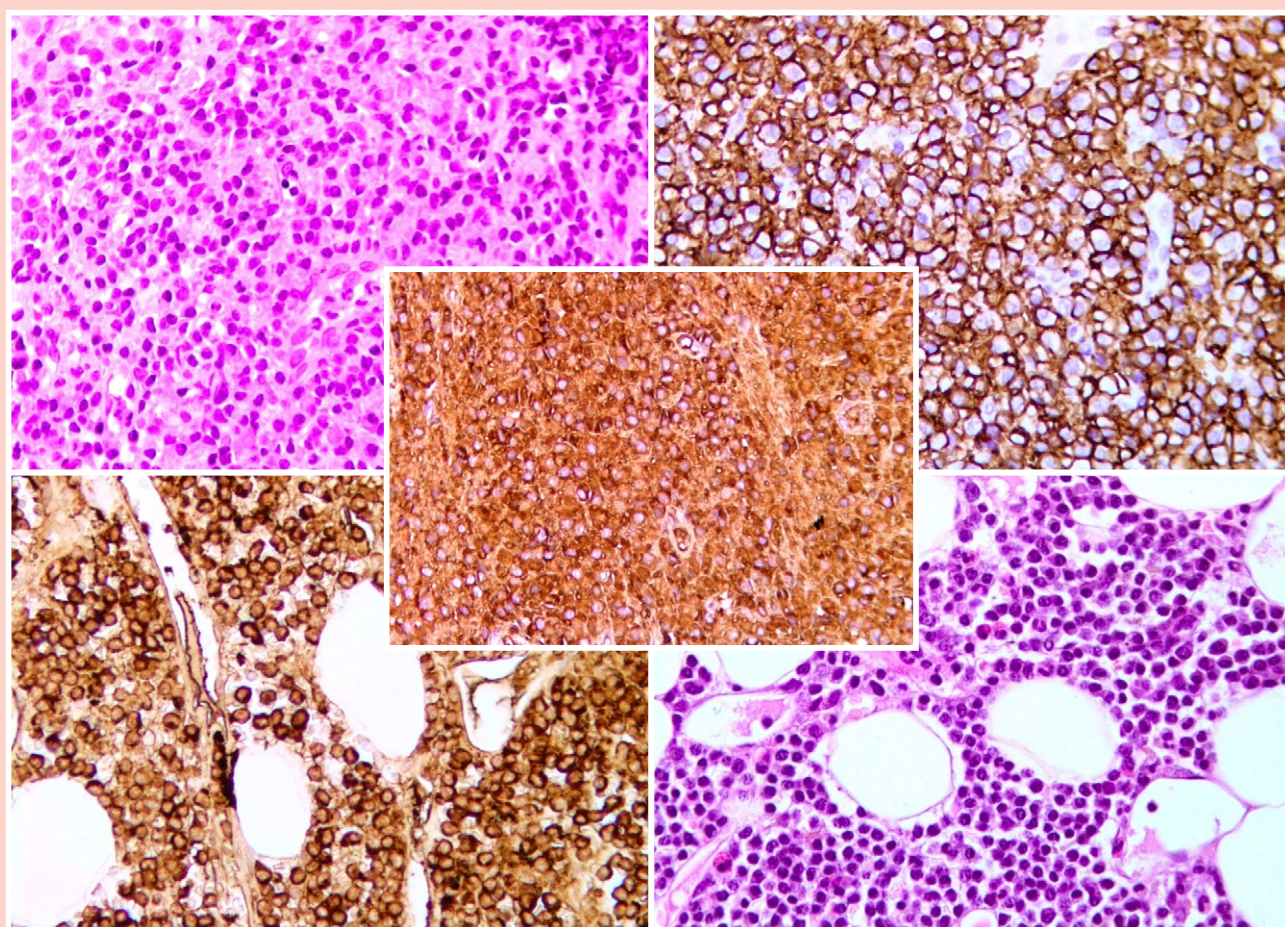


# Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM



Volumen 9., Broj 1.

**Krohema**

## **Impresum**

Bilten Krohema  
Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM  
Volumen 9., Broj 1., Svibanj 2017.

### **Nakladnik:**

Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM

### **Za nakladnika:**

Damir Nemet

### **Glavni urednik:**

Dražen Pulanić

### **Tajnica Uredništva:**

Lana Desnica

### **Uredništvo:**

Srđana Čulić, Ivan Host, Inga Mandac Rogulj, Vlatka Periša, Mario Piršić

### **Tajnica KROHEM-a:**

Dijana Perčin

### **Autori tekstova:**

Igor Aurer	Biljana Jelić Puškarić	Zinaida Perić
Jasenka Antulov	Gordana Kaić	Vlatka Periša
Antonija Babić	Romina Kanić	Igor Petriček
Marko Barešić	Irena Karas	Mario Piršić
Sandra Bašić-Kinda	Mirjana Mariana Kardum Paro	Ana Planinc-Peraica
Drago Batinić	Ika Kardum-Skelin	Dražen Pulanić
Josip Batinić	Tajana Klepac Pulanić	Delfa Radić-Krišto
Lucija Beljan	Lucija Kraljević	Ljubica Rajić
Ernest Bilić	Lejla Kurić	Violeta Rezo Vranješ
Ervina Bilić	Rajko Kušec	Sunčica Ries
Ana Boban	Dina Ljubas	Goran Rinčić
Martina Bogeljić Patekar	Inga Mandac Rogulj	Ranka Serventi-Seiwerth
Ines Bojanić	Marko Martinović	Branimir Ivan Šepec
Nikola Bulj	Marija Maskalan	Zoran Šiftar
Marija Burek Kamenarić	Toni Matić	Katarina Štingl Janković
Romana Čeović	Sanja Mazić	Toni Valković
Lana Desnica	Mirta Mikulić	Marijo Vodanović
Nadira Duraković	Milan Milošević	Radovan Vrhovac
Davorka Dušek	Vibor Milunović	Tamara Vukić
Zlatko Giljević	Zdravko Mitrović	Renata Zadro
Koraljka Gjadrov Kuveždić	Marinka Mravak-Stipetić	Ana Zelić Kerep
MagdalenaGREE	Damir Nemet	Silva Zupančić Šalek
Njetočka Gredelj-Šimec	Alen Ostojić	Renata Žunec
Zorana Grubić	Slobodanka Ostojić Kolonić	
Ivana Ilić	Steven Živko Pavletić	

### **Uputa suradnicima:**

Materijali se šalju na adresu uredništva „Bilten Krohema“, Buzinski prilaz 10, 10 010 Zagreb, u elektronskom i tiskanom obliku, te obvezno i na adresu E-pošte urednika [dpulanic@yahoo.com](mailto:dpulanic@yahoo.com). Objavljeni tekstovi predstavljaju stav autora i Uredništvo se ne mora slagati s iznešenim mišljenjima. Svi dosadašnji brojevi Biltena Krohema dostupni su na web stranicama Krohema: [www.krohema.hr](http://www.krohema.hr)

### **Opis slika na naslovnici:**

Patohistološke slike biopsije kosti bolesnika s plazmocitomom/multiplim mijelomom, ustupljene su i priredene ljubaznošću dr. sc. **Ivane Ilić**, Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb.

# Sadržaj

<b>Damir Nemet:</b> Uvodnik .....	2
<b>Sandra Bašić-Kinda, Josip Batinić, Dražen Pulanić, Toni Valković, Delfa Radić-Krišto, Inga Mandac Rogulj, Njetočka Gredelj-Šimec, Mario Piršić, Igor Aurer, Damir Nemet:</b> Hrvatske smjernice za liječenje multiplog mijeloma .....	3
<b>Koraljka Gjadrov Kuveždić, Sunčica Ries, Jasenka Antulov, Romina Kanić, Lucija Beljan:</b> Značaj citomorfološke dijagnostike u sklopu tima za akutne leukemije .....	14
<b>Alen Ostojić, Radovan Vrhovac:</b> Registar invazivnih mikoza – projekt kandida .....	16
<b>Inga Mandac Rogulj, Mirjana Mariana Kardum Paro, Vibor Milunović, Martina Bogeljić Patekar, Ana Planinc-Peraica, Marko Martinović, Goran Rinčić, Ika Kardum-Skelin, Biljana Jelić Puškarić, Gordana Kaić, Zoran Šiftar, Slobodanka Ostojić Kolonić:</b> Prognostička vrijednost i dinamika cirkulirajuće mikroRNA u visokorizičnom mijelodisplastičnom sindromu liječenom 5-azacitidinom .....	18
<b>Zdravko Mitrović, Rajko Kušec:</b> Imuna trombocitopenija prije kronične mijelomonocitne leukemije - poveznica? .....	21
<b>Ana Zelić Kerep:</b> Očuvanje fertiliteta u hematoloških bolesnika .....	23
<b>Nadira Duraković:</b> Transplantacija od poluidentičnog darivatelja – iskustva KBC Zagreb .....	27
<b>Marija Maskalan, Marija Burek Kamenarić, Ranka Serventi-Seiwerth, Katarina Štingl Janković, Mirta Mikulić, Renata Žunec, Nadira Duraković, Zorana Grubić:</b> Uloga gena HLA-DPB1 u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica .....	30
<b>Dražen Pulanić, Lana Desnica, Ranka Serventi-Seiwerth, Marinka Mravak-Stipetić, Ervina Bilić, Romana Čević, Nadira Duraković, Zinaida Perić, Lucija Kraljević, Ernest Bilić, Ines Bojanić, Sanja Mazić, Igor Petriček, Dina Ljubas, Tamara Vukić, Tajana Klepac Pulanić, Branimir Ivan Šepec, Marko Barešić, Irena Karas, Ljubica Rajić, Toni Matić, Davora Dušek, Magdalena Grce, Lejla Kurić, Antonija Babić, Violeta Rezo Vranješ, Zlatko Giljević, Milan Milošević, Ivana Ilić, Renata Zadro, Drago Batinić, Radovan Vrhovac, Steven Živko Pavletić, Damir Nemet:</b> Daljnji razvoj multidisciplinarnog tima za kroničnu bolest presatka protiv primatelja KBC Zagreb – novi projekt .....	36
<b>Nikola Bulj, Goran Rinčić:</b> Fibrilacija atrijska kao komplikacija liječenja ibrutinibom .....	39
<b>Marijo Vodanović, Dražen Pulanić, Ana Boban, Silva Zupančić Šalek:</b> Zbrinjavanje krvarenja u bolesnika na direktnim oralnim antikoagulantima .....	42
<b>Vlatka Periša:</b> Kalendar predstojećih hematoloških skupova .....	47

## Uvodnik

Drage kolegice i kolege, članice i članovi KROHEM-a,

osnivanje Zaklade KROHEM-a je u tijeku. Na-  
dao sam se da će postupak teći brže i da ćemo već u  
svibnju moći reći da Zaklada egzistira i da se spre-  
mamo raspisati prve natječaje, no administrativni  
proces koji uključuje dva ureda Ministarstva upra-  
ve i Ministarstvo zdravstva je očito prilično dugo-  
trajan. No, ciljevi su zadani, okvir za realizaciju je  
uspostavljen i ostalo je sada samo pitanje vremena.

