 115-22.

SOLIDNI MALIGNI TUMORI U DJECE

Nakić M¹, Čepulić M², Stepan J²

¹Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku

²Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klinika za dječju kirurgiju

Maligne su bolesti u svijetu, nakon nesretnih slučajeva, najčešći uzrok smrti djeteta. Iako su maligne bolesti u dječjoj dobi rijetke, ipak je s obzirom na prirodu i česti smrtonosni ishod bolesti te dugotrajno i skupo liječenje bolesnik koji boluje od maligne bolesti neproporcionalno teško opterećenje, kako za liječnika, tako i za obitelj i društvo.

Solidni maligni tumori u djece čine 50% malignih bolesti, a ostalih 50% odnosi se na leukemije i limfome. Među solidnim tumorima najčešće se javljaju tumori CNS-a zatim neuroblastomi, sarkomi mekih tkiva, tumori bubrega, koštani tumori, retinoblastom, tumori zametnog epitela, tumori jetre, tumori gonada i ostali tumori.

Solidni maligni tumori u dječjoj dobi, u mnogome se razlikuju od onih u kasnijoj životnoj dobi. Zbog citološke nediferenciranosti često predstavljaju dijagnostički, diferencijalno-dijagnostički i prognostički problem; teško ih je i klasificirati. Granica između benignih i malignih tumora u dječjoj dobi katkada nije oštro određena što može predstavljati stanovitu opasnost previđanja maligniteta ili pak nepotrebnog podvrgavanja djeteta škodljivu liječenju.

Danas se solidni maligni tumori dječje dobi nalaze u fokusu znanstvenog i praktičnog istraživanja. Naime, posljednjih desetljeća evidentan je napredak u liječenju nekih solidnih tumora, tako da se za pojedine tumore može govoriti i o izlječenju. Ovaj napredak postignut je zahvaljujući novim mogućnostima primjene suvremene dijagnostike (imunološke, citološke, biokemijske, citogenetske) u ranom otkrivanju tumorske bolesti, preciznoj klasifikaciji i određivanju stadija bolesti, ranom otkrivanju recidiva bolesti kao i pojavi metastaza, te kreiranju u primjeni terapijskih protokola.

Kako se danas s pravom može govoriti i o 70% izlječenju nekih tumora, sve raspoložive tehničke mogućnosti moraju biti u službi ranog dijagnosticiranja, te praćenja uspjeha liječenja djece sa solidnim malignim tumorom. Pojedine grupe tumora teško je zbog nediferenciranosti razlikovati, posebno grupu tzv. "Small Round Cell Tumors", u koju ubrajamo primitivni neuroektodermalni tumor (PNET), neuroblastom (NB), Ewing sarkom (ES), Non-Hodgkin limfom (NHL), Rabdomyosarkom (RMS), Wilmsov tumor (WT).

U radu se iznosi pregled mogućnosti ranog dijagnosticiranja malignih solidnih tumora u djece, posebno neuroblastoma primjenom citomorfoloških mogućnosti, s posebnim osvrtom na prednosti biokemijskih analiza upotrebom tumorskih biljega neuron-specifične enolaze (NSE) i feritina, te citogenetskih ispitivanja usmjerenih u dva pravca, i to: ispitivanje prirodnih osobitosti kariotipa te ispitivanje populacije malignih stanica.

Literatura

1. Čepulić M, Nakić M, Čepulić E. Solidni maligni tumori u dječjoj dobi. U: Klinička onkologija (Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ured.), Izdavač: Nakladni zavod Globus, Klinika za tumore, Hrvatska liga protiv raka, Zagreb, 1996; 813-58.
2. Nakić M, Čepulić M. Zaštita djece s malignim oboljenjima. Arh ZMD, dodatak, 1982; vol.26: 1-288. Urednici: Nakić M, Čepulić M.
3. Čepulić M, Nakić M, Milić Ž, Čepulić E. Solidni maligni tumori u dječjoj dobi. Paed Croat 1999;43 (Supl 1): 17-23.
4. Nakić M, Čepulić M, Milić Ž, Stepan J, Čizmić A. Citologija-dijagnostičke i prognostičke mogućnosti u malignim bolestima djece. Paed Croat 1999;43 (Supl 1): 29-37.
5. Žižić V, Linarić I. Dijagnostičko značenje tumorskih biljega. Paed Croat 1999; 43 (Supl 1): 79-83.
6. Petković I. Kromosomski poremećaji u djece sa solidnim tumorom. Paed Croat 1999; 43 (Supl 1): 89-95.

