

# MASTOCITOZA V ALERGOLOGIJI

ZBORNİK SESTANKA

# MASTOCITOZA V ALERGOLOGIJI

ZBORNİK SESTANKA

Skupni sestanek Alergološke in imunološke sekcije SZD  
z Združenjem hematologov Slovenije

Petek, 5. Marec 2021

Webex

**Urednik zbornika**

Mitja Košnik

**Strokovni odbor srečanja**

Mitja Košnik, Peter Korošec, Samo Zver

**Organizacija srečanja**

Robert Marčun, Mitja Košnik

**Izdajatelj**

Alergološka in imunološka sekcij SZD



# PROGRAM

Moderatorji: Mitja Košnik, Peter Korošec, Samo Zver

**15:00** Mitja Košnik, Matevš Škrget. Pozdrav udeležencev

**15:10** Tanja Carli. Alergija za strup čebele pri čebelarjih n njihovih svojcih

**15:20** Mihaela Zidarn. Kako alergolog vidi indolentno mastocitozo

**15:40** Tomaž Kocjan. Osteoporoza pri bolnikih z mastocitozo

**16:00** RAZPRAVA

**16:20** Helena Podgornik. cKIT mutacija – Kakšen je njen pomen in kje jo najdemo

**16:40** Gorana Gašljević. Bolezni mastocitov - od indolentne oblike sistemske mastocitoze do mastocitne levkemije

**17:00** RAZPRAVA

Pokrovitelj sklopa Novartis

**17:20** Matija Rijavec. Laboratorijska optimizacija KIT p.D816V testiranja v krvi

**17:40** Julij Šelb. Vloga podvojitev gena TPSAB1 (H $\alpha$ T) pri anafilaksiji

**18:00** Srdjan Verstovšek: Optimal diagnostic approach to a patient with suspected mastocitosis. What are therapeutic consequences?

**18:30** RAZPRAVA

# NAPOVEDNI MODEL ZA OPREDELITEV ALERGIJSKE REAKCIJE PO PONOVNEM PIKU PRI ČEBELARJIH, NJIHOVIH KRVNIH SORODNIKI IN DRUŽINSKIH ČLANIH Z ALERGIJO ZA STRUP KOŽEKRIKCEV – PRIKAZ PROTOKOLA

Tanja Carli<sup>1</sup>, Andreja Kukec<sup>1,2</sup>, Mitja Košnik<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Nacionalni inštitut za javno zdravje

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

<sup>3</sup>Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

## OZADJE

Piki žuželk iz reda kožekrilcev (*Hymenoptera*) so pogosti, a za zdrave (nealergične) osebe načeloma niso nevarni. V večini primerov gre za lokalne reakcije (bolečina, rdečina in oteklina omejena na mesto pika), ki so prehodne (izzvenijo znotraj 24 ur) in so normalna posledica vazoaktivnega in vnetnega delovanja nekaterih sestavin strupa. Pri osebah z alergijo za strup kožekrilcev se po ponovnem piku lahko razvije težja oblika lokalne reakcije, tj. velika lokalna reakcija (VLR) ali sistemska alergijska reakcija (SAR) različnih stopenj, lahko tudi življenje ogrožajoča anafilaksija. V Severni in Centralni Evropi so alergijske reakcije (AR) po piku kožekrilcev večinoma posledica pikov čebel (*Apis Mellifera*) in os (*Vespula spp.*), redkeje papirnih os (*Polistes spp.*) in sršena (*Vespa spp.*).

Čebelarji, njihovi krvni sorodniki in družinski člani imajo visoko tveganje za razvoj alergije za strup kožekrilcev, ker je izpostavljenost in s tem povezano število pikov večja v primerjavi s splošno populacijo. Izsledki evropskih epidemioloških raziskav kažejo, da sta prevalenca za VLR in SAR pri čebelarjih znatno višji (VLR: 9 % - 76,5 %; SAR: 4,4 % - 43 %) v primerjavi s splošno populacijo odraslih (VLR: 2,4 % - 26,4 %; SAR: 0,9 % - 8,9 %). Primeri hudih SAR, vključno z anafilaksijo, so opisani tudi pri krvnih sorodnikih in družinskih članih čebelarjev. Največkrat imajo

bolniki s SAR po ponovnem pikju sicer podobne ali blažje težave, redkeje je reakcija hujša. Če bolnika piči več kožekrilcev v krajšem časovnem obdobju (npr. v času pregleda čebeljih družin) je verjetnost težje reakcije. Tisti, ki so SAR preživeli zato živijo v nenehnem strahu pred vnovičnim pikom in s tem povezanimi tveganji za neugoden zdravstveni izid, kar pomembno vpliva na kakovost njihovega življenja. V slovenskem prostoru je to še posebej pomembno, saj je čebelarjenje del naše bogate zgodovine in kulturne dediščine. Trenutno je v Sloveniji več kot 10.000 registriranih čebelarjev, ki posedujejo več kot 200.000 čebeljih družin. Po našem vedenju, podatkov o alergijah za strupe kožekrilcev med slovensko populacijo čebelarjev, njihovih krvnih sorodnikov in družinskih članov ni.

Pri vseh bolnikih z anamnezo SAR (opcijsko tudi pri tistih z anamnezo VLR) po pikju kožekrilca je potrebno izvesti diagnostično testiranje. Pri tem prihaja včasih do neujemanja med rezultati diagnostičnih testov in anamnestičnimi podatki, kar otežuje diagnostični postopek in s tem pravilno izbiro strupa za bolnika, ki je kandidat za specifično imunoterapijo (SIT) s strupi kožekrilcev. Možni posledici sta tako pre-diagnosticiranje in s tem povezani visoki stroški zdravljenja ali pod-diagnosticiranje in s tem neustrezno zdravljenje ter tveganje za resno AR po pikju kožekrilca. To je zlasti pomembno za poklicne čebelarje, ki so za doseganje dohodka iz naslova čebelarstva primorani nadaljevati s svojo dejavnostjo kljub tveganju za življenjsko nevarne dogodke v primeru ponovnega pika kožekrilca.

## **NAMEN**

Razviti napovedni model za opredelitev AR po ponovnem pikju pri čebelarjih, njihovih krvnih sorodnikih in družinskih članih z alergijo za strup kožekrilcev.

## **CILJI. 1**

Pri opazovanih skupinah (čebelarji, njihovi krvni sorodniki in družinski člani z alergijo za strup kožekrilcev) določiti epidemiološke, klinične in imunološke parametre ter odgovor na SIT. **2.** Za opazovane skupine (čebelarji, njihovi krvni sorodniki in družinski člani z alergijo za strup kožekrilcev) izdelati vprašalnik in kazalnik izpostavljenosti ter ju uporabiti kot orodji v diagnostičnemu postopku napovedi AR po ponovnem piku kožekrilca.

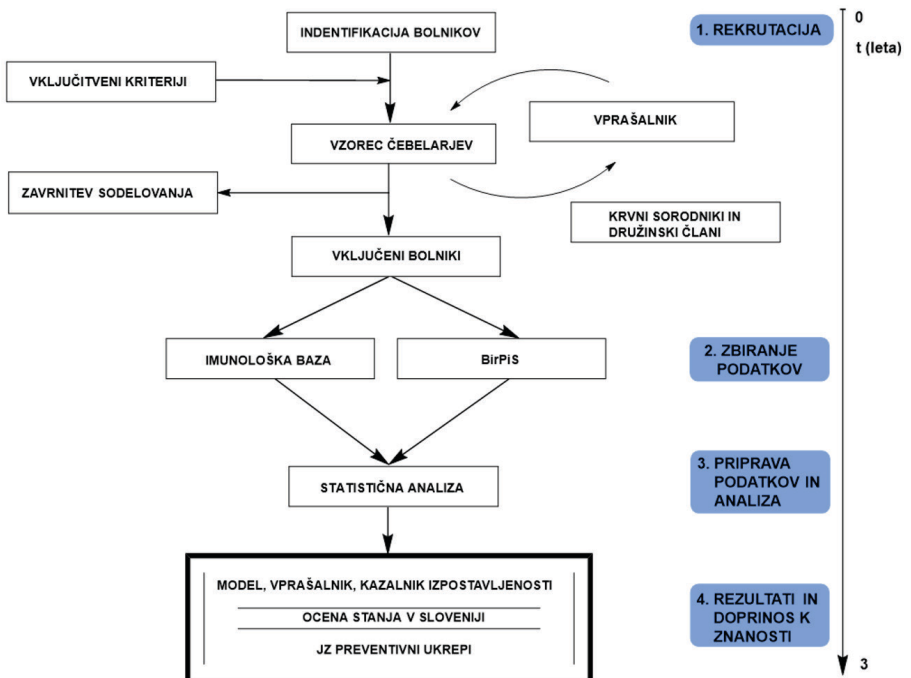
## **HIPOTEZE. 1**

Opazovane skupine (čebelarji, njihovi krvni sorodniki in družinski člani z alergijo za strup kožekrilcev) se statistično značilno razlikujejo v epidemioloških, kliničnih in imunoloških parametrih ter v odgovoru na SIT. **2.** Neposredni dejavnik tveganja pri opazovanih skupinah (čebelarji, njihovi krvni sorodniki in družinski člani) napoveduje, da blaga prva SAR po piku kožekrilca napoveduje blago SAR v primeru ponovnega pika. **3.** Kombinacija dejavnikov tveganja (epidemiološki, klinični in imunološki) pri opazovanih skupinah (čebelarji, njihovi krvni sorodniki in družinski člani z alergijo za strup kožekrilcev) napoveduje njihovo nagnjenost k težki SAR (stopnja III-IV po Muellerju) v primeru ponovnega pika.

## **ZASNOVA RAZISKAVE IN METODE**

V retrospektivno kohortno raziskavo bomo vključili čebelarje, njihove krvne sorodnike in družinske člane z anamnezo alergijske reakcije za strup kožekrilcev (opazovane skupine), ki so bili obravnavani na Univerzitetni kliniki Golnik med leti 2005 in 2020, ne glede na to ali so bili zdravljeni s SIT ali ne. Bolnike (čebelarje) bomo identificirali iz imunološke baze laboratorija za klinično imunologijo in molekularno genetiko Univerzitetne klinike Golnik na podlagi vključitvenih kriterijev. Z namenom pridobitve epidemioloških podatkov bomo izdelali vprašalnik in ga poslali na naslov bolnikovega stalnega prebivališča. Iz vrnjenih vprašalnikov bomo identificirali bolnikove krvne sorodnike oz. družinske člane, jim poslali

vprašalnik in jih v primeru privolitve v sodelovanje vključili v končni vzorec. Na podlagi dolge časovne vrste epidemioloških podatkov bomo izdelali kazalnik izpostavljenosti, z multivariatno analizo povezanosti med opazovanim izidom in izpostavljenostjo, standardizirano na potencialne moteče dejavnike tveganja, pa ocenili velikost učinka posameznega dejavnika. Klinične in imunološke podatke vseh vključenih bolnikov bomo pridobili iz imunološke baze laboratorija za klinično imunologijo in molekularno genetiko ter bolnišničnega informacijskega sistema BirPis Univerzitetne klinike Golnik. Za analizo podatkov bomo uporabili različne statistične metode, vključno s parametričnimi in neparametričnimi testi ter uni- in multivariatnimi analizami in jih analizirali z uporabo statističnega programa SPSS verzija 25 ((SPSS Inc., Chicago, Illinois, ZDA). Pri obdelovanju in shranjevanju osebnih podatkov bomo upoštevali Splošno uredbo o varstvu podatkov - Uredba (EU) 2016/679. Raziskava je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 0120-423/2020-3, akademska raziskava) (slika 1).