Aktivnost KROHEM-a u izradi smjernica za  
hematološke bolesti je zamjetna. Nakon već dobro  
etabliranih smjernica za limfome, u Liječničkom  
vjesniku objavljene su smjernice za mijelodispla-  
stični sindrom kao rezultat rada Radne skupine za  
MDS i konsenzusa članova KROHEM-a. Također  
je Radna skupina za hemostazu i trombozu, na-  
kon sveobuhvatne rasprave pripremila smjernice za  
imunotrombocitopeniju te se tekst smjernica nalazi  
u tisku u Liječničkom vjesniku. Radna skupina za  
mijelom imala je vrlo uspješan svoj, već tradicional-  
ni, sastanak krajem veljače u Rijeci na kojemu su  
raspravljene i prihvaćene smjernice za liječenje mul-  
tiplog mijeloma. Smjernice su napisane, a da bi se  
objelodanile što prije bit će prvo objavljene u ovom  
broju Biltena.

Znanstvena aktivnost je u porastu što je vidljivo  
sudjelovanjem na kongresima ASH, EBMT, EHA i  
drugim sastancima, posterima, oralnim prezentaci-  
jama ili pozvanim predavanjima, a posebno želim  
istaknuti uspjeh timova na Rebru i u Merkur u  
dobivanju značajnih financijskih sredstava od Hr-  
vatske zaklade za znanost za realizaciju znanstve-  
nih projekata tijekom četiri godine. Na Rebru je to  
projekt “Novi biomarkeri kronične bolesti presatka  
protiv primatelja”, čiji je voditelj doc. dr. sc. Dražen  
Pulanić s predviđenih 250.000 kn godišnje. To je  
novo istraživanje kroničnog GVHD na Rebru nakon

prethodno završenog uspješnog projekta financira-  
nog od Unity Through Knowledge Fund.

Prof.dr.sc. Slobodanka Ostojić Kolonić voditelj-  
ica je projekta financiranog od Hrvatske zaklade za  
znanost „Prognostička vrijednost i dinamika cirku-  
lirajuće mikroRNA u visokorizičnom mijelodispla-  
stičnom sindromu liječenom 5-azacitidinom“. Deta-  
lje o ovim projektima možete pročitati u ovom broju  
Biltena.

Posebno me raduje da je naše novo Društvo za  
hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora koje smo  
osnovali prije godinu dana, u siječnju 2016., aktivno  
i da priprema svoj prvi samostalni kongres. Vjeru-  
jem da će kongres, kao i KROHEM, okupiti sve hr-  
vatske stručnjake koji se bave hematologijom te uz  
strane goste pokazati postignuća hrvatske hemato-  
logije i ostvariti svoju edukacijsku i znanstvenu svrhu.

*Ceterum censeo* Registar treba popunjavati! Tre-  
ba unositi podatke za nove bolesnike sukcesivno,  
čim se postavi dijagnoza bolesti, pa makar samo  
osnovnim podacima kako bi se barem stvorila epi-  
demiološka slika stanja hematoloških bolesti u Hr-  
vatskoj. Također se ne smije zanemariti upisivanje  
podataka praćenja već upisanih bolesnika. Zato  
pozivam na daljnju i pojačanu aktivnost u radu na  
Registru hematoloških bolesti. U Registru je sada  
već upisan značajan broj bolesnika no još uvijek ne  
može dati dobru sliku epidemiologije hematoloških  
bolesti u Hrvatskoj jer se podaci ne upisuju sustavno  
u svim centrima. Posebno se pozivaju mlađi članovi  
na veću aktivnost pri upisivanju novih bolesnika u  
Registar kao i upisivanju podataka o praćenju već  
upisanih bolesnika pogotovo jer je to uvjet njihova  
članstva u KROHEM-u.

Predsjednik KROHEM-a  
Prof.dr.sc. Damir Nemet

## Hrvatske smjernice za liječenje multiplog mijeloma

Sandra Bašić-Kinda<sup>1</sup>, Josip Batinić<sup>1,2</sup>, Dražen Pulanić<sup>1,2,3</sup>, Toni Valković<sup>4</sup>, Delfa Radić-Krišto<sup>3,5</sup>, Inga Mandac Rogulj<sup>5</sup>, Njetočka Gredelj-Šimec<sup>5</sup>, Mario Piršić<sup>6</sup>, Igor Aurer<sup>1,2</sup>, Damir Nemet<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb i Referentni centar Ministarstva zdravstva za multipli mijelom i druge neoplastične poremećaje stanica koje luče imunoglobuline

<sup>2</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>3</sup> Medicinski fakultet Osijek Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku

<sup>4</sup> Zavod za hematologiju, reumatologiju i kliničku imunologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Rijeka, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

<sup>5</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur

<sup>6</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Dubrava.

### UVOD

Radna skupina za multipli mijelom Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM, Referentni centar Ministarstva zdravstva za multipli mijelom i druge neoplastične poremećaje stanica koje luče imunoglobuline\* te Hrvatsko hematološko društvo Hrvatskog liječničkog zbora, izradili su Hrvatske smjernice za liječenje bolesnika s multiplim mijelomom.

### STUPNJEVI PREPORUKE TEMELJEM RAZINE DOKAZA (prema američkom National Comprehensive Cancer Network, NCCN):

#### Kategorija 1:

- Temeljem visoke razine dokaza, gdje postoji jedinstveni NCCN konsenzus o opravdanosti intervencije

#### Kategorija 2A:

- Temeljem niže razine dokaza, gdje postoji jedinstveni NCCN konsenzus o opravdanosti intervencije

#### Kategorija 2B:

- Temeljem niže razine dokaza, postoji NCCN konsenzus o opravdanosti intervencije

#### Kategorija 3:

- Temeljem bilo kakve razine dokaza, postoji veliko NCCN neslaganje o opravdanosti intervencije.

**Sve navedene preporuke su kategorija 2A osim ako nije drugačije navedeno.**

\* Rješenjem Ministarstva zdravstva klasa: UP/I-510-01/16-01/19, Ur.broj: 534-04-1-2/7-17-13 od 23. ožujka 2017. godine Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb dodjeljuje se naziv "Referentni centar Ministarstva zdravstva za multipli mijelom i druge neoplastične poremećaje stanica koje luče imunoglobuline".

### OSNOVNE POJAVNOSTI

#### PLAZMASTANIČNIH DISKRAZIJA

- Solitarni plazmocitom (u kosti ili ekstramedularni)
- Monoklonalna gamopatija neutvrđenog značenja (MGUS)
- Asimptomatski (engl. „smoldering“) mijelom (uključuje stadij I klasifikacije po Durie Salmonu)
- Simptomatski (aktivni) mijelom
- Plazmastična leukemija.

#### SOLITARNI PLAZMOCITOM KOSTI ILI SOLITARNI EKSTRAMEDULARNI PLAZMOCITOM

- Radioterapija 40-50 Gy na tumor +/- kirurško odstranjenje tumora (u slučaju prijeteće frakture ili kompresije na kralježničnu moždinu ili na druge vitalne strukture)
- Obvezno praćenje svakih 3-6 mjeseci s panelom pretraga za simptomatski multipli mijelom
- U slučaju progresije postupak kao kod aktivnog (simptomatskog) mijeloma.

#### MGUS I ASIMPTOMATSKI (“SMOLDERING”, SMM) MULTIPLI MIJELOM (MM)

- **Bez terapije, samo redovito praćenje:**
- **MGUS**
  - U prve dvije godine svakih 6 mjeseci, a kada se isključi brza progresija kasnije jednom godišnje.
- **SMM**
  - Svakih 3-6 mjeseci ovisno o procjeni rizika za progresiju
  - U bolesnika sa smanjenom gustoćom kostiju razmotriti terapiju bisfosfonatom.

## ČIMBENICI LOŠE PROGNOZE

- Stadij prema revidiranom ISS-u (engl. International Staging System)
- Citogenetske abnormalnosti
  - del(13),
  - t(4;14), t(14;16), ili del(17p) (FISH)
- Nizak provedbeni (engl. performance) status
- Cirkulirajuće stanice mijeloma
- Visoka vrijednost serumskog LDH.

## CITOGENETIKA I PROGNOZA

- Standardni rizik (OS 7-10 god)
  - t (11;14), t (6;14) 75%
- Visoki rizik (OS do 3 godine)
  - t (4;14), t (14;16), t (14;20), del17p, 1q21, hipodiploidija 25%

**TABLICA 1. Revidirani ISS sustav.**

Stadij	Definicija
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serumski albumin <math>\geq 35</math> g/L i <math>\beta 2</math>-M <math>\leq 3.5</math> mg/L</li> <li>• Normalan LDH</li> <li>• Bez t(4;14), t(14;16) ili del(17p)</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ni stadij I ni III</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\beta 2</math>-M <math>\geq 5.5</math> mg/L PLUS</li> <li>• povišen LDH ILI</li> <li>• t(4;14), t(14;16) ili del(17p)</li> </ul>

## OPĆI PRINCIPI LIJEČENJA MIJELOMA

- Multipli mijelom je za sada u većine bolesnika neizlječiva bolest, niti jedna terapijska kombinacija nije kurativna, terapija se stoga provodi sekvencijalno.
- Više je različitih i međunarodno prihvaćenih preporuka za najbolju terapiju i najbolji pristup liječenju.
- Načelno, potpuniji i dublji odgovor rezultira duljim trajanjem remisije.
- Trajanje terapije nije točno definirano, ovisi o učinku, no pauze između terapija smanjuju toksičnost i pridonose kvaliteti života bolesnika.
- Pojedine faze terapije se provode do maksimalnog učinka vodeći računa o toksičnosti lijekova.
- Terapijski odgovor treba klasificirati prema aktualnoj preporuci IMWG-a (International Myeloma Working Group).
- Transplantacija matičnih krvotvornih stanica je standard u liječenju bolesnika mlađih od 65 godina (odnosno do 70 godina kod

“fit” bolesnika), a koji su bez značajnih komorbiditeta.

- Konsolidacijska terapija može produbiti odgovor nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica te povećati postotak kompletnih remisija.
- Terapija održavanja rezultira produženjem života bez znakova bolesti i pokazuje trend produženja ukupnog preživljenja, no ostaje otvoreno pitanje toksičnosti dugotrajne terapije i povećane učestalosti sekundarnih tumora (lenalidomid).
- Pri relapsu bolesti, ovisno o vremenu pojave relapsa, vrijedi ponoviti prethodnu terapiju na koju je postignut povoljan odgovor i na koju bolest nije refraktorna.
- Poticati uključivanje bolesnika u klinička istraživanja.
- U bolesnika s refraktornom bolesti nakon više linija terapije, potrebno je nastaviti s potpornom terapijom te provoditi palijativno liječenje vodeći maksimalno računa o kvaliteti života i manjoj toksičnosti terapije.
- U svih bolesnika u svim fazama liječenja inzistirati na dobroj potpornoj terapiji (terapija koštane bolesti, profilaksa venskog tromboembolizma, profilaksa i liječenje infekcija, liječenje anemije, mijelosupresije, liječenje boli).