FERITIN I NSE U DIJAGNOZI I PRAĆENJU TERAPIJE NEUROBLASTOMA

Obuljen J¹, Žižić V¹, Stepan-Giljević J¹, Curić D¹, Tadić I¹, Linarić I¹

¹Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zavod za laboratorijsku dijagnostiku

²Klinika za dječje bolesti Zagreb, Odjel za onkologiju Klinike za dječju kirurgiju

Neuroblastomi su uz Wilmsove tumore bubrega najčešći solidni tumori dječje dobi i čine oko 30% ukupnog broja solidnih tumora, odnosno 7-10% svih tumora dječje dobi. Oko četvrtine ukupnog broja bolesnika mlađe je od godine dana, a tri četvrtine mlađe je od 5 godina. Izlječenje bolesti je uglavnom dobro s postotkom preživljavanja od 40 do 90%, što ovisi o stadiju bolesti i dobi pacijenta.

Rutinske pretrage koje se rade pri dijagnosticiranju, odnosno praćenju tijeka bolesti su KKS, sedimentacija, urin, GUK, urea, kreatinin, bilirubin, ALT, AST, GGT, AF, Ca, P, LDH, feritin i katekolamini u mokraći.

Novi tumorski biljeg, specifičan za maligne tumore neuroendokrinog porijekla je enzim neuron specifična enolaza (NSE) koji prema preporuci međunarodnog udruženja SIOP (Société internationale d'oncologie pédiatrique) te njemačkog protokola NB 97 postaje obavezna pretraga u liječenju neuroblastoma.

NSE (E.C.4.2.1.11) je enzim glikolitičkog puta koji katalizira pretvorbu 2-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat. U većim koncentracijama se nalazi u živčanim stanicama i stanicama neuroendokrinog porijekla te se iz njih oslobađa tijekom raspadanja. Istraživanja pokazuju da feritin i NSE koreliraju s kliničkim stadijem ili veličinom tumorske mase, prognozom bolesti, te imaju pouzdanu prediktivnu vrijednost, ali nisu visoko specifični, osjetljivi, niti organ specifični.

U ovom istraživanju praćena su 24 pacijenta liječena od neuroblastoma na Onkološkom odjelu Klinike za dječje bolesti u periodu od 5 godina. Cilj rada je bio usporediti vrijednosti feritina u trenutku postavljanja dijagnoze, za vrijeme kemoterapije te u remisiji bolesti u kliničkim stadijima II, III i IV i utvrditi da li postoji korelacija između vrijednosti feritina i NSE nakon kemoterapije. Osim toga bilo je potrebno utvrditi referentne vrijednosti NSE za dječju populaciju.

Pacijenti u kliničkom stadiju II imaju pretežno normalne vrijednosti feritina tijekom cijelog promatranog razdoblja. Pacijenti u kliničkom

stadiju III predstavljaju najheterogeniju skupinu po vrijednostima feritina u trenutku postavljanja dijagnoze (min = 54,00 ng/ml; max = 935,00 ng/ml, sred. vrij. = 287,00 ng/ml), dok se tijekom i nakon kemoterapije ne razlikuju značajno od pacijenata u kliničkom stadiju IV. Povišene vrijednosti feritina inače su povezane s lošijom prognozom bolesti. Metoda linearne regresije ($r = 0,29$) pokazala je da korelacija između koncentracije feritina i NSE postoji samo u području normalnih vrijednosti (konc. feritina do 140,00 ng/ml i NSE do 20,00 ng/ml). Vrijednosti NSE u kontrolnoj skupini ($n = 80$, zdrava djeca) podudaraju se s podacima iz literature (ž25 ng/ml za djecu < 1 god; ž20 ng/ml za djecu 1-5 god; ž18 ng/ml za djecu 6-8 god) zbog čega će se dosadašnja referentna vrijednost za djecu i odrasle (do 15,2 ng/ml) zamijeniti odgovarajućom za dječju dob.

Literatura

1. Mardešić D i sur: Pedijatrija. Školska knjiga, Zagreb, 2000, 635-685.
2. Thomas L: Clinical Laboratory Diagnostics. Use of Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books, Frankfurt, 1998, 270-275. 979-981
3. Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA. Neuroblastoma, Elsevier Science BW 2000; 371-378.
4. Ladenstein R, Urban C, Gadner H, Fink FM, Zoubek A, Emminger Wet et al. First Experience with Prognostic Factors in Unselected Neuroblastoma Patients. The Austrian Neuroblastoma 87 Study. European Journal of Cancer. 1995; 31A(4), 637-641.
5. Addennebi M, Baussen H, Hanallah L, Daldoul O, Ghanem A et al. The Use of Neuron Specific Enolase in the Prognosi and Follow up of Neuroblastoma in children, Tunisie Medicale 2000; 18 (2) 106-8.
6. Fizazi K, Cojean I, Pignon JP, Rixe O, Gatineau M, Hedef S et al: Normal Serum Neuron Specific Enolase (NSE) Value after the First Cycle of Chemotherapy. Cancer 1998; 82(6), 1049-1055.
7. Operators manuel Elecsys 1010, Roche Diagnostics 1998, V 2.0.