Slika 1. Prikaz protokola (lasten vir).



## PRIČAKOVANI REZULTATI

Za opazovane skupine (čebelarji, njihovi krvni sorodniki in družinski člani z alergijo za strup kožekrilcev) pričakujemo, da :

- se statistično značilno razlikujejo v epidemioloških, kliničnih in imunoloških parametrih ter v odgovoru na SIT;
- da neposredni dejavnik tveganja napoveduje, da blaga prva SAR po piku kožekrilca napoveduje blago SAR v primeru ponovnega pika;
- kombinacija dejavnikov tveganja (epidemiološki, klinični, imunološki in genetski) napoveduje njihovo nagnjenost k težki SAR (stopnja III-IV po Muellerju) v primeru ponovnega pika.

Prav tako pričakujemo, da bosta vprašalnik in kazalnik izpostavljenosti z vidika dostopnosti, zanesljivosti in predvidene kontinuitete zbiranja podatkov primerni orodji za opazovanje variabilnosti opazovanega izida. Iz teh razlogov pričakujemo, da bomo z napovednim modelom za opredelitev AR po ponovnem piku izboljšali diagnostični postopek za alergijo za strupe kožekrilcev in s tem presojo o uvedbi SIT ter na tak način zmanjšali pre-oz. pod-diagnosticiranje ter pomembno doprinesli h kakovosti življenja opazovanih skupin.

## LITERATURA

1. Bilò MB, Tontini C, Martini M, Corsi A, Agolini S, Antonicelli L. Clinical aspects of hymenoptera venom allergy and venom immunotherapy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* [Internet]. oktober 2019 [citirano 14. januar 2021];(online first). Dostopno na: <http://www.eurannallergyimm.com/cont/online-first/738/reviewbrclinical-aspects-hymenoptera-venom-allergy-immunotherapy.asp?pgg=1>
2. Blank S, Haemmerle S, Jaeger T, Russkamp D, Ring J, Schmidt-Weber CB, idr. Prevalence of Hymenoptera venom allergy and sensitization in the population-representative German KORA cohort. *Allergo J Int.* 1. september 2019;28(6):183–91.
3. Čebelarska zveza Slovenije [Internet]. [citirano 23. januar 2021]. Dostopno na: <https://www.czs.si/>
4. Kosnik M, Korosec P. Hymenoptera-Induced Hypersensitivity Reactions and Anaphylaxis. V: Castells MC, urednik. *Anaphylaxis and Hypersensitivity Reactions*

[Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [citirano 11. januar 2021]. str. 209–22.  
Dostopno na: [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-951-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-951-2_12)

5. Müller UR. Bee venom allergy in beekeepers and their family members. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. avgust 2005;5(4):343–7.
6. Stanhope J, Carver S, Weinstein P. Health outcomes of beekeeping: a systematic review. *Journal of Apicultural Research*. 15. marec 2017;56(2):100–11.

# **MASTOCITOZA, VIDIK ALERGOLOGA**

*Mihaela Zidarn*

*Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik;*

*Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta*

Mastociti so ključne efektorske celice takojšnje IgE posredovane alergijske reakcije. Aktivacijo mastocitov pa lahko sprožijo še druga imunološka in vnetna stanja. Izraz mastocitoza zajema heterogeno skupino redkih klonalnih motenj, za katere je značilna proliferacija in kopičenje mastocitov v različnih organih. Ločimo indolentne in napredovale oblike. Pri otrocih je pogostejša kožna oblika mastocitoze. Večina odraslih oseb ima sistemsko mastocitozo, pri kateri so lahko prisotne kožne spremembe in je skoraj vedno prizadet kostni mozeg. Najpogostejša je indolentna sistemska mastocitoza. Posledica večjega števila mastocitov ali znižanega praga za aktivacijo mastocitov je lahko večja dovzetnost za anafilaksijo ali pa hujša klinična slika. Alergologi se najpogosteje srečamo z mastocitozo za katero je značilna ekspanzija KIT p.D816V mutiranih klonov mastocitov. Pred kratkim je bila opisana dedna  $\alpha$ -triptazemija, ki je povezana s povečanim tveganjem za aktivacijo mastocitov. Največje tveganje za anafilaksijo in hudo kardiovaskularno simptomatiko povezano s sproščanjem mastocitnih mediatorjev imajo bolniki, ki imajo obe motnji. Opisan je tudi sindrom aktivacije mastocitov angl. mast cell activation syndrome (MCAS), ki vključuje bolnike z ponavljajočimi se epizodami anafilaksije, ali drugih simptomov, ki so posledica aktivacije mastocitov, vendar ne izpolnjujejo kriterijev za mastocitozo.

Poleg tipičnih kožnih sprememb se mastocitoza lahko kaže s srbežem, urikarijo, angioedemom, rdečico, slabostjo, bruhanjem in osteopenijo ali osteoporozo.

Anafilaksija je pogosto je prva manifestacija bolezni, ob tem bolniki največkrat nimajo drugih simptomov in znakov bolezni. Pogostnost

anafilaksije v splošni populaciji je ocenjena na do 2%. Pri bolnikih z mastocitozo pa je ocenjena pogostnost med 22 in 49%.

Raziskave s področja preobčutljivosti za strupe kožekrilcev so pokazale, da imajo bolniki z anafilaksijo po piku kožekrilca pogosteje mastocitozo. Največkrat gre za indolentno sistemsko mastocitozo, podvrsto pri kateri je prizadet le kostni mozeg brez kožnih lezij ali infiltracije drugih organov. Velja pa tudi obratno, pri bolnikih z mastocitozo so piki kožekrilcev najbolj pogost sprožilec anafilaksije, redkeje jo sprožijo zdravila in hrana.

Radko pri bolnikih z mastocitno motnjo in anafilaksijo po piku kožekrilca ne moremo potrditi IgE posredovanje preobčutljivosti za strup kožekrilce. Takšnih bolnikov ne moremo zdraviti z imunoterapijo. Pri večini bolnikov pa dokažemo senzibilizacijo. Bolniki za mastocitno motnjo imajo več zapletov med izvajanjem imunoterapije, predvsem pri hitrih uvodnih shemah. Kljub temu je imunoterapija tudi pri teh bolnikih varna in učinkovita. Za splošno populacijo velja, da je imunoterapija učinkovita pri 80-95% zdravljenih bolnikov, če traja zdravljenje od 3 do 5 let. Pri bolnikih z mastocitno motnjo so relapsi pogostejši, zaradi tega smernice priporočajo trajno imunoterapijo. Na splošno velja, da bolniki, ki dobro prenašajo imunoterapijo med in po zdravljenju ne potrebujejo več samoinjektorja adrenalina. Bolnikom z mastocitozo pa priporočamo, da imajo vedno pri sebi dva odmerja adrenalina v samoinjektorju.

Kot presejalni testa za iskanje mastocitoze pri bolnikih z anafilaksijo po pikih kožekrilcev smo do sedaj uporabljali merjenje bazalne triptaze in REMA score, ki poleg bazalne triptaze vključuje tudi klinične podatke. Na možnost mastocitne motnje kaže anafilaksija, ki se začne zelo kmalu po piku kožekrilca in poteka s kolapsom ali pomembnim padcem krvnega tlaka ter brez kožne simptomatike. Nedavna raziskava, ki jo je opravil Šelb s sodelavci, pa je pokazala, da je smiselno presejalno testiranje z genetsko preiskavo s katero lahko v vzorcu periferne krvi določimo mutacijo KIT p.D816V z metodo qPCR. Izkazalo se je, da je vzrok

povišane bazalne triptaze pri bolnikih za alergijo za strup kožekrilcev pogosteje hereditarna  $\alpha$ -tryptasemija kot pa mastocitoza. Po drugi strani pa ima večina (74%) bolnikov z mutacijo KIT p.D816V normalno vrednost bazalne triptaze. Prisotnost mutacije je pogosta predvsem pri osebah s IV. stopnjo sistemske preobčutljivostne reakcije po Mullerjevi lestvici. Glede na rezultate te raziskave predvidevamo, da bomo v bodoče kot presejalno preiskavo za motnje mastocitov poleg bazalne triptaze uporabljali tudi določanje KIT p.D816V z metodo qPCR. Ni pa še jasno, kateri bolniki s pozitivno KIT p.D816V mutacijo potrebujejo tudi hematološko obravnavo, ki vključuje biopsijo kostnega mozga. Pri večini bolnikov z mastocitozo je bolezen stabilna, le pri majhnem deležu pride do progresije v bolj napredovale oblike bolezni, ki lahko povzroči okvaro organov. Večina bolnikov ima normalno pričakovano življenjsko dobo. Evropska mreža za mastocitozo angl. European Competence Network on Mastocytosis (ECNM) je opredelila nekaj prognostičnih dejavnikov pri bolnikih s kožno in različnimi oblikami indolentne mastocitozo, niso pa jasno opredelili pri katerih bolnikih je potrebna biopsija kostnega mozga.

Bolniki z motnjami v delovanju mastocitov so tudi bolj ogroženi za perioperativno in idiopatsko anafilaksijo. Na področju mastocitoze in preobčutljivosti za zdravila je podatkov manj. Priporoča se, da se pri anesteziji ne uporablja zdravil, ki sprožijo sproščanje mediatorjev iz mastocitov kot so opiat in mišični relaksanti. Vekuronij, pankuronij in cisatrakurij naj ne bi povzročali nespecifične aktivacije mastocitov in na splošno redkeje povzročajo anafilaksijo. Namesto morfinov se predlaga uporabo fentanila in sorodnih zdravil. Možni sprožilec anafilaksije so tudi radiokontrastna sredstva. Pomembno je, da je pri vsaki presikavi z radiokontrastnimi sredstvi prisoten tim, ki lahko prepozna in zdravi anafilaksijo

## VIRI

1. Trizuljak J, Sperr RW, Nekvindoova L et al. Clinical features and survival of patients with indolent systemic mastocytosis *Allergy*.2020;75:1927-1938
2. Greiner G, Sprinzl B, Górska A, et al. Hereditary alpha tryptasemia is a valid genetic biomarker for severe mediator-related symptoms in mastocytosis. *Blood*. 2020.
3. doi:10.1182/blood.2020006157
4. Valent P, Akin C, et al. Diagnosis, Classification and Management of mast cell activation syndromes. *Int.J.Med.Sci* 2020,23,9030.
5. Bonadonna P, Lombardo C, Zanotti R. Mastocytosis nad allergic diseases. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2014; Vol. 24(5): 288-297.
6. Selb J, Rijavec M, Erzen R, et al. Routine KIT p.D816V screening identifies clonal mast cell disease in Hymenoptera allergic patients regularly missed using baseline tryptase levels alone. *JACI* in press

# OSTEOPOROZA PRI BOLNIKIH Z MASTOCITOZO

*Tomaž Kocjan*

*Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

*Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta*

Mastocitoze so redka skupina bolezni s kopičenjem mastocitov v različnih tkivih. Pri otrocih je najpogostejša kožna mastocitoza, pri odraslih pa prevladuje sistemska mastocitoza (SM) s prizadetostjo drugih organov in tkiv z ali brez prizadetosti kože.