## CILJEVI PRI UVODNOJ TERAPIJI MIJELOMA KOJI UTJEČU NA IZBOR TERAPIJE

- Cilj je što duže preživljenje do progresije bolesti (engl. Progression Free Survival, PFS) i sveukupno preživljenje (engl. Overall Survival, OS).
- Poboľšati opće stanje bolesnika i postići što bolju kvalitetu života.
- U mlađih bolesnika ne kompromitirati sakupljanje matičnih stanica za transplantaciju, izbjegavati mijelotoksične lijekove (alkilirajući agensi kao melfalan i nitrozourea, lenalidomid ograničeno) jer se kod svih bolesnika preporučuje prikupiti matične hematopoetske stanice za dvije transplantacije.
- Nije jasno definiran najbolji terapijski pristup kojim se postiže navedeni cilj niti duljina trajanja terapije.
- Transplantacija autolognih krvotvornih matičnih stanica (ATKMS) je dio standardne terapije, uloga tandem transplantacije te rane ili kasne transplantacije nije do kraja definirana, preporučuje se rana transplantacija.

- Druga transplantacija preporučuje se kao konsolidacija u bolesnika koji nisu postigli kompletnu remisiju.

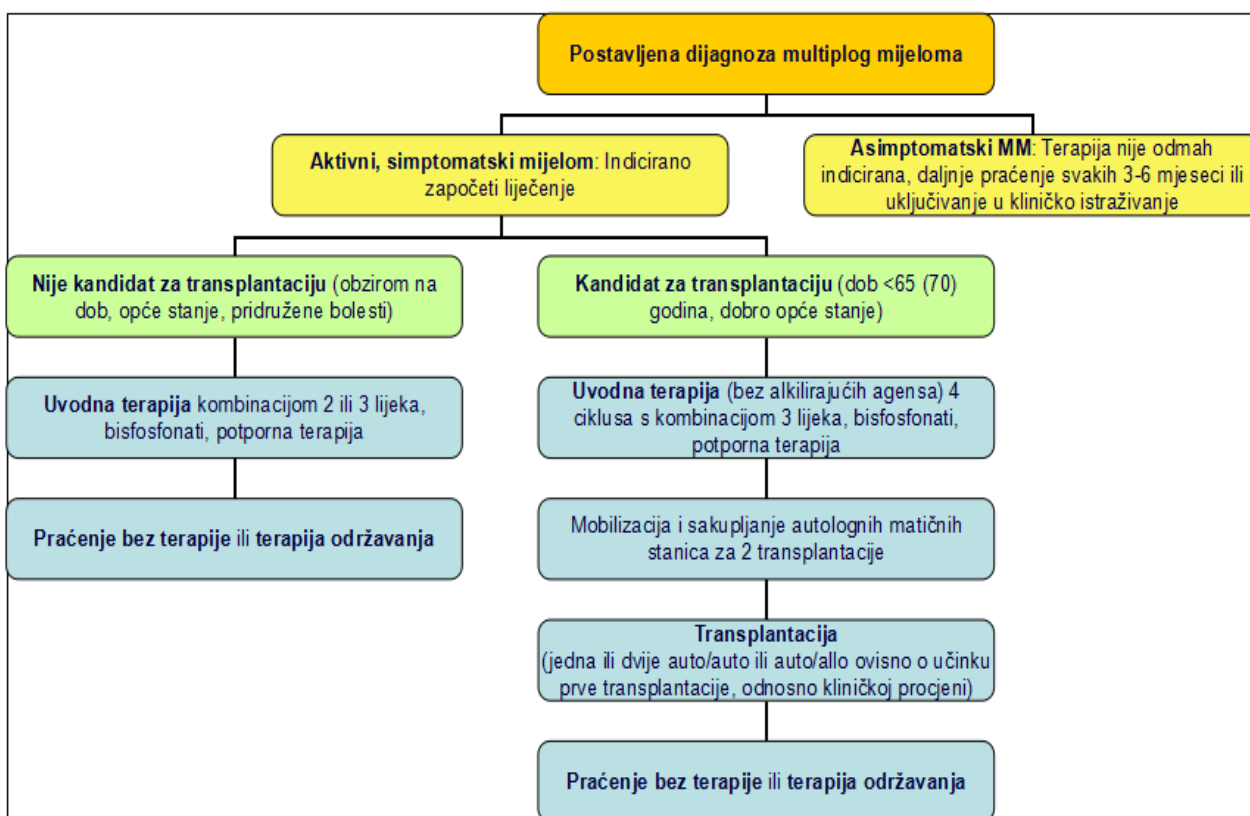
## OPĆI PRISTUP UVODNOJ TERAPIJI MIJELOMA

- Preporuča se primjena protokola s tri lijeka, protokoli s dva lijeka su također prihvatljivi posebno u bolesnika s komorbiditetom i u vrlo starih.
- Primjena melfalana u uvodnoj terapiji je manje pogodan izbor, dolazi u obzir samo u bolesnika

koji nisu kandidati za transplantaciju.

- Dugotrajnija primjena terapije u pravilu rezultira boljim rezultatom liječenja nego kraća primjena, razmotriti obzirom na stanje bolesnika i toksičnost.
- U mlađih bolesnika nakon uvodne terapije s tri lijeka nastaviti liječenje autotransplantacijom.
- Kod dijela bolesnika nakon transplantacije nastaviti terapijom konsolidacije ili održavanja.
- Otvoreno je pitanje trebaju li svi bolesnici održavanje.

SLIKA 1. Algoritam početnog liječenja bolesnika s mijelomom.



## OPĆE PREPORUKE ZA UVODNU TERAPIJU ZA NOVODIJAGNOSTICIRANE BOLESNIKE – KOJI SU PODOBNI ZA ATKMS ( $\leq 65-70$ g)

- Standard indukcijske terapije bolesnika s MM-om koji su podobni za ATKMS je kombinacija tri lijeka (kategorija I).
- U uvodnoj terapiji, obzirom na mogućnosti, preporučuje se kombinacija bortezomiba s talidomidom ili ciklofosamidom i deksametazonom.
- Nakon indukcijske terapije u toj populaciji bolesnika je standard ATKMS (kategorija I).

## UVODNA TERAPIJA ZA NOVODIJAGNOSTICIRANE BOLESNIKE – KOJI SU PODOBNI ZA ATKMS ( $\leq 65-70$ g)

### • PREPORUKA:

- Bortezomib-talidomid- deksametazon (VTD) – kategorija 1
- Bortezomib-ciklofosamid-deksametazon (VCD, CyBorDex)
- Bortezomib-doksorubicin-deksametazon (PAD) – kategorija 1
- + ATKMS x1 ako je postignuta kompletna remisija nakon ATKMS-a
- + Tandem ATKMS ako prvom transplantacijom nije postignuta

### **kompletna remisija i kod bolesnika s visokorizičnom citogenetikom.**

#### **• DRUGI IZBOR:**

- Bortezomib-deksametazon (VD) – kategorija 1 (u bolesnika lošijeg općeg stanja ili u vrlo starih, inače se preporučuje kombinacija tri lijeka)
- Bortezomib-lenalidomid-deksametazon (RVd) – kategorija 1
- Lenalidomid-deksametazon (Rd) – kategorija 1
- Ciklofosfamid-talidomid-deksametazon (CTD)
- Talidomid-deksametazon – kategorija 2B
- Deksametazon – kategorija 2B.

Učinak uvodne terapije procijeniti nakon 2-4 ciklusa, treba biti postignuta najmanje parcijalna remisija (osim u iznimnim slučajevima kada nije moguće postići bolji odgovor, a bolesnik je u stanju podnijeti ATKMS).

Uz terapiju lenalidomidom sakupiti stanice za transplantaciju prije dugotrajne izloženosti lenalidomidu, nakon 3-4 ciklusa.

### **PLAZMASTANIČNA LEUKEMIJA**

#### **• Kod bolesnika podobnih za transplantaciju:**

- Bortezomib+/- IMID+kemoterapija (VTD-PACE, HyperCVAD-VTD, PAD-VCD) x 2-4
- ATKMS +/- alloRIC.

#### **• Kod bolesnika koji nisu kandidati za transplantaciju:**

- Bortezomib+/- IMID (VMP,RVD,VTD, CVD) x 4-8
- Konsolidacija (VTD, RVd) x 2-4
- Održavanje (IMID, bortezomib).

### **MOBILIZACIJA I PRIKUPLJANJE**

- Postupak prikupljanja perifernih matičnih krvotvornih stanica nakon primjene visokih doza ciklofosfamida, uz primjenu G-CSF-a (ili pegiliranog G-CSF-a).
- Cilj prikupljanja je dovoljan broj matičnih stanica za dvije transplantacije (optimalno dva puta po  $\geq 3,5 \times 10^6$  CD 34+/kg tjelesne težine, minimalno dva puta po  $2 \times 10^6$  CD34+/kg tjelesne težine).

Kondicioniranje se provodi melfalanom u ukupnoj dozi od 200 mg/m<sup>2</sup> (140mg/m<sup>2</sup> za starije od 65 godina te one s oštećenjem bubrežne funkcije) primijenjenoj kroz dva dana.

### **UVODNA TERAPIJA ZA BOLESNIKE KOJI NISU PODOBNI ZA TRANSPLANTACIJU - OPĆI PRINCIPI**

- Standard uvodne terapije bolesnika s MM-om koji nisu podobni za ATKMS je trojna terapija temeljena na novim lijekovima (kategorija 1).
- Odabir liječenja treba biti individualiziran prema osobinama bolesnika (dobi, komorbiditetima) (kategorija 1).

### **UVODNA TERAPIJA ZA BOLESNIKE KOJI NISU PODOBNI ZA TRANSPLANTACIJU**

#### **PREPORUKA:**

- Bortezomib-melfalan-prednizon (VMP) – kategorija 1
- Melfalan-talidomid-deksametazon (MPT) – kategorija 1
- Bortezomib-ciklofosfamid-deksametazon (VCD, CyBorD)

- TRAJANJE LIJEČENJA 8-12 ciklusa  
Procjena učinka nakon 2-4 ciklusa.

#### **DRUGI IZBOR:**

- Bortezomib-deksametazon (VD) (u bolesnika lošijeg općeg stanja ili u vrlo starih)
- Bortezomib-talidomid-deksametazon (VTD) (oprez zbog toksičnosti)
- Ciklofosfamid-talidomid-deksametazon (CTD)
- Deksametazon – kategorija 2B
- Talidomid-deksametazon (TD) – kategorija 2B
- Melfalan-prednizon (MP)
- Vinkristin-doksorubicin-deksametazon (VAD) – kategorija 2B.

### **TERAPIJA ODRŽAVANJA I KONSOLIDACIJE**

- Terapija održavanja ispitivana je primjenom talidomida, bortezomiba i lenalidomida.
- Terapija održavanja produžava preživljenje do progresije bolesti (PFS) i produbljuje remisiju.
- Postoji trend produženja ukupnog preživljenja (OS) uz terapiju održavanja, posebice lenalidomidom, ali to pitanje je još otvoreno.
- Iako još nije opće prihvaćena kao standardni dio liječenja, konsolidacijska terapija može produbiti

- odgovor nakon transplantacije krvotvornih matičnih stanica te povećati postotak kompletnih remisija.
- Konsolidacijska terapija može se provesti s nekoliko (2-4) ciklusa liječenja primijenivši isti ili ponešto drugačiji protokol liječenja u odnosu na indukcijsko liječenje.
  - Ako je nakon tandem ATKMS-a postignuta VGPR ili postoji visokorizična citogenetika preporučeno je primijeniti 2-4 ciklusa konsolidacije +/- održavanje.
  - Dugotrajna terapija lijekom za održavanje može rezultirati toksičnošću specifičnom za primijenjeni lijek.
- Periferna neuropatija
  - Mijelosupresija
  - Sekundarne maligne bolesti
  - Smanjena kvaliteta života.
- Nije jasno imaju li svi bolesnici koristi od terapije održavanja (mnogi bolesnici nakon uvodne terapije održavaju dugotrajnu remisiju bez terapije).
  - Nije definirano trajanje terapije održavanja niti najbolji izbor lijeka (ili lijekova).