CITOGENETSKA I FISH ANALIZA KONSTITUCIJSKIH I STEČENIH ABERACIJA KROMOSOMA

Petković I.

Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju

Citogenetika je znanstvena disciplina koja proučava strukturu, funkciju, patologiju i ponašanje kromosoma tijekom stanične diobe. U posljednjih dvadesetak godina u rutinsku citogenetsku praksu uvedene su nove metode ispitivanja i moderna oprema, te je danas moguća identifikacija submikroskopskih poremećaja genoma i citogenetska analiza stanica u metafazi i interfazi. Citogenetička ispitivanja naišla su na široku primjenu u različitim granama medicine, a rezultati ispitivanja imaju dijagnostičku i prognostičku vrijednost.

Klasična citogenetika ispituje stanice u metafazi kada su kromosomi kontrahirani i vidljivi kao odvojena tjelešca. Za analizu se koriste stanice koje se spontano dijele ili je dioba inducirana *in vitro* kulturom stanica. Suspenzija stanica se tretira kolhicinom, hipotoničnom otopinom, fiksira i na kraju se pristupa pripremi citogenetičkih preparata. Preparati se boje nekom od metoda za preciznu identifikaciju kromosomskih tipova ili specifičnih kromosomskih segmenata (Q-, G-, R-, C-, T-metode pruga).

Pred desetak godina uvedena je metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (Fish) u rutinsku citogenetsku praksu. Fish metoda predstavlja spornu izmještu citogenetike i molekularne genetike, i omogućuje identifikaciju specifičnih segmenata DNA pomoću fluorokromom obilježenih DNA probi. U tu se svrhu koriste lokus specifične probe, biblioteke kromosoma, centromerične probe te probe kojima se specifično obilježavaju telomere. Metoda je naišla na široku primjenu u ispitivanju konstitucijskih aberacija kariotipa kao što su numeričke aberacije, različiti strukturni poremećaji i mikrodelecije. Pored ispitivanja metafaznih kromosoma Fish metoda omogućuje ispitivanje genoma interfaznih stanica.

U nekim slučajevima analiza interfaznih stanica korisno upotpunjuje nalaze klasične citogenetike. Od posebnog je interesa primjena Fish metode u onkologiji i ispitivanju stečenih kromosomskih aberacija tumorskih stanica. Fish metoda uz primjenu odgovarajućih DNA probi omogućuje otkrivanje specifičnih kromosomskih aberacija te su takva ispitivanja od praktične koristi u postavljanju dijagnoze ili stadija tumorske bolesti.

U ovom radu je izvršeno ispitivanje konstitucijskih i stečenih aberacija kariotipa metodama klasične i molekularne citogenetike (Fish). Cilj rada je da se na selekcioniranoj skupini bolesnika procijene mogućnosti pojedinih metoda obrade u otkrivanju i identifikaciji kromosomskih aberacija.

Ispitna skupina se sastoji od 6 bolesnika primljenih na obradu pod sumnjom na mikrodelecijski sindrom (DiGeorgeov sindrom), 11 bolesnika primljenih na obradu pod sumnjom na konstitucijske numeričke i strukturne aberacije kromosoma te dvoje djece s neuroblastomom. Korištene su metode klasične i molekularne citogenetike dok je za analizu upotrijebljena sofisticirana oprema za prihvata, pohranu, obradu slike uz program za automatsku kariotipizaciju.

Svaka od spomenutih metoda ispitivanja ima svojih prednosti i nedostataka. Pojedine metode ispitivanja kromosomskih poremećaja se međusobno ne isključuju već je u mnogim slučajevima neophodna primjena različitih metoda, a kako bi se identificirao poremećaj, ustanovio mehanizam nastanka te procijenio opseg genetičkog debalansa.

Literatura

1. Wegner RD: Diagnostic Cytogenetics, Springer-Verlag Heidelberg 1999.
2. Stumm M, Tonnie H, Wleack PF. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. Eur J Pediatr 1999; 158: 531-536.
3. Sandberg AA, Bridge JA. The cytogenetics of Bone and Soft Tissue Tumors. RG Landes Company Austin, 1994.

S P O N Z O R I



OLYMPUS



DADE BEHRING