## KLINIČNE ZNAČILNOSTI Z VIDIKA KOSTI

Kostna prizadetost je ena najpogostejših manifestacij SM pri odraslih. Bolniki imajo lahko nejasno lokalizirane, včasih tudi zelo moteče, bolečine v kosteh, difuzno osteopenijo ali osteoporozo z zlomi zaradi krhkosti kosti, patološke zlome zaradi lokalne osteolize, redkeje difuzno ali lokalno osteosklerozo. Lokalna osteolitična in osteosklerotična žarišča so včasih prisotna tudi istočasno. Točna prevalenca osteoporoze pri SM ni znana, verjetno pa se giblje med 10-15% pri bolnicah in med 30-35% pri bolnikih. Večina raziskav potrjuje domnevo, da je nizka mineralna kostna gostota (MKG) enako pogosta pri SM s kožno prizadetostjo, kot brez nje. V podskupini bolnikov z indolentno SM brez anafilaksije pa je verjetno več osteoporoze. Vse to govori v prid domnevi, da je lahko osteoporozo edina manifestacija SM, ta pa večkrat ostane skrita. Incidenca SM pri idiopatski osteoporozni ni znana.

Bolj je prizadeta trabekularna, kot pa kortikalna kost, zato se najpogosteje pojavljajo (multipli) zlomi vretenc, in sicer tudi v vratnem predelu, kar pri drugih oblikah osteoporoze ni običajno. V večji presečni raziskavi je imelo vsaj en zlom vretenca 20% bolnikov in 14% bolnic s SM. Zlomi vretenc so tipično bikonkavne oblike. Redkeje pride do nevretenčnih zlomov, vključno z zlomi kolka. Prepoznani dejavniki tveganja za zlom pri SM so

moški spol, visoke vrednosti C-terminalnih telopeptidov kolagena tipa I (CTX) v serumu, vnos alkohola, višja starost in višje vrednosti metilhistamina v urinu. Poročali so tudi, da imajo bolniki s SM brez pigmentne urtikarije večje tveganje za osteoporozne zlome. Vrednost triptaze v serumu ni zelo uporaben kazalec kostne prizadetosti. Bistveno bolje napove zlome triptaza v kostnem mozgu. Pri agresivnih oblikah bolezni z zelo visokimi vrednostmi triptaze v serumu lahko včasih najdemo zvišano MKG in difuzno osteosklerozo. Osteosklerozna je večinoma asimptomatska, morda pa prispeva k hitremu pojavu osteoartritisa.

## **PATOGENEZA**

OsteoporozapriSMvglavnemnenastanezaradilokalneinfiltracijekostnega mozga z mastociti, pač pa zaradi lokalnega sproščanja najrazličnejših mediatorjev iz njih s posledično pospešeno kostno razgradnjo. Aktivacija mastocitov se začne v nekaj sekundah z degranulacijo in sprostitvijo v celicah shranjenih mediatorjev, kot so histamin, triptaza, proteoglikani in citokini. Čez nekaj minut sledi izločanje prostaglandinov in levkotrienov, kasneje pa še obilno sproščanje provnetnih citokinov, kot so TNF-alfa, IL-1 in IL-6, ki spodbujajo osteoklaste. Vsi ti mediatorji nastajajo tudi kronično brez jasnega sprožilca in pomembno prispevajo k nastanku osteoporoze. Ta se pojavi predvsem na presnovno aktivnejši trabekularni kosti in pri moških, verjetno zaradi hormonskih vplivov. Ključni mediator je histamin, ki neposredno spodbuja osteoklaste in pre-osteoklaste. Vpliva tudi na osteoblaste, da izločajo več RANKL (ligand za receptor aktivator jedrnega faktorja  $\kappa$ -B) in tako aktivirajo signalno pot RANK/RANKL, ki je ključna za razgradnjo kosti.

Spremenjeno kostno prenovo lahko opredelimo z merjenjem označevalcev kostne prenove v serumu. Kot označevalec kostne razgradnje uporabljamo že omenjeni CTX, za opredelitev gradnje kosti pa kostni izoencim alkalne fosfataze (S-ALP), predvsem pa N-terminal propeptida prokolagena tip I (PINP). Pomembno je vedeti, da normalne



vrednosti označevalcev kostne preнове niso zagotovilo, da bolnik s SM ne bo utrpel zloma vretenca zaradi lokalnega neravnovesja med gradnjo in razgradnjo kosti, ki ga z laboratorijskimi preiskavami ne zaznamo.

## **DIAGNOSTIKA**

Bolniku z novoodkrito SM izmerimo MKG na ledveni hrbtenici in kolku z dvoenergijsko rentgensko absorpciometrijo (DXA; angl. *dual energy X-ray absorptiometry*). Pri pomenopavznih ženskah in moških nad 50 let diagnozo postavimo s pomočjo T-vrednosti, pri mlajših pa uporabimo Z-vrednosti. Občutljivost in specifičnost DXA za napoved zlomov je zaradi možnosti lokalne prizadetosti kosti pri SM omejena in približno polovica bolnikov z zlomi ima normalne vrednosti MKG. Če ugotovimo osteoporozo, je dobro izključiti tudi njene druge sekundarne vzroke z običajnimi preiskavami (hemogram, kalcij, fosfat, kreatinin, AF, AST, ALT, TSH, eventualno proteinogram in celokupni testosteron). Vedno napravimo izhodno rentgensko slikanje celotne hrbtenice za prikaz klinično nemih zlomov vretenc. Ponekod lahko v ta namen uporabimo kar DXA z ustrezno nadgradnjo. Večina ekspertov priporoča tudi rutinsko določanje označevalcev kostne preнове. Visoke vrednosti CTX ob odkritju SM namreč negativno korelirajo s spremembami MKG v naslednjih nekaj letih. Znatno zvišane vrednosti označevalcev so lahko pokazatelj pomembne kostne prizadetosti v sklopu SM. Scintigrafija skeleta prikaže asimptomatska lokalna žarišča v kosteh, ki jih dodatno opredeli usmerjeno rentgensko slikanje. Razmik med kontrolnimi DXA prilagodimo bolniku, načelno pa velja, da pri osteoporozi preiskavo ponavljamo na eno do dve leti, pri osteopeniji pa na dve do tri.

## **ZDRAVLJENJE**

Nefarmakološki ukrepi za zaščito kosti vključujejo zdrav življenjski slog brez pretiranega vnosa alkohola in kajenja, prehrano, bogato s kalcijem in beljakovinami, ter redno telesno vadbo. Ženskam nad 50 let, in moškim nad 70 let, priporočamo uživanje 1200 mg kalcija dnevno,

mlajšim pa 1000 mg dnevno. Najbolje je, da predpisano dnevno količino kalcija zaužijejo s hrano, dodatki so rezervna možnost. Pri bolnikih s SM so dokazali visoko prevalenco pomanjkanja vitamina D, zato svetujemo dodajanje. Pri tem smo še posebej dosledni, če se bolniki že zdravijo z zdravili za osteoporozo. V prvem mesecu zdravljenja zapolnimo zaloge vitamina D s holekalciferolom (vitamin D3) v odmerku 2.000 E (50 µg) dnevno ali 14.000 E tedensko (Plivit D3 10 kapljic dnevno oziroma 70 kapljic enkrat tedensko ali Oleovit D3 v polovičnem odmerku). Nadaljujemo z vzdrževalnim odmerkom holekalciferola 800–1.000 E dnevno ali 5.600–7.000 E tedensko. Dvakrat ali trikrat večje vzdrževalne dnevne odmerke vitamina D potrebujejo vsi z indeksom telesne mase (ITM) nad 30 kg/m<sup>2</sup> in bolniki, ki jemljejo antiepileptike, glukokortikoide ali zdravila proti HIV.

Glavni mehanizem kostne prizadetosti pri SM je relativna ali absolutna prevlada kostne razgradnje, zato za zdravljenje v prvi vrsti uporabljamo zaviralce kostne razgradnje, predvsem bisfosfonate. Z denosumabom je zaenkrat v tej populaciji le malo kliničnih izkušenj, čeprav je zaradi direktne zavore sistema RANK/RANKL vsaj teoretično odlična izbira. Raziskave zaenkrat niso potrdile, da bisfosfonati pri bolnikih s SM zmanjšajo tveganje za zlome, dokazano pa izboljšajo MKG in normalizirajo označevalce kostne prenove v serumu. Značilne difuzne bolečine v kosteh lahko po uvedbi zdravljenja hitro izginejo.

Če bolniki s SM in osteoporozo še niso utrpeli zlomov, bisfosfonate odmerjamo enako, kot pri pomenopavzni osteoporozni. Alendronat in risedronat sta izključno peroralna bisfosfonata, ibandronat pa lahko dajemo v obliki enkratmesečne tablete ali injekcije vsake tri mesece. Ker imajo bolniki s SM pogosto težave z zgornjimi prebavili, je dobra izbira zoledronska kislina v odmerku 5 mg, ki jo apliciramo v obliki kratke infuzije enkrat letno. Če gre za bolj agresivno SM z zlomi, interval med aplikacijami skrajšamo in dajemo 4 mg i.v. vsake 4 tedne, podobno kot pri plazmocitomu. V takih primerih je smiselno dodati še interferon α, ki ima sinergistične učinke z bisfosfonati, ali pa kladribin, če so bolniki na

interferon refraktarni. Zaščitne učinke na kost pri SM imajo morda tudi blokatorji receptorjev H1 in H2, medtem ko podatkov o tovrstnem vplivu zaviralcev tirozinske kinaze še nimamo.

## **PRIPOROČENA LITERATURA**

1. Van der Veer E, van der Goot W, de Monchy JG, Kluin-Nelemans HC, van Doormaal JJ. High prevalence of fractures and osteoporosis in patients with indolent systemic mastocytosis. *Allergy*. 2012; 67:431-8.
2. Rossini M, Zanotti R, Orsolini G, Tripi G, Viapiana O, Idolazzi L, et al. Prevalence, pathogenesis, and treatment options for mastocytosis-related osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2016; 27:2411-21.
3. Orsolini G, Viapiana O, Rossini M, Bonifacio M, Zanotti R. Bone Disease in Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018; 38:443-454.
4. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y, Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2019; 30:3–44.
5. Kocjan T, Preželj J, Pfeifer M, Sever MJ, Čokolič M, Zavratnik A. Guidelines for the detection and treatment of osteoporosis. *Zdr Vestn* 2013; 82:207–217.