#### PREPORUKA ZA TERAPIJU ODRŽAVANJA

- Lenalidomid – kategorija 1
- Bortezomib
- Talidomid

**TABLICA 2. Preporuke za smanjenje doze lijekova prema dobi bolesnika.**

LIJEK	<65 GODINA	65-75 GODINA	>75 GODINA
<b>DEKSAMETAZON</b>	40 mg/dan dane 1-4, 15-18 svaka 4 tjedna ili dane 1, 8, 15, 22 svaka 4 tjedna	40 mg/dan dane 1, 8, 15, 22 svaka 4 tjedna	20 mg/dan dane 1, 8, 15, 22 svaka 4 tjedna Kod lošeg PS/ komorbiditeti 10mg/dan 1., 8., 15., 22.dan svaka 4 tjedna
<b>MELFALAN</b>	0.25 mg/kg dane 1-4 svakih 6 tjedana	0.25 mg/kg dane 1-4 svakih 6 tjedana ili 0.18 mg/kg dane 1-4 svaka 4 tjedna	0.18 mg/kg dane 1-4 svakih 6 tjedana ili 0.13 mg/kg dane 1-4 svaka 4 tjedna
<b>CIKLOFOSFAMID</b>	300 mg/dan dane 1, 8, 15, 22 svaka 4 tjedna	300 mg/dan dane 1, 8, 15 svaka 4 tjedna ili 50 mg/dan dane 1-21 svaka 4 tjedna	50 mg/dan dane 1-21 svaka 4 tjedna ili 50 mg/dan svaki drugi dan dane 1-21 svaka 4 tjedna
<b>TALIDOMID</b>	200 mg/dan	100 mg/dan ili 200 mg/dan	50 mg/dan do 100 mg/dan
<b>LENALIDOMID</b>	25 mg/dan dane 1-21 svaka 4 tjedna	15-25 mg/dan dane 1-21 svaka 4 tjedna	10-25 mg/dan dane 1-21 svaka 4 tjedna
<b>BORTEZOMIB</b>	1.3 mg/m <sup>2</sup> bolus dane 1, 4, 8, 11 svaka 3 tjedna	1.3 mg/m <sup>2</sup> bolus dane 1, 4, 8, 11 svaka 3 tjedna ili dane 1, 8, 15, 22 svakih 5 tjedana	1.0- 1.3 mg/m <sup>2</sup> bolus dane 1, 8, 15, 22 svakih 5 tjedana

#### OPĆE PREPORUKE ZA LIJEČENJE BOLESNIKA U RELAPSU NAKON PRETHODNE TERAPIJE

- Ako je remisija trajala više od 12 mjeseci može se primijeniti ista uvodna terapija kao u prethodnoj fazi liječenja.
  - U slučaju da je remisija trajala manje od 12 mjeseci, potrebno je promijeniti skupinu lijekova i to:
    - Terapija temeljena na bortezomibu (kod bolesnika koji nisu liječeni bortezomibom)
    - Terapija temeljena na lenalidomidu (Rd, RCd, VRd, KRd, IxRd, ERd).
  - Ako su već liječeni tj. u slučaju rezistencije na bortezomib i lenalidomid:
    - terapije temeljene pomalidomidu (pom-dex)
    - terapija temeljena na daratumumabu
    - terapije temeljene na karfilzomibu (Kd, KRd)
    - terapije temeljene na iksazomibu (IxRd)
    - terapije temeljene na elotuzumabu (ERd)
    - terapije temeljene na daratumumabu
    - terapije temeljene na bendamustinu.
- Ovisno o dostupnosti lijekova i karakteristikama pojedinog bolesnika.
- U bolesnika koji se ne liječe transplantacijom preporučuje se 8-12 ciklusa terapije ako je učinak povoljan (procjena učinka nakon 2-4 ciklusa terapije).

- ATKMS – razmotriti autolognu transplantaciju ako bolesnik nije liječen transplantacijom u prethodnoj fazi liječenja ili ako je provedena samo jedna transplantacija a odgovor na prethodnu transplantaciju je trajao više od 12 mjeseci.
- ALO-TKMS – razmotriti u mlađih bolesnika, u dobrom općem stanju i bez značajnijeg komorbiditeta, ako su već liječeni TKMS, preporučuje se tandem auto/alo TKS ili u sklopu kliničke studije.
- KONSOLIDACIJA/ODRŽAVANJE – preporuke iste kao i za prethodne faze liječenja, no potrebno je razmotriti stanje bolesnika, prisutne komplikacije već provedenog liječenja (polineuropatija, mijelotoksičnost i sl.), djelotvornost prethodno provedene terapije (trajanje remisije) i rizik toksičnosti dugotrajne terapije.

### **PREPORUKE ZA LIJEČENJE BOLESNIKA U RELAPSU NAKON PRETHODNE TERAPIJE**

Izbor protokola terapije u relapsu ovisi o prethodnoj vrsti terapije i trajanju odgovora na prethodnu terapiju, o prisutnim toksičnim nuspojavama prethodne terapije te o tome je li bolesnik prethodno liječen bez transplantacije, s jednom ili dvije transplantacije kako je navedeno u općim principima te prema dobi i općem stanju (stupanj preporuke 1).

### **PREPORUKA**

- Bortezomib-deksametazon (VD) – kategorija 1 (u bolesnika lošijeg općeg stanja ili u vrlo starih, inače se preporučuje kombinacija tri lijeka)
- Bortezomib-ciklofosfamid-deksametazon (VCD, CyBorDex)
- Bortezomib-talidomid-deksametazon (VTD)
- Bortezomib-lenalidomid-deksametazon (VRD)
- Lenalidomid-deksametazon (Rd) – kategorija 1
- Karfilzomib-deksametazon +/- lenalidomid (kategorija 1)
- Iksazomib-deksametazon +/- lenalidomid – kategorija 1
- Pomalidomid-deksametazon +/-bortezomib
- Protokoli temeljeni na daratumumabu ili elotuzumabu (kategorija 1).

### **DRUGI IZBOR**

- Bendamustin
- Bendamustin-bortezomib-deksametazon
- Bendamustin-lenalidomid-deksametazon

- Bortezomib-liposomalni doksorubicin – kategorija 1
- Talidomid-deksametazon
- Talidomid-ciklofosfamid-deksametazon
- Ciklofosfamid-lenalidomid-deksametazon
- Deksametazon-ciklofosfamid-etopozid-cisplatin (DCEP) (agresivni relaps)
- Deksametazon-talidomid-cisplatin-doksorubicin-ciklofosfamid-etopozid (DT-PACE)+/-bortezomib (VTD-PACE) (agresivni relaps).

### **LIJEČENJE STARIJIH BOLESNIKA U RELAPSU - KOJI NISU KANDIDATI ZA ATKMS**

Za ove bolesnike vrijede iste preporuke što se tiče izbora terapije kao i za sve ostale bolesnike ali posebno vodeći računa o dobi, stanju bolesnika, provedbenom (engl. performance) statusu, komorbiditetu i toksičnim nuspojavama prethodne terapije.

- Odabir liječenja treba biti strogo individualiziran prema ovim osobinama bolesnika vodeći računa o tome da se toksičnost liječenja smanji odnosno ne povećava, te održi kvaliteta života (stupanj preporuke I).
- U svih bolesnika u svim fazama liječenja inzistirati na dobroj potpornoj terapiji (terapija koštane bolesti, profilaksa venskog tromboembolizma, profilaksa i liječenje infekcija, liječenje anemije, mijelosupresije, liječenje boli i dr.).

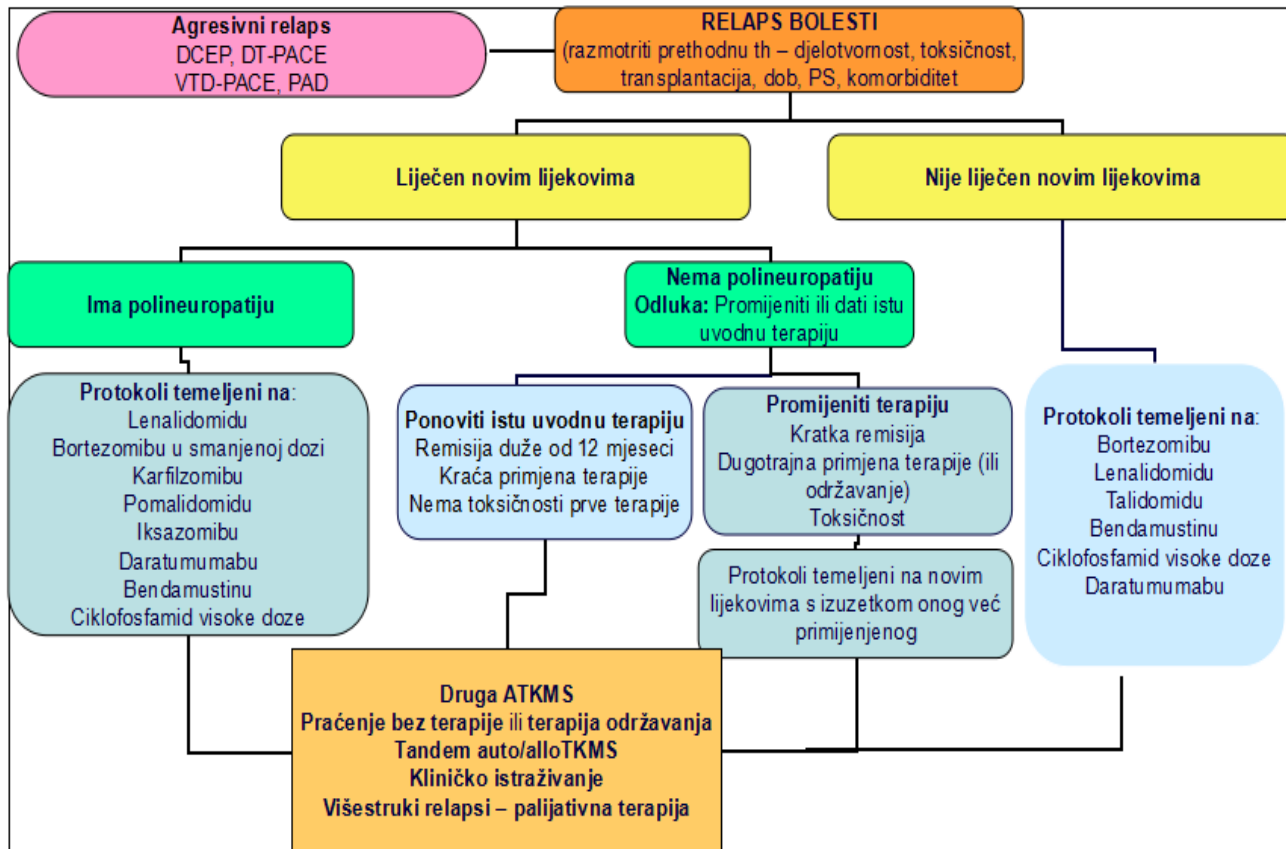
### **BOLESNICI U RELAPSU NAKON DVIJE I VIŠE LINIJA LIJEČENJA I NAKON TANDEM ATKS-a**

Opći principi izbora terapije jednaki su kao i za izbor terapije u prvom relapsu, a ovisе prvenstveno o dotadašnjem liječenju, odgovoru na pojedine agense, toksičnim nuspojavama, dobi i komorbiditetu.