# **MASTOCITOZA: PATOMORFOLOŠKA DIAGNOSTIKA**

*Gorana Gašljević*

*Oddelek za patologijo, Onkološki inštitut Ljubljana*

## **UVOD**

Mastocitoza je klonalna, neoplastična proliferacija mastocitov, ki se kopičijo v enem ali več organskih sistemih. Za bolezen so značilni infiltrati atipičnih mastocitov v obliki multifokalnih kompaktnih skupkov ali kohezivnih agregatov. Bolezen je klinično heterogena, poteka lahko le s pojavom kožnih sprememb, ki spontano regresirajo do visoko agresivnih oblik z multiorgansko odpovedjo in slabim preživetjem. Za potrditev diagnoze je nujna histopatološka preiskava.

Razlikujemo več tipov (variant) mastocitoze, ki jih ločimo na podlagi klinične slike, distribucije sprememb in histopatoloških preiskav.

### **Kožna mastocitoza**

- Urticaria pigmentosa/makulopapularna kožna mastocitoza
- Difuzna kožna mastocitoza
- Kožni mastocitom

### **Sistemska mastocitoza**

- Indoletna sistemska mastocitoza\* (vključno z mastocitozo v kostnem mozgu)
- Tleča sistemska mastocitoza\*
- Sistemska mastocitoza povezana z drugo hematološko neoplazmo\*
- Agresivna sistemska mastocitoza\*
- Mastocitna levkemija

### **Mastocitni sarkom**

- \*Diagnoza teh variant zahteva informacije glede obstoja kriterijev skupine »B« in »C« (v nadaljevanju teksta) za katere ni nujno, da so prisotni pri prvotni diagnozi.

## **PRIZADETI ORGANI**

Pri kožni mastocitozi je mastocitni infiltrat omejen na kožo, pri sistemskih oblikah bolezni pa je prizadet vsaj en ekstrakutani organ z ali brez prisotnih kožnih lezij. Infiltracija je lahko prisotna v kateremkoli organu, vendar pogosteje v vranici, bezgavkah, jetrih in sluznici prebavnega trakta. Približno 80% pacientov z mastocitozo ima prizadeto kožo. Pri sistemski mastocitozi je praktično vedno prizadet kostni mozeg, zato so morfološke in molekularne preiskave kostnega mozga pri odraslih pacientih nujne za potrditev oz. izključitev diagnoze. Redko bolezen poteka kot mastocitna levkemija, kjer v periferni krvi najdemo veliko količino cirkulirajočih atipičnih mastocitov.

## **HISTOPATOLOŠKA DIAGNOZA**

Normalni mastociti so celice z okroglim do ovalnim jedrom, kondenziranim kromatinom, brez nukleolov in z obilno citoplazmo polno metakromatičnih granul, dobro vidnih predvsem v barvanjih po Giemsi, s toluidinskim modrilom ali po Romanowskem. V H&E barvanju so granule komaj vidne. Mastociti so pozitivni na citokemično barvanje na naftol kloracetat esterazo, ne izražajo pa mieloperoksidaze. Imunohistokemične preiskave olajšajo prepoznavo mastocitov, še posebej v primerih, ko so izrazito hipogranulirani. Prav tako olajšajo najdbo manjših kompaktnih agregatov, ki jih v histokemičnih barvanjih lahko spregledamo in omogočijo prepoznavo neoplastičnih mastocitov (aberantna ekspresija CD25 in/ali CD2). Normalni/reaktivni in neoplastični mastociti izražajo KIT (CD117) in večina tudi triptazo (pri približno 1-5% pacientov je lahko triptaza negativna).

Za diagnozo mastocitoze morajo v biopsiji biti prisotni kohezivni agregati ali strnjene skupke mastocitov. Difuzni, razrahljani intersticijski infiltrati niso patognomonični, saj se lahko pojavijo tudi pri reaktivni hiperplaziji mastocitov. Pri mastocitozah so mastociti praviloma atipični (vretenastocelični, s hipogranulirano citoplazmo). Pri visoko-malignih mastocitozah so citološke atipije izrazitejše, lahko se pojavijo celice z

bilobiranim ali multilobuliranim jedrom (promastociti) ali metakromatični blasti, značilni za mastocitno levkemijo. Le pri redkih bolnikih s sistemsko mastocitozo so mastociti dobro diferencirani, brez atipij in brez aberantne ekspresije CD25.

Mastociti lahko aberantno izražajo številne hematopoetske antigene (mielomonocitne, limfoidne, dendritične, histiocitne...), zaradi česar lahko mastocitozo zamenjamo za katero drugo hematopoetsko neoplazmo. Pri manjšem deležu mastocitov mastociti izražajo CD30, kar pri agresivnih oblikah bolezni omogoča zdravljenje z anti-CD30 protitelesi.

## **KOŽNA MASTOCITOZA**

Diagnostični kriteriji:

1. Kožne lezije s tipično klinično sliko urtikarije pigmentose/makulopapularne kutane mastocitoze, difuzne kutane mastocitoze ali solitarnega mastocitoma
2. Histološko potrjeni gosti infiltrati (fokalni/multifokalni ali difuzni) v reprezentativnem odvzemku kože
3. Odsotnost kriterijev za sistemsko mastocitozo.

Histopatološki pregled kože v urtikariji pigmentozi tipično pokaže agregate vretenastoceličnih mastocitov, ki izpolnjujejo papilarni dermis in se v skupkih razširjajo v retikularni dermis, pogosto periadneksalno in perivaskularno. Pri odraslih je količina mastocitov v infiltratih praviloma manjša kot pri otrocih, podobna kot v reaktivnih hiperplazijah pri vnetnih dermatozah. Za potrditev diagnoze so zato včasih potrebne večkratne biopsije z imunohistokemično analizo. V difuzni kožni mastocitozi, ki se pojavlja izključno pri otrocih, v biopsiji običajno najdemo pasaste infiltrate mastocitov v papilarnem in retikularnem dermisu. Pri kožnem mastocitomu, ki se prav tako pojavlja izključno pri otrocih, je prisoten gost infiltrat mastocitov zrelega videza, ki se lahko širi tudi v podkožno maščevje. Citoloških atipij ni in to je glavni kriterij, ki omogoča razlikovanje

med kožnim mastocitomom in zelo redkim kožnim mastocitnim sarkomom

## **SISTEMSKA MASTOCITOZA**

Diagnozo sistemske mastocitoze lahko postavimo, ko sta izpolnjena **major kriterij in vsaj 1 minor kriterij ali  $\geq 3$  minor kriteriji**.

### **Major kriterij:**

Multifokalni gosti infiltrati mastocitov ( $\geq 15$  mastocitov v agregatih) v kostnem mozgu in/ali drugih ekstrakutanih organih.

### **Minor kriteriji:**

1. V biopsiji kostnega mozga ali drugega ekstrakutanelega organa:
  - >25% mastocitov v infiltratih je vretenastoceličnih (atipičnih) ali
  - >25% mastocitov v aspiratu kostnega mozga je nezrelih ali atipičnih
2. potrjena *KIT* mutacija kodona 816 (*KIT* D816V) v kostnem mozgu, periferni krvi ali drugem ekstrakutanem organu
3. Mastociti v kostnem mozgu, krvi ali drugih ekstrakutanih organih izražajo CD25 in/ali CD2
4. Serumska triptaza >20 ng/mL razen v primerih, ko obstaja pridružena mieloična neoplazma (v teh primerih parameter ni veljaven).

### **Dodatni kriteriji potrebni za opredelitev raličnih variant sistemske mastocitoze:**

#### **B (»Burden of disease«) najdb:**

1. Veliko mastocitno breme (določeno na biopsiji kostnega mozga):
  - >30% infiltracija z mastociti in serumska triptaza >200 ng/mL

2. Znaki displazije ali mieloproliferacije v ne-mastocitnih celicah vendar brez doseženih kriterijev za diagnozo pridružene hematološke neoplazme, brez večjih odstopanj v KKS in DKS
3. Hepatomegalija z ohranjeno jetrno funkcijo, palpabilna splenomegalija brez hipersplenizma in/ali limfadenopatija (klinično ali z radiološkimi metodami)

### **C (»Cytoreduction-requiring«) najdbe:**

1. Disfunkcija kostnega mozga povzročena z mastocitnimi infiltrati, ki se kaže kot  $\geq 1$  citopenija (Neu  $< 1 \times 10^9$ ; Hb  $< 100$  g/L; Trc  $< 100 \times 10^9$ )
2. Palpabilna hepatomegalija z izpadom jetrne funkcije, ascitesom in/aliprisotno portalno hipertenzijo
3. Prizadetost skeleta z velikimi osteolitičnimi lezijami z ali brez patoloških fraktur (!!!patološke frakture, ki so posledica osteoporoze ne štejejo v »C« najdbe)
4. Palpabilna splenomegalija s hipersplenizmom
5. Malapsorpcija z izgubo teže zaradi mastocitnih infiltratov v prebavnem traktu.

**Sistemska mastocitoza** se lahko kaže v **6-ih** različnih **kliničnih variantah**. Pri vsaki od njih morajo biti poleg kriterijev za sistemsko mastocitozo izpolnjeni še naslednji pogoji:

#### **1. Indolentna sistemska mastocitoza**

Odsotnost najdb »C«

Ni pridružene hematološke neoplazme

Majhno mastocitno breme (low mast cell burden)

Kožne lezije so skoraj vedno prisotne



## **2. Mastocitoza kostnega mozga**

Isto kot indolentna sistemska mastocitoza s prizadetostjo kostnega mozga vendar brez kožne prizadetosti

## **3. Tleča sistemska mastocitoza**

Obstoj  $\geq 2$  »B« najdb vendar brez »C« najdb

Ni pridružene hematološke neoplazme

Veliko mastocitno breme (high mast cell burden)

Ni kriterijev za mastocitno levkemijo

## **4. Sistemska mastocitoza s pridruženo hematološko neoplazmo**

Obstoj druge hematološke neoplazme (MDS, MPN, AML, limfoma... po kriterijih WHO klasifikacije)

## **5. Agresivna sistemska mastocitoza**

$\geq 1$  »C« najdba

Ni kriterijev za mastocitno levkemijo

Ponavadi ni kožnih lezij

## **6. Mastocitna levkemija**

V biopsiji kostnega mozga so prisotni difuzni (ponavadi gostocelični) infiltrati z atipičnimi, nezrelimi mastociti

V aspiratih kostnega mozga je  $\geq 20\%$  mastocitov

V klasičnih primerih je v periferni krvi  $\geq 10\%$  mastocitov vendar so bolj pogoste ti. alevkemične variante z  $< 10\%$  cirkulirajočih mastocitov

Ponavadi ni kožnih lezij.

Histopatološki pregled kostnega mozga v sistemske mastocitozi lahko pokaže obstoj strnjenih, gostih infiltratov zgrajenih iz atipičnih mastocitov (major kriterij), ki jih pogosto spremlja reaktivna limfatična populacija B in T limfocitov. Agregati so lahko intersticijski, peritrabekularni in/ali perivaskularni. Kompaktni agregati niso nujno prisotni pri vseh pacientih

pri katerih klinično obstaja sum na obstoj mastocitoze. Zato se za potrebe diagnoze sistemske mastocitoze vpoštevajo major in minor kriteriji.

V agresivni sistemski mastocitozi je delež mastocitov v kostnem mozgu zvišan vendar <20% celotne nukleirane celične populacije v kostnem mozgu. Če je delež >5%, govorimo o agresivni sistemski mastocitozi v transformaciji. Pri takih pacientih je pogosta progresija v mastocitno levkemijo v kateri je v kostnem mozgu >20% atipičnih, nezrelih mastocitov (najpogosteje okroglaste oblike). V mastocitni levkemiji pri kateri je prognoza slaba, so dokaj pogoste *KIT* mutacije v non-D816V lokusih (!!!sekvenciranje). V primerih, ko so mastociti bolj zrelega videza in ni »C« najdb (indikativne za hipofunkcijo posameznih organov), govorimo o kronični mastocitni levkemiji.

Mastocitni sarkom je izrazito redek. Gre za lokalno destruktivnen tumor zgrajen iz zelo atipičnih celic čigar narava se pokaže šele z imunohistokemičnimi barvanji. Najpogosteje so opisani v grlu, debelem črevesu, meningah, kosteh in koži. V svojih začetnih fazah je bolezen lokalizirana vendar zelo hitro pride do razsoja in terminalne faze, ki je podobna mastocitni levkemiji.

## LITERATURA

1. Horny HP, Akin C, Arber DA et al: Mastocytosis. In: Swerdlow SH et al (Editors) WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, IARC, Lyon, 2017
2. Horny HP, Sotlar K, Valant P: Mastocytosis: Immunophenotypical Features of the Transformed Mast Cells Are Unique Among Hematopoietic Cells. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2014 May; 34(2): 315–321.
3. Teodosio C, Mayado A, Sanchez-Muñoz L et al: The immunophenotype of mast cells and its utility in the diagnostic work-up of systemic mastocytosis. *Mechanisms of allergy and clinical immunology* 2010; 125:719-726.
4. Teodosio C, García-Montero AC, Jara-Acevedo M et al: Mast cells from different molecular and prognostic subtypes of systemic mastocytosis display distinct immunophenotypes

# **c-KIT RAZLIČICE – KAKŠEN JE NJIHOV POMEN IN KJE JIH NAJDEMO?**

*Helena Podgornik*

*Klinični oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana*

Če naj razložimo vlogo različic v genu *c-KIT*, moramo najprej razumeti nekaj osnovnih značilnosti zgradbe gena ter proteina, ki ga ta zapisuje in kakšne so spremembe, ki jih mutacije v tem genu povzročijo.

*c-KIT*, ki ga poznamo tudi pod imenom CD117, je transmembranski protein s tirozin kinazno aktivnostjo. Ligand receptorja *c-KIT* je citokin dejavnik matičnih celic (SCF). Vezava SCT na *c-KIT* povzroči homologno dimerizacijo in sproži intracelularno signalizacijo. Izločajo ga fibroblasti in endotelijske celice povsod v telesu (1, 2). SCT najdemo v dveh oblikah: kot membransko vezanega in topnega. Obe obliki, topna in membranska, imata domeno, ki se veže na ekstracelularno domeno *c-KIT*. Pri tem nastane dimer, ki preko fosforilacije intracelularne domene povzroči intrinzično tirozin kinazno aktivnost. Ta sproži signalizacijo preko poti MAPK/ERK, PI3K/AKT, JAK/STAT ter še nekaterih drugih, ki so vpletene v regulacijo številnih celičnih procesov, kot so razmnoževanje, preživetje, apoptoza, adhezija in angiogeneza (3).

## **IZRAŽANJE RECEPTORJA C-KIT**

Normalno delujoči *c-KIT* je torej vpleten v številne pomembne celične procese. Izražajo ga hematopoetske matične celice (1-4% celic kostnega mozga ter 60-75% CD34+ celic), med diferenciranimi hematopoetskimi celicami pa mastociti ter dendritične celice. Kot mitogen je pomemben za normalni razvoj melanocitov, zato njegovo normalno delovanje pogojuje pravilno pigmentacijo. Dve tretjini zarodnih celic in spermijev izraža *c-KIT*, ki tako regulira oogenezo in spermatogenezo. *C-KIT* izražajo tudi Cajalove intersticijske celice prebavnega traku, ki so odgovorne za normalno delovanje peristaltike. Izraža se v nevroproliferativnih področjih možganov odraslega in omogoča migracijo zarodnih nevronskega

celic na območja poškodb. Njegova vloga je zelo pomembna tudi v kardiovaskularnem sistemu tako v normalnih kot patoloških okoliščinah, receptor namreč izražajo številne celice tega sistema. Novejše študije so pokazale, da c-KIT vzdržuje tudi integriteto pljučnega tkiva (1, 2).

## **ZGRADBA GENA IN PROTEINA**

Gen *c-KIT*, ki zapisuje transmembranski receptor enakega imena, sestavlja 21 eksonov v skupni dolžini 90 kb. Nahaja se na kromosomskem področju 4q11-12, njegovo izražanje regulirajo transkripcijski faktorji ter miRNA. Do eksona 9 so zapisi za ekstracelularno domeno (519 aminokislin), ekson 10 zapisuje transmembransko domeno (23 aminokislin), ostali pa intracelularno domeno (433 aminokislin). Protein velikosti 145 kDa je zgrajen iz 976 aminokislin (1). Po zgradbi je c-KIT tip III tirozin kinaza, zelo podobna tako FLT3 kot receptorju za PDGFR. Za receptorje tega tipa je značilno, da imajo na ekstracelularni strani pet imunoglobulinom (Ig) podobnih domen in prisotnost 70-100 aminokislin dolge insercije v sredini intracelularne kinazne domene. SCF se veže na prve tri Ig-podobne domene, preostali dve sta ključni za dimerizacijo. 30 aminokislin dolg jukstamembranski del ima zelo pomembno regulatorno vlogo. Deluje namreč kot represor kinazne aktivnosti. Intracelularna kinazna domena je sestavljena iz dveh subdomen, ki ju prekinja 80 aminokislin dolga insercija. Največ fosforilacijskih mest, ki se pojavijo z vezavo liganda na ekstracelularnem delu, vsebujejo jukstamembranska domena, kinazna insercija in C-terminalni del proteina (1, 2).

## **MUTACIJE GENA C-KIT PRI RAKAVIH BOLEZNIH**

Kjer je c-KIT ključen za normalno delovanje tkiv, navadno najdemo tudi njegovo nastopanje v vlogi dereguliranega onkogenega. Zarodne različice, ki vodijo v izgubo funkcije, se kažejo v spremembah pigmentacije kože in las, kot gluhost ter megakolon. Nasprotno pa somatske mutacije, povezane z nastankom in razvojem raka, praviloma vodijo v pridobitev funkcije. Različice v genu *c-KIT* povzročijo od liganda SCT neodvisno

fosforilacijo intracelularne domene in konstitutivno aktivacijo. V celoti mehanizma za konstitutivno aktivacijo še ne razumemo. Aktivacijske mutacije vključujejo tako točkovne mutacije kot delecije, duplikacije in insercije. Najpogostejša področja mutacij v genu *c-KIT* so membransko področje ob dimerizacijskih regijah (eksona 8 in 9), jukstamembransko področje (ekson 11) in področje kinazne domene (ekson 17). Najpogostejša genetska različica v *c-KIT* je drugačnosmiselna mutacija, pri kateri pride do zamenjave nukleotida adenin v timin na mestu 2447 nukleotidnega zaporedja (NM\_000222.2: c.2447A>T) in posledično do zamenjave aspartata z valinom na mestu 816 (NP\_000213.1: p.D816V). Povzroči strukturno spremembo aktivacijske zanke kinazne domene in na ta način njeno konstitutivno delovanje (1).

*C-KIT* mutacije so povezane s številnimi malignimi boleznimi, kot so gastrointestinalni stromalni tumorji, akutna mieloblastna levkemija, mastocitoza, seminomi in melanomi, ki si jih bomo podrobneje pogledali. Poleg tega pa najdemo podatke o povečanem izražanju *c-KIT* tudi pri nekaterih sarkomih, Ne-Hodgkinovih limfomih in številnih drugih rakih (3).

## **MASTOCITOZA**

Bolezen kopičenja mastocitov in njihovih predniških celic ter njihova prekomerna aktivacija je bolezen, ki jo najprej povezujemo z različicami v genu *c-KIT*. Te najdemo pri domala vseh odraslih bolnikih s sistemsko mastocitozo in pri več kot 90% gre za različico D816V. Pri desetini bolnikov, kjer različice ne zaznamo, gre lahko tudi za lažno negativen rezultat, ki ga pripisujemo suboptimalnemu vzorcu, majhnemu tumorskemu bremenu oziroma premajhni občutljivosti metod. Ta mutacija je pri mastocitozi vodilna, povezana tudi z agresivnejšim potekom, kar zaznamo kot višje alelne frekvence pri bolnikih z napredovalo boleznijo. Pri otrocih je njena pogostost manjša (okrog 40%), pri približno 40% bolnikov pa najdemo druge različice (izven eksona 17) (5).

## **AKUTNA MIELOBLASTNA LEVKEMIJA (AML)**

Akutne levkemije so maligne bolezni hematopoetskih predniških celic. Glede na to, da je SCF ključni rastni faktor hematopoetske matične celice, ni presenetljivo, da več kot 80% levkemičnih celic bolnikov z AML izraža c-KIT. Obenem levkemične celice pogosto izločajo tudi SCF, kar vodi v avtokrino zanko. Pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo najdemo izražanje c-KIT bistveno redkeje (2% bolnikov). Različice v genu *c-KIT* najdemo približno pri tretjini bolnikov z AML in se navadno izključujejo z mutacijami druge receptorske kinaze, FLT3. Najpogosteje jih najdemo pri t.i. CBF (core binding faktor) levkemijah, ki jih opredeljujeta dve značilni kromosomski spremembi, namreč translokacija t(8;21) ter inverzija inv(16). *c-KIT* mutacije najdemo pri četrtini do tretjini bolnikov s CBF AML, ki skupno predstavljajo okrog 15% vseh bolnikov z AML. Mutacije najdemo skoraj izključno v eksonih 8 ter 17, največkrat različici D816 ali N822K. Pri AML nosi različica D816V napovedni pomen. Bolniki s CBF levkemijami se premestijo iz sicer napovedno ugodne skupine ob potrditvi mutacije *c-KIT* med napovedno vmesne (6).