- Ako nisu liječeni bortezomibom – protokoli temeljeni na bortezomibu.
- Ako nisu liječeni lenalidomidom i nisu kandidati za bortezomib – protokoli temeljeni na lenalidomidu.
- Ako su liječeni lenalidomidom i bortezomibom -
  - Bendamustin
  - Pomalidomid (kombinacija s deksametazonom, ili karfilzomibom, ili iksazomibom, daratumumabom)
  - Daratumumab - monoterapija i kombinacije

- Iksazomib (kombinacije sa deksametazonom, pomalidomidom, lenalidomidom, daratumumabom)
- Karflizomib (kombinacije sa deksametazonom, pomalidomidom, lenalidomidom, daratumumabom)
- Elotuzumab – kombinacije
- Melfalan-prednizon (MP)
- VAD
- Ciklofosamid niske doze +/- deksametazon
- Deksametazon/prednizon.

**SLIKA 2. Algoritam liječenja bolesnika s mijelomom u relapsu.**



## ZAKLJUČAK

Liječenje multiplog mijeloma je posljednjih godina doživjelo dramatičan napredak, s nizom novih terapijskih opcija i poboljšanjem ishoda liječenja. Ove smjernice predstavljaju pregled stavova hematološke struke o aktualnim terapijskim mogućnostima u multiplom mijelomu pri čemu u svakodnevnom kliničkom životu treba uzeti u obzir i trenutne mogućnosti liječenja u našoj zemlji. Za očekivati je da će se ove smjernice kao i dostupnost navedenih lijekova vremenom mijenjati i dorađivati kako će se mijenjati i dorađivati spoznaje o daljnjim terapijskim novostima u multiplom mijelomu.

## LITERATURA

1. Arnulf B, Pylypenko H, Grosicki S, et al. Updated survival analysis of a randomized phase III study of subcutaneous versus intravenous bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Haematologica*. 2012;97:1925-1928.
2. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *Intergroupe Français du Myélome*. *N Engl J Med*. 1996;335:91-97.
3. Attal M, Harousseau JL, Facon T i sur. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2495-2502.
4. Attal M, Harousseau JL, Leyvraz S, et al. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006;108:3289-3294.
5. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366:1782-1791
6. Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, et al. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma: follow-up analysis of the IFM 2005-02 trial. *Program and abstracts of the 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition*; December 7-10, 2013; New Orleans, Louisiana. Abstract 406.

7. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH i sur. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood* 1997;89:789-793.
8. Beksac M, Haznedar R, Firatli-Tuglular T, et al. Addition of thalidomide to oral melphalan/prednisone in patients with multiple myeloma not eligible for transplantation: results of a randomized trial from the Turkish Myeloma Study Group. *Eur J Haematol*. 2011;86:16-22
9. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med*. 2014;371:906-917.
10. Brinchen S, Petrucci MT, Larocca A, et al. Carfilzomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a multicenter, phase 2 study. *Blood*. 2014;124:63-69.
11. Broijl A, Sonneveld P. An update in treatment options for multiple myeloma in nontransplant eligible patients. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(13):1945-57.
12. Bruno B, Rotta M, Patriarca F et al. A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *N Engl J Med* 2007;356:1110-1120.
13. Cavo M, Zamagni E, Tosi P, et al. Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma. *Blood*. 2005;106:35-39.
14. Cavo M, Tacchetti P, Patriarca F, et al. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus dexamethasone as induction therapy before, and consolidation therapy after, double autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: a randomised phase 3 study. *Lancet*. 2010a;376:2075-2085.
15. Cavo M, Pantani L, Pezzi A, et al. Superior efficacy of VTD over VCD as induction therapy for autotransplantation-eligible, newly diagnosed, myeloma patients. Program and abstracts of the 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 6-9, 2014; San Francisco, California. Abstract 1979.
16. Child JA, Morgan GJ, Davies FE i sur. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;348:1875-1883.
17. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2007;357:2123-2132.
18. Dimopoulos MA, Kastritis E, Christoulas D, et al. Treatment of patients with relapsed/refractory multiple myeloma with lenalidomide and dexamethasone with or without bortezomib: prospective evaluation of the impact of cytogenetic abnormalities and of previous therapies. *Leukemia*. 2010;24:1769-1778
19. Dimopoulos MA, Lacy MQ, Moreau P, et al. Pomalidomide in combination with low-dose dexamethasone demonstrates a significant progression-free survival and overall survival advantage, in relapsed/refractory MM: a phase 3, multicenter, randomized, open-label study. Program and abstracts of the 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology; December 8-11, 2012; Atlanta, Georgia. Abstract 2744.
20. Dimopoulos MA, Leleu X, Palumbo A, et al. Expert panel consensus statement on the optimal use of pomalidomide in relapsed and refractory multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28:1573-1585.
21. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol* ;17(1):27-38. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00464-7. Epub 2015 Dec 5. (Dimopoulos 2016)
22. Engelhardt M, Terpos E, Kleber M, et al; for the European Myeloma Network. European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2014;99:232-242.
23. Moreau P, San Miguel J, Ludwig H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(suppl 6):vi133-vi137.
24. The US Food and Drug Administration. FDA Drug Safety Communication: Safety review update of cancer drug Revlimid (lenalidomide) and risk of developing new types of malignancies. 2012. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm302939.htm>. Accessed July 13, 2015.
25. Garderet L, Iacobelli S, Moreau P, et al. Superiority of the triple combination of bortezomib-thalidomide-dexamethasone over the dual combination of thalidomide-dexamethasone in patients with multiple myeloma progressing or relapsing after autologous transplantation: the MMVAR/IFM 2005-04 Randomized Phase III Trial from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*. 2012;30:2475-2482.
26. Gay F, Hayman SR, Lacy MQ, Lenalidomide plus dexamethasone versus thalidomide plus dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma: a comparative analysis of 411 patients. *Blood*. 2010;115:1343-1350.
27. Gay F, Cavallo F, Caravita T, et al. Maintenance therapy with lenalidomide significantly improved survival of young newly diagnosed multiple myeloma patients. Program and abstracts of the 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 7-10, 2013; New Orleans, Louisiana. Abstract 2089.
28. Harousseau JL, Attal M, Avet-Loiseau H, et al. Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010;28:4621-4629.
29. Herndon TM, Deisseroth A, Kaminskas E, et al. US Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19:4559-4563.
30. Jain S, Diefenbach C, Zain J, O'Connor OA. Emerging role of carfilzomib in treatment of relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma. *Core Evid*. 2011;6:43-57.
31. Jakubowiak AJ, Siegel DS, Martin T, et al. Treatment outcomes in patients with relapsed and refractory multiple myeloma and high-risk cytogenetics receiving single-agent carfilzomib in the PX-171- 003-A1 study. *Leukemia*. 2013;27:2351-2356.
32. Khan ML, Reeder CB, Kumar SK, et al. A comparison of lenalidomide/dexamethasone versus cyclophosphamide/lenalidomide/dexamethasone versus cyclophosphamide/bortezomib/dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2012;156:326-333.
33. Koreth J, Cutler CS, Djulbegovic B, et al. High-dose therapy with single autologous transplantation versus chemotherapy for newly diagnosed multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:183-196.
34. Krishnan A, Pasquini MC, Ewell M, et al. Tandem autologous hematopoietic stem cell transplants (AuHCT) with or without maintenance therapy (auto-auto) versus single AuHCT followed by HLA matched sibling non-myeloablative allogeneic HCT (auto-allo) for patients with standard risk

- (SR) multiple myeloma: results from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN) 0102 trial. Program and abstracts of the 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 4-7, 2010; Orlando, Florida. Abstract 41.
35. Kumar S, Dispenzieri A, Lacy MQ, et al. Impact of lenalidomide therapy on stem cell mobilization and engraftment post-peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed myeloma. *Leukemia*. 2007;21:2035-2042.
  36. Kumar S, Flinn I, Richardson PG, et al. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood*. 2012;119:4375-4382.
  37. Lacy MQ, LaPlant BR, Laumann KM, et al. Pomalidomide, bortezomib and dexamethasone (PVD) for patients with relapsed lenalidomide refractory multiple myeloma (MM). Program and abstracts of the 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 6-9, 2014; San Francisco, California. Abstract 304.
  38. Lentzsch S, O'Sullivan A, Kennedy R, et al. Combination of bendamustine, lenalidomide, and dexamethasone in patients with refractory or relapsed multiple myeloma is safe and highly effective: results of a phase I clinical trial. Program and abstracts of the 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 4-7, 2010; Orlando, Florida. Abstract 989.
  39. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373:1207-1219.
  40. Lonial S, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373:621-631.
  41. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, et al. Phase II study of daratumumab (DARA) monotherapy in patients with  $\geq 3$  lines of prior therapy or double refractory multiple myeloma (MM): 54767414MMY2002 (Sirius). Program and abstracts of the 51st American Society of Clinical Oncology Annual Meeting; May 29 - June 2, 2015; Chicago, Illinois. Abstract LBA8512
  42. Ludwig H, Kasparu H, Leitgeb C, et al. Bendamustine-bortezomib-dexamethasone is an active and well-tolerated regimen in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2014;123:985-991
  43. Malard F, Harousseau JL, Mohty M. Multiple myeloma treatment at relapse after autologous stem cell transplantation: A practical analysis. *Cancer Treat Rev*. 2017 Jan;52:41-47.
  44. Mateos MV, Oriol A, Martínez-López J, et al. Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol*. 2010;11:934-941.
  45. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2013;369:438-447.
  46. McCarthy PL, Owzar K, Hofmeister CC, et al. Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366:1770-1781.
  47. McCormack PL. Lenalidomide: a review of its continuous use in patients with newly diagnosed multiple myeloma not eligible for stem-cell transplantation. *Drugs Aging*. 2015;32:409-418
  48. Moreau P, Pylypenko H, Grosicki S, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol*. 2011;12:431-440.
  49. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, et al. Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone (CTD) as initial therapy for patients with multiple myeloma unsuitable for autologous transplantation. *Blood*. 2011;118:1231-1238.
  50. Naumann-Winter F, Greb A, Borchmann P, Bohlius J, Engert A, Schnell R. First-line tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation versus single high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in multiple myeloma, a systematic review of controlled studies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;10:CD004626.
  51. Niesvizky R, Flinn IW, Rifkin RM, et al. Phase 3b UPFRONT study: safety and efficacy of weekly bortezomib maintenance therapy after bortezomib-based induction regimens in elderly, newly diagnosed multiple myeloma patients. Program and abstracts of the 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 4-7, 2010; Orlando, Florida. Abstract 619.
  52. Nooka AK, Kastritis E, Dimopoulos MA, Lonial S. Treatment options for relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood*. 2015;125:3085-3099.
  53. Oakervee HE, Popat R, Curry N, et al. PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2005; 129:755-762.
  54. Offidani M, Corvatta L, Maracci L, et al. Efficacy and tolerability of bendamustine, bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed-refractory multiple myeloma: a phase II study. *Blood Cancer J*. 2013;3:e162.
  55. Orłowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, et al. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. *J Clin Oncol*. 2007;25:3892-3901.
  56. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, et al. Revised International Staging System for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015;33:2863-2869.
  57. Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367:825-831.
  58. Palumbo A, Bringhen S, Ludwig H et al. Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood* 2011;118(17): 4519-4529.
  59. Palumbo A, Bringhen S, Rossi D, et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2010;28:5101-5109.
  60. Palumbo AP, Delforge M, Catalano J, et al. Incidence of second primary malignancy (SPM) in melphalan-prednisone-lenalidomide combination followed by lenalidomide maintenance (MPR-R) in newly diagnosed multiple myeloma patients (pts) age 65 or older. Program and abstracts of the 2011 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; June 3-7, 2011; Chicago, Illinois. Abstract 8007.
  61. Palumbo A, Hajek R, Delforge M, et al. Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012;366:1759-1769.