## **GASTROINTESTINALNI STROMALNI TUMORJI (GIST)**

Ti tumorji izhajajo iz Cajalovih intersticijskih celic in skupno predstavljajo okrog 1% vseh tumorjev prebavil. 70% teh tumorjev prizadene želodec, 20–30% tanko črevo, manj kot 10% ostale dele prebavil. Redko metastazirajo in le 10-30% je malignih. Domala vsi GIST izražajo c-KIT in pri več kot 80% bolnikov najdemo aktivirajoče mutacije v tem genu, skupno so našli že več kot 150 različnih. Največkrat jih najdemo v eksonu 11, ki ustreza jukstamembranskemu delu receptorja, pri čemur gre večinoma za delecije. Redkeje najdemo mutacije v eksonih 9 in 17 (1% vseh GIST). Redkeje mutacije najdemo v ATP veznem delu (ekson 14), medtem ko sicer najpogostejšo mutacijo D816V pri GIST najdemo redko, razlogi za to pa niso znani (1, 2).

## **MELANOMI**

Čeprav je pri melanomih najpogostejša različica v genu *BRAF*, pa so odkrili pri približno četrtini bolnikov z akralnimi melanomi nog in rok, 39% mukoznih melanomov in 28% melanomov, ki so posledica sončnih opeklin, aktivirajoče mutacije v *c-KIT*. 70% različic najdemo v eksonih 11 (L576P) in 13 (K642E), D816V pa bistveno redkeje. Večinoma gre za drugačnosmiselne substitucije, ki se praviloma izključujejo z mutacijo v genu *BRAF*. Ugotovili so tudi, da pri melanomi različnih področij najdemo različno število kopij gena, pri kožnih je število kopij nižje kot pri ostalih (7).

## **DROBNOCELIČNI RAK PLJUČ (SCLC)**

Prekomerno izražanje *c-KIT* najdemo pri okrog 70% bolnikov s SCLC. Ta je največkrat posledica mutacije v eksonih 9 in 11. Ob tem maligne celice prekomerno izločajo tudi SCF, kar ustvari avtokrino zanko. Napovedni pomen prekomernega izražanja pri tej podvrsti raka še ni razjasnjen (1, 2).

## **TESTIKULARNI KARCINOMI**

So najpogostejši karcinomi mladih moških. Pri približno četrtini seminomov najdemo različico D816V in njeno določanje služi tudi kot označevalec bilateralne bolezni (2).

## **TARČNO ZDRAVLJENJE RAKOV Z MUTACIJAMI V GENU C-KIT**

Prav vpletenost *c-KIT* v preživetje in proliferacijo, obenem pa pogosto aberantno izražen pri raku, je napeljalo na iskanje inhibitorjev te kinaze. Konstitutivna aktivacija tirozin kinaz je vodila v razvoj selektivnih tarčnih inhibitorjev (TKI), ki so se že uspešno uveljavili pri zdravljenju raka. Po drugi strani se zdravljenje s protitelesi zaradi velikega intracelularnega dela tirozin kinaznih receptorjev ni izkazalo kot učinkovito, razen pri prekomernem izražanju divjega tipa. TKI prve generacije so se kot učinkoviti izkazali pri zdravljenju GIST. 80-90% bolnikov z GIST se vsaj

odziva na zdravljenje, desetina jih doseže popolno remisijo. TKI učinkujejo tako na prekomerno izražanju divjega tipa ter na različice v eksonu 11, ki so najpogostejše pri GIST, medtem ko so različice v kinazni domeni, tudi najpogostejša D816V, na zdravljenje s TKI rezistentne. Dodatna težava je, da se sčasoma vzpostavi tudi rezistenca na zdravljenje s TKI. V ozadju razvoja rezistence so nove mutacije v kinazni domeni oziroma amplifikacija gena. TKI naslednjih generacij učinkujejo tudi na različice v kinazni domeni, vendar pa ima vsaka od njih specifične lastnosti (1). Če želimo uspešno uporabljati tarčno zdravljenje, je prvi ključen korak, da pri posameznem bolniku opredelimo prisotne različice, ki napovedujejo odgovor na posamezno terapijo (3). Zato potrebujemo zanesljivo laboratorijsko diagnostiko, ki razpolaga z ustrezno opremo in znanjem. Strukturne in funkcijske raziskave receptorja c-KIT, ki so pomembne tudi zaradi razvoja tarčnih zdravil, so pokazale njegovo veliko kompleksnost. Ker mutirana oblika proteina c-KIT ne odstopa od normalne le v kvantitativnem delovanju, pač pa tudi v kvalitativnem, se odpirajo nadaljnje možnosti v razvoju bolj specifičnega tarčnega zdravljenja (2).

## LITERATURA

1. Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(5):435-43.
2. Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev.* 2012;92(4):1619-49.
3. Stankov K, Popovic S, Mikov M. C-KIT signaling in cancer treatment. *Curr Pharm Des.* 2014;20(17):2849-80)
4. Roskoski Jr. R. Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase – The stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun, USA,* 2005: 1307-1315
5. Shomali W, Gotlib J. The new tool "KIT" in advanced systemic mastocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2018;2018(1):127-136.
6. Ayatollahi H, Shajiei A, Sadeghian MH, Sheikhi M, Yazdandoust E, Ghazanfarpour M, Shams SF, Shakeri S. Prognostic Importance of C-KIT Mutations in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2017;10(1):1-7.
7. Pham DDM, Guhan S, Tsao H. Yonsei. KIT and Melanoma: Biological Insights and Clinical Implications. *Med J.* 2020;61(7):562-571.



# LABORATORIJSKA OPTIMIZACIJA KIT p.D816V TESTIRANJA V KRVI

Matija Rijavec

Laboratorij za klinično imunologijo in molekularno genetiko, Klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Za bolezni mastocitov, med katere sodita tudi sindrom aktivacije mastocitov in mastocitoza, je značilno prekomerno kopičenje in nepravilno delovanje mastocitov (1,2). Prekomerno in nekontrolirano sproščanje različnih mediatorjev iz mastocitov, lahko privede do raznolikih kliničnih težav, med drugimi tudi do hude sistemske alergijske reakcije, anafilaksije. Bolniki z mastocitozo tako pogosto doživijo anafilaksijo, predvsem po pikih kožekrilcev (*Hymenoptera*) (1,2,3,4). Ravno tako pa je pri bolnikih z mastocitozo pogosta tudi idiopatska anafilaksija ter anafilaksija po hrani in zdravilih (4).

## DOLOČITEV MUTACIJE P.D816V V GENU KIT V KRVI

Velika večina odraslih bolnikov z boleznimi mastocitov ima aktivirajočo mutacijo p.D816V v genu *KIT* (mutacija *KIT*), kar vodi do kinazne aktivnosti od odsotnosti liganda in nekontrolirane rasti in proliferacije mastocitov (1,3,5,6,7). Prisotnost mutacije *KIT* v izven-kožnih organih velja za enega izmed pomožnih kriterijev za postavitve diagnoze sistemske mastocitoze (1,2). Dokazovanje prisotnosti le-te predstavlja velik tehnični izziv, ker je delež celic z omenjeno mutacijo pogosto nizek v vseh tkivih. Analizo se običajno opravi na aspiratu kostnega mozga, saj se predvideva, da je delež mutiranih mastocitov tam najvišji (1,2,3). Vendar lahko mutacijo *KIT* z zelo občutljivimi molekularno genetskimi metodami, kot sta kvantitativni PCR (qPCR) ali digitalni kapljični PCR (ddPCR), določimo tudi v krvi (5,6,7). Z omenjenima metodama so v krvi zaznali okrog 90 % mutacij p.D816V v genu *KIT*, ki so jih pri bolnikih z mastocitozo določili v kostnem mozgu, dočim pri zdravih osebah omenjene mutacije niso zaznali (5,6,7). Za določitev mutacije p.D816V v

genu *KIT* v krvi sta se obe metodi, qPCR in ddPCR, izkazali za primerni, rezultati primerjave metod so bili skladni (7).

V Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Klinike Golnik določamo prisotnost mutacije p.D816V (c.2447A>T) v genu *KIT* v krvi s pomočjo metode qPCR. Na podlagi pomnoževanja in vrednosti  $C_t$  referenčne/kontrolne (*KIT\_Control*) in tarčne/mutacijske (*KIT\_D816V*) reakcije izvedene v trojnikih, določimo vzorec za pozitivnega v primeru, da je  $C_t$  tarčne/mutacijske (*KIT\_D816V*) reakcije nižji od 44 pri vsaj dveh ponovitvah, podobno kot je bilo že predhodno opisano (5,6). Frekvenco omenjene mutacije (angl. variant allele frequency, VAF) določimo s pomočjo formule:  $\times 100$ . Meja detekcije omenjene metode je 0,01 % mutacije p.D816V v izolirani DNA, saj pri taki frekvenci prisotnost mutacije p.D816V v genu *KIT* še zanesljivo določimo.

## **BOLEZNI MASTOCITOV IN ANAFILAKSIJA**

Kot omenjeno, bolniki z mastocitozo, pogosto doživijo anafilaksijo, predvsem po pikih kožekrilcev (1,3). Mastocitoza je tako eden najpomembnejših dejavnikov tveganja za hudo anafilaksijo, ne samo po pikih kožekrilcev, ampak tudi za anafilaksijo drugih sprožilcev (zdravila, hrana). To so nedavno potrdili podatki evropskega registra anafilaksije (8). Pogostost mastocitoze pri bolnikih z anafilaksijo je težko natančno oceniti. Večina raziskav, ki je preučevala pogostost mastocitoze med bolniki z anafilaksijo se je osredotočala na bolnike z anafilaksijo po pikih kožekrilcev, vključevala pa je samo bolnike s povišano bazalno triptazo. V omenjenih raziskavah so prišli do zaključkov, da je med bolnikih z anafilaksijo po pikih kožekrilcev 1 do 8 % takih z mastocitozo (3).

Kljub prepričljivim dokazom o vzročni povezavi med mastocitozo in anafilaksijo je pri bolnikih z anafilaksijo mastocitoza premalokrat diagnosticirana (1,3,8,9). Eden izmed razlogov za to je, da je fenotip mastocitoze pri bolnikih z anafilaksijo pogosto klinično neviden, saj bolniki velikokrat nimajo izrazitih kožnih lezij ter povišane bazalne

triptaze. Zlasti pri bolnikih z normalno bazalno triptazo je mastocitoza pogosto spregledana, saj se biopsija in preiskave kostnega mozga za izključitev mastocitoze običajno ne izvajajo (1,9,10).

V raziskavi, ki so jo opravili Zanotti in sodelavci (11) so na manjši skupini izbranih bolnikov z anafilaksijo po pikih kožekrilcev, brez kožnih lezij in normalno triptazo v serumu, potrdili mastocitozo pri kar 16 od 22 bolnikov. Zaključili so, da je potrebna obravnava za izključitev mastocitoze pri vseh bolnih z anafilaksijo po pikih kožekrilcev, pri kateri pride do hipotenzije ter poteka brez urtikarije ali angioedema, ne glede na vrednosti bazalne triptaze v serumu (11). Nadalje so v nedavni raziskavi s pomočjo občutljive metode qPCR v krvi zaznali mutacijo p.D816V v genu *KIT* pri 5 % (6/123) bolnikov z anafilaksijo in normalno bazalno triptazo v serumu (10). Vzrok za anafilaksijo pri bolnikih s potrjeno mutacijo *KIT* v krvi je bil pik kožekrilcev pri štirih in hrana pri dveh osebah (10). Upoštevajoč le podskupino bolnikov z anafilaksijo po piku kožekrilca je ta delež narasel na več kot 8 % (9).

Podobno smo tudi v raziskavi, ki je vključevala veliko število oseb z anafilaksijo po pikih kožekrilcev odkrili, da ima mutacijo p.D816V v genu *KIT* v krvi kar 23 % oseb s težko reakcijo (Mueller IV) po piku kožekrilca, 9 % bolnikov s stopnjo III reakcije po Muellerju, medtem ko omenjene mutacije v krvi ni imel noben bolnik z blažjo reakcijo (Mueller I in II) [ $P = 0,003$ ,  $OR = 3,9$  (95% CI 1,6-9,4)] (12). Velika večina bolnikov, in sicer 74 %, z mutacijo *KIT* v krvi je imela normalne vrednosti bazalne triptaze v serumu (12). Ti rezultati kažejo na pomen določanja mutacije v krvi pri bolnikih z anafilaksijo ne glede na rezultate bazalne triptaze, torej tudi pri normalnih vrednostih bazalne triptaze.

Na pomen določanja mutacije gena *KIT* v krvi pri bolnikih z anafilaksijo pri izključitvi mastocitoze so že pred časom opozorili v raziskavi tudi Carter in sodelavci (13), v kateri so predlagali, da se v priporočila za

presejanje za mastocitozo poleg značilnih kliničnih znakov, spola in bazalne triptaze vključi tudi rezultate določitve mutacije p.D816V v genu *KIT* v krvi (13). V omenjeni raziskavi so sicer potrdili mastocitozo pri kar 14 % bolnikov z idiopatsko anafilaksijo (13).

## ZAKLJUČEK

Za določitev mutacije p.D816V (c.2447A>T) v genu *KIT* v krvi je potrebna uporaba zelo občutljive molekularno genetske metode. Kar je lahko v pomoč pri identifikaciji in pravilni obravnavi bolnikov, ob značilnem, hudem kliničnem poteku anafilaksije (t.j. s hipotenzijo) ne glede na vrednosti bazalne triptaze v serumu, torej tudi pri normalnih vrednostih bazalne triptaze.

## LITERATURA

1. Valent P, Escribano L, Broesby-Olsen S, Hartmann K, Grattan C, K Brockow K, et al. Proposed diagnostic algorithm for patients with suspected mastocytosis: a proposal of the European Competence Network on Mastocytosis. *Allergy*. 2014;69:1267-1274.
2. Valent P, Akin C, Bonadonna P, Hartmann K, Brockow K, Niedoszytko M, et al. Proposed Diagnostic Algorithm for Patients with Suspected Mast Cell Activation Syndrome. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2019;7:1125-1133.
3. Bonadonna P, Scaffidi L. Hymenoptera Anaphylaxis as a Clonal Mast Cell Disorder. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2018; 38:455-468.
4. Schuch A, Brockow K. Mastocytosis and Anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2017;37:153-164.
5. Kristensen T, Vestergaard H, Boe Møller M. Improved Detection of the KIT D816V Mutation in Patients With Systemic Mastocytosis Using a Quantitative and Highly Sensitive Real-Time qPCR Assay. *J Mol Diagn*. 2011;13:180-188.
6. Kristensen T, Vestergaard H, Bindslev-Jensen C, Møller MB, Broesby-Olsen S. Sensitive KIT D816V mutation analysis of blood as a diagnostic test in mastocytosis. *Am J Hematol*. 2014;89:493-498.
7. Greiner G, Gurbisz M, Ratzinger F, Witzeneder N, Simonitsch-Klupp I, Mitterbauer-Hohendanner G, et al. Digital PCR: A Sensitive and Precise Method for KIT D816V Quantification in Mastocytosis. *Clin Chem*. 2018;64:547-555.
8. Francuzik W, Ruëff F, Bauer A, Bilò MB, Cardona V, Christoff G, et al. Phenotype and risk factors of venom-induced anaphylaxis: A case-control study of the European Anaphylaxis Registry. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147:653-662.e9.
9. Broesby-Olsen S, Ruiz Oropeza A, Bindslev-Jensen C, Vestergaard H, Boe Møller M, Siebenhaar F, et al. Recognizing mastocytosis in patients with anaphylaxis: value of KIT D816V mutation analysis of peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135:262-264.

10. Dölle-Bierke S, Siebenhaar F, Burmeister T, Worm M. Detection of KIT D816V mutation in patients with severe anaphylaxis and normal basal tryptase—first data from the Anaphylaxis Registry (NORA). *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144:1448-1450.
11. Zanotti R, Lombardo C, Passalacqua G, Caimmi C, Bonifacio M, De Matteis G, et al. Clonal mast cell disorders in patients with severe Hymenoptera venom allergy and normal serum tryptase levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:135-139.
12. Lyons JJ, Chovanec J, O'Connell MP, Liu Y, Šelb J, Zanotti R, et al. Heritable risk for severe anaphylaxis associated with increased  $\alpha$ -tryptase-encoding germline copy number at TPSAB1. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147:622-632.
13. Carter MC, Desai A, Komarow HD, Bai Y, Clayton ST, Clark AS, et al. A distinct biomolecular profile identifies monoclonal mast cell disorders in patients with idiopathic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:180-188.

# VLOGA PODVOJITEV GENA TPSAB1 (HAT) PRI ANAFILAKSIJI

Julij Šelb

Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

## ANAFILAKSIJA IN TRIPTAZA

Anafilaksija je resna sistemska preobčutljivostna reakcija. Pojavi se hitro po stiku z antigenom/alergenom (npr. določena hrana, pik kožekrilca, zdravila) in lahko povzroči življenje ogrožajoče težave povezane z dihalnim ter srčno-žilnim sistemom, katere ponavadi spremljajo spremembe na koži in sluznicah (1). Je eklatanten primer neravnotežja med koristni in kvarnimi posledicami aktivacije (prekomerne) imunskega sistema. Pomembno vlogo pri nastanku anafilaksije igrajo triptaze - serinske proteaze, ki jih proizvajajo tkivni efektorski mastociti. Le-ti so glavne celice IgE-posredovane anafilaksije (1).

Efektorsko obliko triptaz predstavlja tetramer pro-triptaz (predvsem  $\alpha$  in/ali  $\beta$  pro-triptaze; glej spodaj - genetika triptaznega lokusa). Po sprostitvi iz sekretornih granul mastocitov (ob IgE posredovani aktivaciji le-tega), zreli triptazni tetrameri povzročijo cepljenje ekstracelularnega matriksa, fibrinogena in s strani proteaz aktiviranih receptorjev ter na ta način doprinesejo k znakom/simptomom anafilaksije (2).

$\alpha/\beta$ -heterotetrameri naj bi imeli večjo proteolitično aktivnost kot zgolj  $\beta$ -homotetrameri (2). *In-vitro* proteolitična aktivnost zgolj  $\alpha$ -homotetramerov je zanemarljiva (2). Nadalje smo pred kratkim pokazali, da  $\alpha/\beta$ -heterotetrameri povzročijo aktivacijo PAR2 (angl. 'protease activated receptor'), dočim zgolj  $\beta$ -homotetrameri te aktivacijske sposobnosti nimajo (2). Produkti cepljenja PAR2 povzročijo zvišanje vaskularne permeabilnosti, kar bi lahko vplivalo na težo anafilaksije povzročene s strani  $\alpha/\beta$ -heterotetramerih triptaz v primerjavi z anafilaksijo povzročeno s strani zgolj  $\beta$ -homotetramerih triptaz.

## TRIPTAZA MED ANAFILAKSIJO/BAZALNA TRIPTAZA

Kot opisano, na vrednost triptaze, izmerjene pri bolnikih med anafilaktično reakcijo, močno vpliva prisotnost zrelega (tetramernega) encima, ki se ob degranulaciji zaradi IgE posredovane aktivacije mastocitov, sprosti iz sekretornih granul le-teh (2). Po drugi strani pa k bazalni ravni triptaze (bazalna triptaza - BT), to je ravni, ki jo zaznamo med obdobji

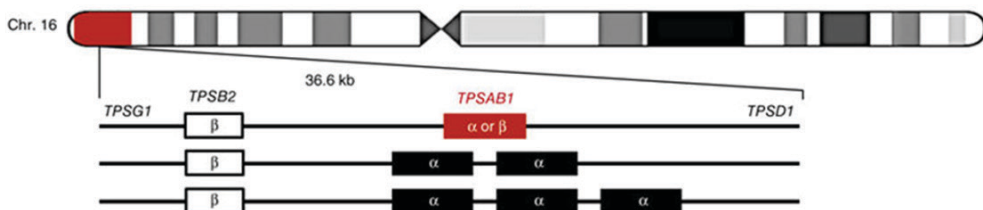
degranulacije mastocitov, prispeva predvsem konstitutivna sekrecija ne-efektorskih, pro-triptaz ( $\alpha$  in/ali  $\beta$  pro-triptaze).

## DEDNA A - TRIPTAZEMIJA

Povišana bazalna triptaza (BT;  $\geq 11.4$  ng/ml) je prisotna v 4-6% splošne populacije (3,4). Pred kratkim so ugotovili, da se povišana vrednost BT v kontekstu sindroma atopije z/brez nepravilnosti vezivnega tkiva deduje na Mendelski (avtosomno dominanten) način (5). Ta sindrom, poimenovan sindrom »dedne  $\alpha$ -triptazemije«, so povezali s triptaznim lokusom na kromosomu 16 (v regiji 13.3) (6). Klinično sliko sindroma, ki med drugim vključuje tudi povišano BT, definira število ponovitev gena *TPSAB1* na prej omenjenem lokusu (Slika 1).

### Genetika triptaznega lokusa

Genetika triptaznega lokusa je kompleksna. Lokus je sestavljen iz štirih paralognih (*paralogen* - ki nastane kot posledica duplikacije) genov in sicer: i.) *TPSG1*: triptaza-  $\gamma 1$ , ii.) *TPSAB1*: triptaza-  $\alpha/\beta 1$  ( $\beta$ ), iii.) *TPSB2*: triptaza-  $\beta 2/3$  in iv.) *TPSD1*: triptaza-  $\delta 1$ . Omenjeni lokus je močno podvržen genetski rekombinaciji. Predvideva se, da so se številni triptazni geni pri ljudeh razvili preko podvojitve in obratov tega območja (7). Dva bližnja gena, *TPSAB1* in *TPSB2*, kodirata štiri glavne izooblike (izoforme) triptaze ( $\beta 1$  ( $\beta$ ),  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  in  $\alpha$ ), ki naj bi predstavljale biološko pomembno, topno, triptazo. Izooblika triptaza- $\alpha$  naj bi bila kodirana izključno na *TPSAB1* lokusu.