62. Palumbo A, Gay F, Spencer A, et al. A phase III study of ASCT vs cyclophosphamide-lenalidomide-dexamethasone and lenalidomide-prednisone maintenance vs lenalidomide alone in newly diagnosed myeloma patients. Program and abstracts of the 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 7-10, 2013a; New Orleans, Louisiana. Abstract 763.
63. Palumbo A, Mina R. Management of older adults with multiple myeloma. *Blood Rev.* 2013c;27:133-142.
64. Palumbo A, Rajkumar SV, San Miguel JF, et al. International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2014a;32:587-600
65. Palumbo A, Bringhen S, Larocca A, Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: updated follow-up and improved survival. *J Clin Oncol.* 2014b;32:634-640.
66. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2014c ;371 :895-905.
67. Palumbo A, Rossi D, Bringhen S, et al. Weekly carfilzomib, cyclophosphamide and dexamethasone (wCCd) in newly diagnosed multiple myeloma patients: a phase I-II study. Program and abstracts of the 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology; December 6-9, 2014d; San Francisco, California. Abstract 175.
68. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538–548.
69. Rajkumar SV, Rosinol L, Hussein M, et al. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2008;26:2171-2177.
70. Rajkumar SV, Jacobus S, Callander NS, et al. Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:29-37.
71. Rajkumar S, Dimopoulos M, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15:e538-e548.
72. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2005;352:2487-2498.
73. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. Extended follow-up of a phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma: final time-to-event results from the SUMMIT trial. *Cancer.* 2006a;106:1316-1319.
74. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood.* 2007;110:3557-3560.
75. Richardson PG, Weller E, Lonial S, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2010b;116:679-686.
76. Richardson PG, Siegel DS, Vij R, et al. Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. *Blood.* 2014a;123:1826-1832.
77. Richardson PG, Xie W, Jagannath S, et al. A phase II trial of lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and relapsed/refractory myeloma. *Blood.* 2014b;123:1461-1469.
78. Richardson PG, Jagannath S, Moreau P, et al. Final results for the 1703 phase 1b/2 study of elotuzumab in combination with lenalidomide and dexamethasone in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. Program and abstracts of the 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 6-9, 2014c; San Francisco, California. Abstract 302.
79. Richardson PG, Moreau P, Laubach JP, et al. The investigational proteasome inhibitor ixazomib for the treatment of multiple myeloma. *Future Oncol.* 2015;11:1153-1168.
80. Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, et al. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood* 2012;120:1589-1596. R
81. Roussel M, Lauwers-Cances V, Robillard N, et al. Front-line transplantation program with lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination as induction and consolidation followed by lenalidomide maintenance in patients with multiple myeloma: a phase II study by the Intergroupe Francophone du Myélome. *J Clin Oncol.* 2014;32:2712-2717.
82. Sahebi F, Iacobelli S, Biezen AV, et al. Comparison of upfront tandem autologous-allogeneic transplantation versus reduced intensity allogeneic transplantation for multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant.* 2015;50:802-807.
83. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2008;359:906-917.
84. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al. Persistent OS benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2013;31:448-455.
85. San Miguel JI, Weisel K, Moreau P, et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013b;14:1055-1066.
86. Shah N, Callander N, Ganguly S, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma: guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1155-1166.
87. Singh PP, Kumar SK, LaPlant BR, et al. Lenalidomide maintenance therapy in multiple myeloma: a meta-analysis of randomized trials. Program and abstracts of the 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 7-10, 2013; New Orleans, Louisiana. Abstract 407.
88. Song KW, Dimopoulos MA, Weisel KC, et al. Health-related quality of life from the MM-003 trial of pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Haematologica.* 2015;100:e63-e67.
89. Sonneveld P, Broijl. Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Haematol.* 2016; 101: 396-406.
90. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol.* 2012;30:2946-2955.

91. Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosiñol L, et al. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol.* 2013a;31:3279-3287.
92. Sonneveld P, Scheid C, van der Holt B, et al. Bortezomib induction and maintenance treatment improves survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma: extended follow-up of The HOVON-65/GMMG-HD4 trial. Program and abstracts of the 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition; December 7-10, 2013b; New Orleans, Louisiana. Abstract 404.
93. Sonneveld P, Asselberg-Hacker E, Zweegman S, et al. Phase 2 study of carfilzomib, thalidomide, and dexamethasone as induction/consolidation therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 2015;125:449-456.
94. Spencer A, Prince HM, Roberts AW, et al. Consolidation therapy with low-dose thalidomide and prednisolone prolongs the survival of multiple myeloma patients undergoing a single autologous stem-cell transplantation procedure. *J Clin Oncol.* 2009;27:1788-1793.
95. Stewart AK, Trudel S, Bahlis NJ, et al. A randomized phase 3 trial of thalidomide and prednisone as maintenance therapy after ASCT in patients with MM with a quality-of-life assessment: the National Cancer Institute of Canada Clinicals Trials Group Myeloma 10 Trial. *Blood.* 2013;121:1517-1523.
96. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone vs lenalidomide and dexamethasone in patients (pts) with relapsed multiple myeloma: interim results from ASPIRE, a randomized, open-label, multicenter phase 3 study. Program and abstracts of the 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology; December 6-9, 2014; San Francisco, California. Abstract 79.
97. Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2015;372:142-152.
98. Vij R, Siegel DS, Kaufman JL, et al. Results of an ongoing open-label, phase II study of carfilzomib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma (R/R MM). Program and abstracts of the 2010 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology; June 4-8, 2010; Chicago, Illinois. Abstract 8000.
99. Waage A, Gimsing P, Fayers P, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide or placebo in elderly patients with multiple myeloma. *Blood.* 2010;116:1405-1412.
100. Weber DM, Chen C, Niesvizky R, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med.* 2007;357:2133-2142.
101. Wijermans P, Schaafsma M, Termorshuizen F, et al. Phase III study of the value of thalidomide added to melphalan plus prednisone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma: the HOVON 49 Study. *J Clin Oncol.* 2010;28:3160-3166.
102. Zweegman S, van der Holt B, Mellqvist U-H, et al. Randomized phase III trial in non-transplant eligible patients with newly diagnosed symptomatic multiple myeloma comparing melphalan-prednisone-thalidomide followed by thalidomide maintenance (MPT-T) versus melphalan-prednisone-lenalidomide followed by maintenance with lenalidomide (MPR-R): a joint study of the Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hematology Oncology (HOVON) and the Nordic Myeloma Study Group (NMSG). Program and abstracts of the 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology; December 6-9, 2014; San Francisco, California.

## Značaj citomorfološke dijagnostike u sklopu tima za akutne leukemije

Koraljka Gjadrov Kuveždić, Sunčica Ries, Jasenka Antulov, Romina Kanić, Lucija Beljan

Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb

E-pošta: gjadrov@yahoo.co.uk

**UVOD:** Tijekom posljednjih nekoliko godina rastuća potreba za individualiziranom dijagnostikom pojedinih bolesti, molekularnim i genetičkim analizama postepeno umanjuje značaj morfološke u bolestima u kojima je njena dijagnoza značila zlatni standard. U kojoj mjeri se citološka analiza u dijagnostici akutnih leukemija uklapa u ove nove trendove odlučili smo istražiti na primjeru tima za akutne leukemije naše ustanove. Nalazi dobiveni citološkom analizom, imunofenotipizacijom, te citogenetičkim i molekularnim analizama uspoređuju se za svakog pojedinog bolesnika, čime se donosi zaključak tima i odluka o početku liječenja.

**CILJ:** U ovom prikazu istražili smo koliko se citološke analize temeljene na standardnom i citokemijskim bojenju uklapaju u zaključak tima za akutne leukemije, temeljen na nalazima svih primijenjenih dijagnostičkih metoda.

**ISPITANICI I METODE:** U istraživanje su uključeni bolesnici s novootkrivenom akutnom leukemijom, bolesnici u relapsu i bolesnici kod kojih je došlo do progresije ranije poznate hematološke bolesti; o bolesnicima je raspravljano na timu za akutne leukemije u periodu od siječnja 2015. do listopada 2016. godine. Svim bolesnicima rađena je punkcija koštane srži iglom za aspiracijsku punkciju koštane srži 16G; uzroci su raspoređeni na predmetna stakalca (te epruvete za imunofenotipizaciju, genetičke i molekularne analize), bojeni standardnim (May-Greunwald Giemsa, MGG) bojenjem i analizirani sa šest citokemijskih reakcija (reakcija mijeloperoksidaze, Sudan Black B, alfa-naftil-acetat esteraza i inhibicija natrijevim fluoridom, klor-acetat esteraza, periodic acid shiff); u slučaju indikacije uzorci su analizirani i dodatnim citokemijskim reakcijama (oil-red O, kisela fosfataza, kiseli toluidin). Uzorci su potom pregledani svjetlosnim mikroskopom, a citološka dijagnoza postavljena unutar nekoliko sati. U manjem broju bolesnika standardnim bojenjem i citokemijskim reakcijama nije bilo moguće odrediti tip i podtip akutne leukemije te su primijenjene i imunocitokemijske reakcije (LCA, iMPO, CD68,

CD3,CD20, glycophorin, glycoprotein); u tim slučajevima dijagnoza je postavljena sljedećeg dana.

**REZULTATI:** U spomenutom vremenskom periodu održano je 14 sastanaka tima za akutne leukemije i raspravljano o 109 bolesnika, s dijagnosticiranim 100 *de novo* akutnim leukemijama, tri relapsa, pet progresija iz od prije poznatih hematoloških bolesti, te jednim limfomom s leukemijskom slikom bolesti. U 95 bolesnika citološka dijagnoza se u potpunosti uklopila u zaključak tima, u tipu i podtipu akutne leukemije prikazanim u Tablici 1.

**Tablica 1. Slučajevi u kojima se citološka dijagnoza tipa i podtipa akutne leukemije uklapa u završni zaključak tima za akutne leukemije**

tip i podtip akutne leukemije	citološka dijagnoza/ završni zaključak tima za akutne leukemije (n/n)
ALL	17/19
NHL s leukemijskom slikom	1/1
AML iz MPN (3 transformacija)	5/8
AL s citogenetičkom greškom (8 APL)	10/13
AML sa znacima mijelodisplazije	20/22
AML minimalno diferencirana	2/3
AML bez sazrijevanja	4/4
AML sa sazrijevanjem	8/11
AML mijelomonocitna	16/17
AML monocitna/monoblastična	6/6
AML eritro/mijeloidna	2/2
AL s citokemijskim karakteristikama obiju loza	1/2
AML secundaria*	1/1

\*od prije poznata maligna bolest

ALL-akutna limfoblastična leukemija, NHL-non-Hodgkin lymphoma, AML-akutna mijeloidna leukemija, MPN-mijeloproliferativna neoplazma, AL-akutna leukemija

Razlozi kada se citološka dijagnoza nije uklopila u zaključak tima najčešće su se odnosili na slučajeve u kojima smo, prema fenotipskim morfološkim karakteristikama stanica, posumnjali da se radi o akutnoj leukemiji s citogenetičkom promjenom, ili u onima gdje fenotipske karakteristike nisu bile izra-

žene u dovoljnoj mjeri te nismo to dijagnosticirali. U nekoliko slučajeva nejasan nalaz citokemijskih reakcija spriječio nas je da pobliže dijagnosticiramo podtip akutne leukemije, ili udio pojedinih stanica nije zadovoljio kriterije dijagnoze pojedinog podti-

pa (Tablica 2). U 18 slučajeva akutnih mijeloidnih leukemija dostupnim metodama nije dokazana niti jedna citogenetička ili molekularna promjena, te je citološka dijagnoza, uz nalaz imunofenotipizacije, bila zaključna dijagnoza tima.

**Tablica 2. Slučajevi u kojima se citološka dijagnoza ne uklapa u zaključak tima za akutne leukemije**

<b>citološka dijagnoza</b>	<b>završni zaključak tima</b>	<b>razlog «pogrešne» citološke dijagnoze</b>
AML s t(6;9)	AML sa sazrijevanjem	nije dokazana t(6;9)
AML s t(15;17)	AML sa sazrijevanjem	nije dokazana t(15;17)
AML tMPN	ALL tMPN	imunofenotipizacija, citokemijski ANAE+
AML sa sazrijevanjem	AML t(9;11)	citogenetički dokazana promjena
AML sa sazrijevanjem	AML inv(16)	↓20% monocita u uzorku
AML sa sazrijevanjem	AML t(8;21)	bez karakterističnih morfoloških pokazatelja
AL citokemijskim karakteristikama obiju loza	pro-B ALL	agranularni blasti citokemijski ANAE+,PAS+
AML mijelomonocitna	AML sa znacima mijelodisplazije	↑60 blasta, ↑20 monocita, pokoji megakariocit
AML mijelomonocitna	AML sa sazrijevanjem	↑20% monocita u KS i RPK, imunofenotip AML
AML mijelomonocitna	AML tMPN	dokazan bcr/abl
AML mijelomonocitna	AML sa znacima mijelodisplazije	↑60% blasta citokemijski ANAE+inh NaFl, unilinijska displazija
AL	AML minimalno dif.	agranularni blasti citokemijski negativni
AL	pre-B ALL	agranularni blasti citokemijski negativni
ALL	ALL tMPN	agranularni blasti u KS i RPK

AML-akutna mijeloidna leukemija, MPN-mijeloproliferativna neoplazma, tMPN-transformacija mijeloproliferativne neoplazme, AL-akutna leukemija, pro-B ALL-proB akutna limfoblastična leukemija, KS-koštana srž, RPK-razmaz periferne krvi, pre-B ALL-pre-B akutna limfoblastična leukemija, ALL-akutna limfoblastična leukemija

**RASPRAVA:** U eri molekularne dijagnostike te prilagođenih pametnih lijekova svakom bolesniku, citološka dijagnoza temeljena na standardnom bojenju doima se kao metoda prošlog stoljeća. U našem istraživanju u 18/100 novootkrivenih akutnih leukemija dostupnim metodama nije bila otkrivena citogenetička i molekularna promjena. U svih 18 slučajeva radilo se o akutnim mijeloidnim leukemijama (prema podacima recentne literature u oko 30%-50% *de novo* akutnih mijeloidnih leukemija ne otkriva se citogenetička i molekularna promjena). Naše istraživanje doprinosi postavkama da citološka dijagnoza kao prva dijagnoza akutne leukemije može, uz imunofenotipizaciju protočnom citometrijom, omogućiti racionalnu upotrebu metoda kojima se otkrivaju citogenetičke i molekularne promjene. Ako nisu otkrivene citogenetičke i molekularne promjene, citološka dijagnoza je, uz imunofenotipizaciju protočnom citometrijom, završna dijagnoza akutne leukemije.

#### LITERATURA:

1. Vardiman JW, Brunning RD, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Tefferi A i sur. Introduction and overview of classification of the myeloid neoplasms. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ured. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2008. str. 18-30.
2. Heim S, Mitelman F. Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* 1992; 70:1701-9.
3. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol* 2003;119:672-80.
4. Bao L, Wang X, Ryder J, Ji M, Chen Y, Chen H i sur. Prospective study of 174 *de novo* acute myelogenous leukemias according to the WHO classification: subtypes, cytogenetic features and FLT3 mutations. *Eur J Haematol* 2006;77:35-45.

## Registar invazivnih mikoza – projekt kandida

Alen Ostojić, dr.med<sup>1</sup>, prof.dr.sc. Radovan Vrhovac, dr.med.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Zavod za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

<sup>2</sup> Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

E-pošta: aostojic@kbc-zagreb.hr, rvrhovac@mef.hr

Na prethodnom jesenskom sastanku Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti – KROHEM, u sklopu izlaganja Radne skupine za potpornu terapiju, prezentiran je projekt registra invazivne kandidoze. Kao nastavak dobre suradnje na projektu FIND-IA (*engl. Fungal Infection Database – Invasive Aspergillosis*), na inicijativu KROHEM-ove Radne skupine za potpornu terapiju, KROHEM je postao pridruženi član projekta invazivne kandidoze – FIND-IC (*engl. Fungal Infection Database – Invasive Candidosis*). Riječ je o inicijativi Češke leukemijske grupe CELL (*engl. the CzEch Leukemia study group for Life*) koja predstavlja zajedničko nastojanje kolega hematologa iz Republike Češke i Slovačke da u jedinstvenoj bazi podataka objedine slučajeve invazivnih gljivičnih infekcija u bolesnika sa zloćudnim hematološkim bolestima.

Kako se hematološke zloćudne bolesti ubrajaju u skupinu rjeđih zloćudnih bolesti, tako su i invazivne gljivične infekcije koje su svojstvene prvenstveno toj populaciji bolesnika, rijetki klinički entiteti. Invazivne gljivične infekcije (IFI) značajan su uzrok pobola bolesnika s hematološkim zloćudnim bolestima. Iako je s dostupnošću novih protugljivičnih lijekova uspjeh profilakse i liječenja IFI bitno pospješen, IFI i dalje uzrokuju ili pridonose velikom broju smrtnih ishoda kod oboljelih. Jedna od glavnih mjera uspješnog liječenja IFI je pravovremeno otkrivanje i početak liječenja. Uzročnici invazivnih gljivičnih infekcija čine vrlo dinamičan sustav s velikom sposobnošću razvoja rezistencije na primjenjivane protugljivične lijekove, kako u profilaksi tako i u ciljanom liječenju. S obzirom na to, preduvjet za uspješno zbrinjavanje oboljelih od IFI je poznavanje karakteristika mikrookoliša u kojem djelujemo, što podrazumijeva i kontinuirano praćenje stanja rezistencije, selekciju određenih sojeva gljiva i slično.

Najpouzdaniji epidemiološki model proučavanja rijetkih oboljenja je sabiranje pojedinih slučajeva rijetkih oboljenja u međunarodne registre te analiza prikupljenih podataka iz kojih se kontinuirano dobivaju vrijedni podaci primjenjivi u svakodnevno kliničkom radu.

Primarni ciljevi FIND registra su prikupljanje podataka o hematološkim bolesnicima oboljelim od IFI, na temelju kojih se vrši procjena ishoda liječenja, kontinuirano praćenje epidemiologije, primijenjene terapije i njene uspješnosti u liječenju IFI. Također se prate i sojevi uzročnika, te njihova osjetljivost na protugljivične lijekove. Radi osiguranja kvalitete i pouzdanosti podataka, osnovni uvjet za upis pojedinog slučaja IFI je zadovoljavanje kriterija vjerojatne ili dokazane IFI prema EORTC/MSG kriterijima iz 2008. godine (1). Za projekt FIND-IA korištenje kvantitativnog galactomannan testa u dijagnostici također je jedan od preduvjeta jer u velikoj mjeri osigurava razlikovanje invazivne aspergiloze od ostalih invazivnih gljivičnih infekcija. S druge strane, isti uvjet ne vrijedi za projekt registra invazivnih kandidoza. Stoga je pristup potonjem registru dostupan velikoj većini centara koji sudjeluju u radu KROHEM-a. Od jeseni prošle godine FIND-IC registar, kao i FIND-IA već nekoliko godina, ima i hrvatsku inačicu korisničkog sučelja čime je omogućen pristup i KROHEM centrima.

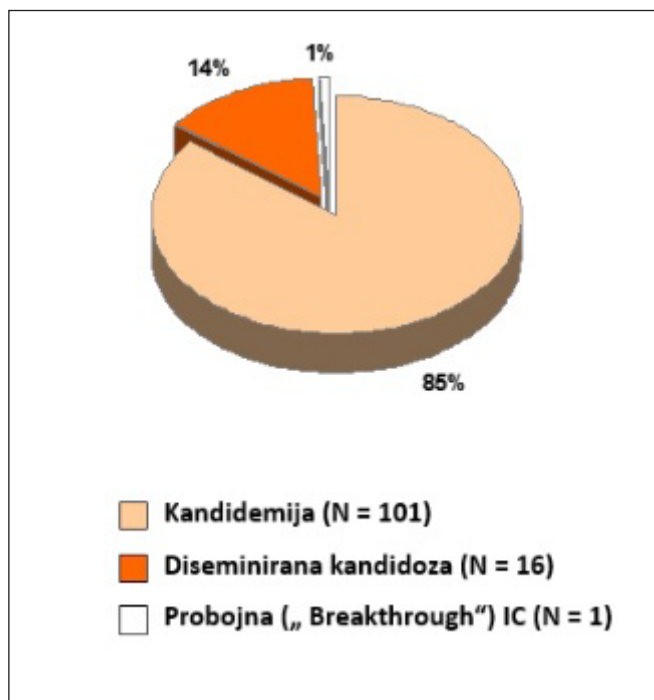
Sve kolege zainteresirane za sudjelovanje u projektu pozivamo da nam se obrate na jednu od navedenih adresa e-pošte, stojimo na raspolaganju za sve upite.