**Slika 1:** Grafična reprezentacija triptaznega lokusa na kromosomu 16p13.3 (1.2)

## Klinična slika dedne $\alpha$ -triptazemije

Simptomi dedne  $\alpha$ -triptazemije (angl. 'hereditary  $\alpha$ -tryptasemia' (HaT)) so dokaj nespecifični. V prvi opisani kohorti 96 posameznikov iz 35 družin (iz ZDA) so bili prisotni simptomi/znaki opisani v Razpredelnici 1.

<b>Manifestacija</b>	<b>HaT</b>	<b>HaT d u p l i k a c i j a <i>TPSAB1</i> (<math>\alpha\alpha</math>)</b>	<b>HaT t r i p l i k a c i j a <i>TPSAB1</i> (<math>\alpha\alpha\alpha</math>)</b>
Sistemska reakcija na strup kožekrilca	16%	15%	27%
<b>Kronična srbečica/rdečica (angl. flushing/pruritus)</b>	<b>51%</b>	<b>45%</b>	<b>80%</b>
Sindrom razdražljivega črevesja	49%	49%	58%
<b>Kronični gastroezofaealni refluks</b>	<b>65%</b>	<b>49%</b>	<b>100%</b>
<b>Kongenitalne skeletne nepravilnosti</b>	<b>26%</b>	<b>19%</b>	<b>53%</b>
<b>Ohranjena primarna denticija</b>	<b>21%</b>	<b>16%</b>	<b>47%</b>
Hipermobilnost sklepov	28%	37%	23%
<b>Artralgija</b>	<b>45%</b>	<b>42%</b>	<b>73%</b>
<b>Prisotnost bolečine/glavobolov</b>	<b>47%</b>	<b>44%</b>	<b>73%</b>
<b>Motnje spanja</b>	<b>39%</b>	<b>32%</b>	<b>39%</b>

**Razpredelnica 1:** Simptomi/znaki HaT – počrtnjeni so simptomi/znaki, ki se statistično značilno razlikujejo med bolniki z duplikacijo in triplikacijo gena *TPSAB1*.

Nekateri izmed opisanih simptomov/znakov, so kazali vpliv doze, kar pomeni, da so bili pogosteje prisotni pri posameznikih s triplikacijo, kot pa pri posameznikih z duplikacijo v genu *TPSAB1*.

Podobne simptome v smislu kronične srbečice/rdečine, težav (funkcionalnih) GIT-a in hipermobilnost sklepov so opisovali tudi v kohorti



bolnikov iz Velike Britanije (8). Vendar avtorji te raziskave niso opazili, da je pri izražanju klinične slike prisoten vpliv doze (razlik v klinični sliki med bolniki z dvema oz. tremi kopijami gena *TPSAB1* na enem alelu praktično ni bilo) (8). Prav tako so zaznali, da so lahko bolniki s številnimi ponovitvami (tudi do 5 ponovitev gena *TPSAB1*) povsem asimptomatski, zaradi česar so zaključili, da je klinična penetranca sindroma - z izjemo višje bazalne triptaze, ki pa je lahko tudi v (visokem) normalnem območju - nepopolna (8).

### Dedna $\alpha$ -triptazemija in povezava z anafilaksijo ter mastocitozo

Druga bolezenska entiteta, pri kateri prav tako pride do povišane BT je sistemska mastocitoza. Sistemska mastocitoza (SM) je hematopoetična neoplazma, pri kateri pride do infiltracije številnih organov s klonalno pomnoženimi mastociti. Klinična slika in potek bolezni je variabilen ter sega od relativno klinično benigne oblike t.i. indolentne sistemske mastocitoze (ISM), ki je tudi najpogostejša oblika vseh SM, do klinično agresivne levkemije mastocitnih celic (9,10). Glede na priporočila WHO (angl. 'World Health Organisation'), vrednost BT >20 ng/ml predstavlja 'minor' kriterij za postavitve diagnoze SM.

Pomembno je poudariti, da je prevalenca anafilaksije po piku kožekrilca pri bolnikih s SM je višja, kot je prevalenca prisotna v splošni populaciji (11).

Pred kratkim smo pokazali, da prisotnost dedne  $\alpha$ -triptazemije statistično značilno poveča tveganje za težko reakcijo (Mueller IV) po piku kožekrilca (OR = 2.2;  $p < 0.05$ ) (2). HaT je bila prisotna pri 9.2% bolnikov, s težko anafilaksijo (Mueller IV), dočim je bila pri bolnikih z blažjo obliko anafilaksije (Mueller I-III) prisotna v zgolj 4.3%. Nadalje smo v isti raziskavi pokazali, da delež posameznikov s HaT še naraste pri bolnikih s težko reakcijo po piku kožekrilca in s sistemsko mastocitozo (2). Med temi bolniki je delež posameznikov s HaT znašal 14.3%, vendar je bil vzorec bolnikov majhen ( $n=21$ ; 3-je bolniki v skupini so imeli HaT).

Podoben delež posameznikov s HaT so ugotovili v mnogo večji skupini

bolnikov z mastocitozo (12). Med 180 bolniki (velika večina z ISM) jih je 31 (17.2%) imelo HaT (12); delež je bil statistično značilno višji od pričakovanega (4-6%). Med bolniki z mastocitozo in HaT (proti bolnikom z 'zgolj' mastocitozo) jih je imel statistično značilno višji delež anafilaksijo po piku kožekrilca (30% proti 9.9%;  $p=0.007$ ). Prav tako je bil, med bolniki z mastocitozo in HaT, statistično značilno višji delež posameznikov, ki so imeli simptome/znake sproščanja mediatorjev (vaskularna nestabilnost, hipotenzija, anafilaksija itd.) visoke stopnje (35.5% proti 11%;  $p=0.002$ ). Ti rezultati kažejo na povezavo med podvojitvami gena TPSAB1 in mastocitozo ter na vlogo TPSAB1 podvojitvev pri anafilaksiji, tako v kontekstu, kot tudi izven konteksta mastocitose.

Možne pojasnitve povezave med SM in podvojitvami gena TPSAB1 so številne; zaenkrat najbolj verjetna je, da dodatna kopija triptaznega gena povzroči povečano mitogeno aktivnosti mikrookolja kostnega mozga, kar bi lahko olajšalo razvoj SM (12). Morebitna razlaga povezave med težko anafilaksijo in HaT pa je zgoraj omenjena povečana tvorba  $\alpha/\beta$ -heterotetramerih triptaz, ki so stabilnejše, imajo večjo proteolitično aktivnost ter *in-vitro* aktivirajo signalno pot, ki privede (prav tako *in-vitro*) do povečane vaskularne permeabilnosti in katere zgolj  $\beta$ -homotetramerne triptaze ne aktivirajo (2).

### Klinična uporabnost določanja dedne $\alpha$ -triptazemije

Kljub dejstvu, da so ponovitve v TPSAB1 genu povezane s SM, pa se določanje le-teh lahko uporabi v rutinski praksi v primerih, ko je klinični sum na mastocitozo nizek, prisotna je mejno povišana bazalna triptaza, da se s tem izognemo za bolnika neprijetni punkciji kostnega mozga (13). Vendar je potrebno čvrste klinične kriterije, kjer se bomo s takim procesom odločanja izognili punkciji kostnega mozga, še vzpostaviti in prospektivno ovrednostiti.

## LITERATURA

1. Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ. The pathophysiology of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(2):335-348.
2. Lyons JJ, Chovanec J, O'Connell MP, et al. Heritable risk for severe anaphylaxis associated with increased  $\alpha$ -tryptase-encoding germline copy number at TPSAB1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2021;147(2):622-632.
3. Fellingner C, Hemmer W, Wöhrl S, Sesztak-Greinecker G, Jarisch R, Wantke F. Clinical characteristics and risk profile of patients with elevated baseline serum tryptase. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2014;42(6):544-552.
4. Gonzalez-Quintela A, Vizcaino L, Gude F, et al. Factors influencing serum total tryptase concentrations in a general adult population. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(5):701-706.
5. Lyons JJ, Sun G, Stone KD, et al. Mendelian inheritance of elevated serum tryptase associated with atopy and connective tissue abnormalities. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(5):1471-1474.
6. Lyons JJ, Yu X, Hughes JD, et al. Elevated basal serum tryptase identifies a multisystem disorder associated with increased TPSAB1 copy number. *Nat Genet.* 2016;48(12):1564-1569.
7. Trivedi NN, Tong Q, Raman K, Bhagwandin VJ, Caughey GH. Mast cell alpha and beta tryptases changed rapidly during primate speciation and evolved from gamma-like transmembrane peptidases in ancestral vertebrates. *J Immunol.* 2007;179(9):6072-6079.
8. Robey RC, Wilcock A, Bonin H, et al. Hereditary alpha-tryptasemia: uk prevalence and variability in disease expression. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice.* 2020;8(10):3549-3556.
9. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2019 update on diagnosis, risk stratification and management. *Am J Hematol.* 2019;94(3):363-377.
10. Sánchez-Muñoz L, Alvarez-Twose I, García-Montero AC, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol.* 2011;24(9):1157-1168.
11. Bonadonna P, Zanotti R, Müller U. Mastocytosis and insect venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010;10(4):347-353.
12. Greiner G, Sprinzl B, Górška A, et al. Hereditary  $\alpha$  tryptasemia is a valid genetic biomarker for severe mediator-related symptoms in mastocytosis. *Blood.* 2021;137(2):238-247.
13. Carrigan C, Milner JD, Lyons JJ, Vadas P. Usefulness of testing for hereditary alpha tryptasemia in symptomatic patients with elevated tryptase. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;8(6):2066-2067.

## Mastocitoza v alergologiji

Skupni sestanek Alergološke in imunološke sekcije SZD z Združenjem hematologov Slovenije

<b>Urednik zbornika</b>	Mitja Košnik
<b>Strokovni odbor srečanja</b>	Mitja Košnik, Peter Korošec, Samo Zver
<b>Organizacija srečanja</b>	Robert Marčun, Mitja Košnik
<b>Oblikovanje</b>	Zala Košnik
<b>Izdajatelj</b>	Alergološka in imunološka sekcij SZD
<b>Leto izdaje</b>	2021
<b>Naklada</b>	300 izvodov
<b>Tisk</b>	Nonparel d.o.o.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji

Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616-097(082)

616-056.43:591.145(082)

SKUPNI sestanek Alergološke in imunološke sekcije SZD z Združenjem hematologov Slovenije (2021 ; online)

Mastocitoza v alergologiji : zbornik sestanka : skupni sestanek Alergološke in imunološke sekcije SZD z Združenjem hematologov Slovenije : petek, 5. marec 2021 / [urednik zbornika Mitja Košnik]. - Ljubljana : Alergološka in imunološka sekcij SZD, 2021

ISBN 978-961-7092-13-4

COBISS.SI-ID 54226691