U nastavku izdvajamo izbor iz analize podataka registra invazivnih kandidoza ustupljenih ljubaznošću doc.dr.sc. Luboša Drgoñae, koordinатора projekta FIND-IA. Analizirani su podaci 486 upisanih slučajeva invazivne kandidoze (IC) u razdoblju od 2001. do 2013. godine, a 20% slučajeva imali su razinu dokazane IC.

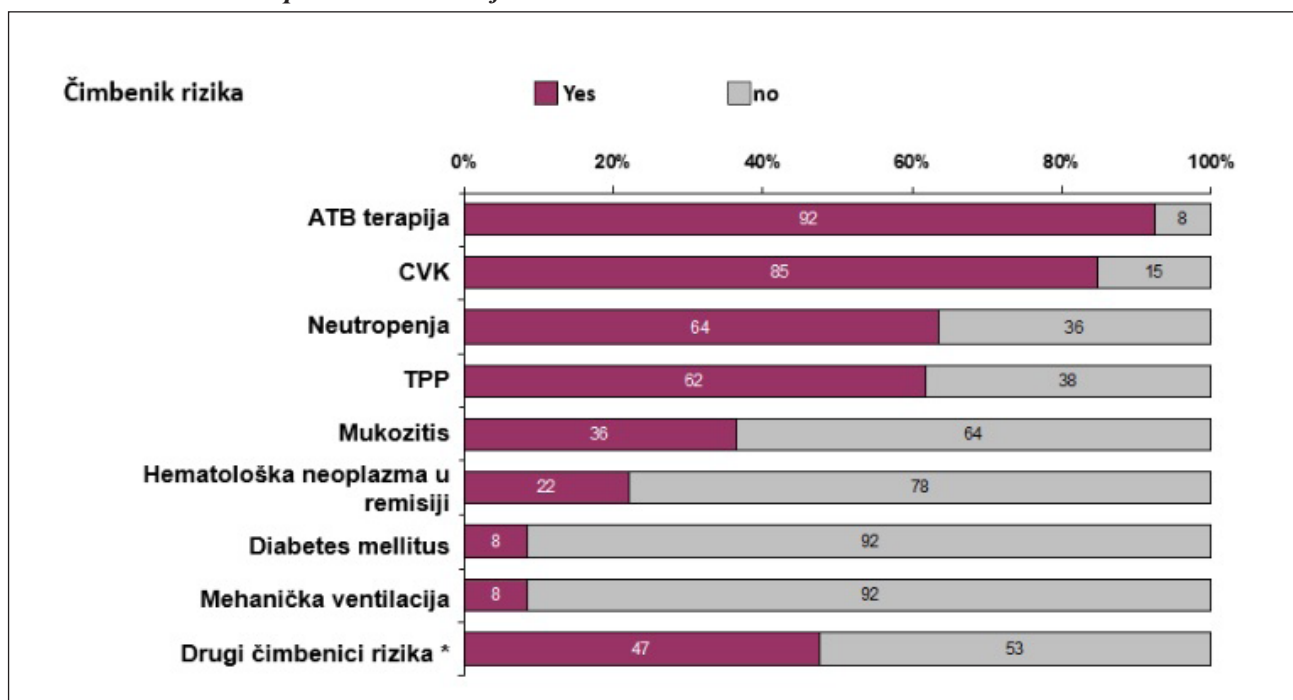
**Slika 1. Sojevi kandidate izolirani kod bolesnika s invazivnom kandidozom**

	N	%
C. albicans	41	34,7 %
C. krusei	26	22,0 %
C. parapsilosis	17	14,4 %
C. tropicalis	14	11,9 %
C. glabrata	9	7,6 %
Ostalo	11	9,3 %
<b>Sve</b>	<b>118</b>	<b>100,0 %</b>

Slika 2. Udio pojedinih kliničkih entiteta invazivne kandidoze



Slika 3. Čimbenici rizika prisutni kod oboljelih od invazivne kandidoze



### Literatura

- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) C. Clin Infect Dis Internet. 2008/05/09. 2008;46(12):1813–21.

## Prognostička vrijednost i dinamika cirkulirajuće mikroRNA u visokorizičnom mijelodisplastičnom sindromu liječenom 5-azacitidinom

Inga Mandac Rogulj<sup>1</sup>, Mirjana Mariana Kardum Paro<sup>2</sup>, Vibor Milunović<sup>1</sup>, Martina Bogeljić Patekar<sup>1</sup>, Ana Planinc-Peraica<sup>1</sup>, Marko Martinović<sup>1</sup>, Goran Rinčić<sup>4</sup>, Ika Kardum-Skelin<sup>3</sup>, Biljana Jelić Puškarić<sup>3</sup>, Gordana Kaić<sup>3</sup>, Zoran Šiftar<sup>2</sup>, Slobodanka Ostojić Kolonić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod za hematologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

<sup>2</sup> Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

<sup>3</sup> Klinički zavod za citologiju i citogenetiku, Klinička bolnica Merkur, Zagreb

<sup>4</sup> Zavod za hematologiju, Klinički bolnički centar „Sestre Milosrdnice“, Zagreb

Kad smo 1. lipnja 2016. godine, prijavili prijedlog projekta „Prognostička vrijednost i dinamika cirkulirajuće mikroRNA u visokorizičnom mijelodisplastičnom sindromu liječenom 5-azacitidinom“ na natječaj Hrvatske zaklade za znanost, osjetili smo olakšanje jer su svi ti radni dani i sati pisanja teksta napokon bili iza nas. Znali smo da smo uložili veliki trud, ali isto tako bili smo svjesni da nema nikakvog jamstva da se baš naš projekt nađe u krugu izabranih.

Stoga nas je razveselila odluka Zaklade u veljači ove godine, da je i naš projekt među 37 odabranih projektnih prijedloga iz područja biomedicine i zdravstva.

U nastavku donosimo radni plan našeg projekta, kao dio izvornog teksta prijavljenog na natječaj.

### Racionalne studije

Za razliku od solidnih malignoma, polje istraživanje mikroRNA (miRNA) u mijelodisplastičnim sindromima je tek u počecima.

Dosadašnji literaturni podaci pokazuju:

1. Izražaj miRNA je promijenjen u MDS-u,
2. MiRNA direktno sudjeluje u specifičnim patogenetskim događajima u MDS-u,
3. MiRNA može imati prognostičku važnost u ishodima i prognozi MDS-a.

Literaturnim pregledom pronašli smo samo 6 originalnih znanstvenih radova o ulozi miRNA u prognozi ovih bolesnika. Samo tri studije su evaluirale cirkulirajuću formu miRNA u kliničkom okruženju MDS-a. Nadalje, samo jedna studija je koristila ovaj biomarker u terapijskom okruženju. U svim studijama, populacija MDS-a je bila heterogena s obzirom na važeće prognostičke indekse u stratifikaciji MDS-a. Broj bolesnika uključen u studije bio je malen. Niti jedna studija nije imala dinamično mjerenje miRNA, odnosno nije pokazana dinamična patogeneza ovog poremećaja preko izražaja miRNA.

Cilj ove studije je s homogenizacijom bolesnika

s MDS-om (IPSS int-2 ili high) te uniformnim liječenjem (5-azacitidin) doprinijeti prognostičkoj važnosti cirkulirajuće miRNA u ovom okruženju koje se tek počinje istraživati. S obzirom na multiple točke mjerenja cirkulirajuće miRNA, pružit ćemo uvid u dinamiku ovog poremećaja. U slučaju pozitivnih rezultata, nastavit ćemo istraživanje miRNA kao biomarkera i čimbenika u patogenetskom mehanizmu u MDS-u. Bitno je istaknuti da je istraživanje transkriptoma zanemareno u ovom području te bi ovo mogla biti jedna od pionirskih studija u ovom području.

### Ciljevi studije

Glavni cilj ove studije je istražiti ekspresiju i dinamiku ekspresije cirkulirajuće miRNA te njezin prognostički značaj u uniformnoj skupini bolesnika s visokorizičnim MDS-om definiranim kao „INT-2“ i „High“ prema IPSS bodovnom sustavu liječenih 5-azacitidinom.

U studiji će biti određivane sljedeće miRNA: let-7-a, miRNA-21, miRNA-144, i miRNA-125a.

Ove miRNA će biti određivane u multiplim vremenskim točkama studije: pri dijagnozi, nakon 4. i 6. ciklusa liječenja 5-azacitidinom, pri relapsu te leukemijskoj transformaciji kako bismo dobili uvid u alteraciju ekspresije cirkulirajućih miRNA zbog uvida u tijek i liječenje MDS-a.

Specifični ciljevi su sljedeći:

1. Usporediti ekspresiju cirkulirajućih miRNA u bolesnika s visokorizičnim MDS-om pri dijagnozi s ekspresijom cirkulirajućih miRNA u zdravih bolesnika,
2. Ispitati povezanost ekspresije cirkulirajuće miRNA s kliničkim i morfološkim karakteristikama bolesnika s visokorizičnim MDS-om pri dijagnozi,
3. Ispitati povezanost ekspresije cirkulirajuće miRNA i njezine dinamike s ukupnim

- preživljenjem definiranim kao vremenski period od dijagnoze do smrti ili zadnje kontrole,
4. Ispitati povezanost ekspresije cirkulirajuće miRNA i njezine dinamike s vremenom bez progresije bolesti definiranim kao vremenski period od dijagnoze do leukemijske transformacije ili datuma zadnje kontrole,
  5. Istražiti učinak liječenja 5-azacitidinom na promjenu ekspresije cirkulirajuće miRNA tijekom liječenja,
  6. Istražiti povezanost ekspresije cirkulirajuće miRNA i njezine dinamike s odgovorom na liječenje 5-azacitidinom definiranim prema Kriterijima međunarodne radne grupe za MDS (Cheson i sur., 2006),
  7. Istražiti povezanost ekspresije cirkulirajućih miRNA i njezine dinamike s hematološkim odgovorom definiranim prema Kriterijima međunarodne radne grupe za MDS (Cheson i sur., 2006),
  8. Usporediti ekspresiju cirkulirajuće miRNA pri dijagnozi i leukemijskoj transformaciji MDS-a.

## Metode

### Ispitanici

U studiju će biti uključeno 40 bolesnika s novootkrivenim MDS-om.

Uključni kriteriji su:

1. MDS visokog rizika definiran prema IPSS bodovnom sustavu („INT-2“ ili „high“)
2. ECOG 0 i 1,
3. Mogućnost toleriranja terapije 5-azacitidinom,
4. Dob veća od 18 godina.

Isključni kriteriji su:

1. MDS niskog rizika definiran prema IPSS bodovnom sustavu („INT-1“ ili „low“) (4),
2. MDS del5q
3. Prisutnost paroksizmalne noćne hemoglobinurije,
4. Sekundarna akutna mijeloična leukemija,
5. Prisutnost aplastične anemije,
6. Mijelodisplastični sindrom/mijeloproliferativni sindrom (MDS/MPS)
7. ECOG 2,3 i 4,
8. Prisutnost druge maligne bolesti,
9. Povijest druge maligne bolesti unazad 5 godina,
10. MDS uzrokovan terapijom,
11. Infekcija hepatitisom C i/ili B,
12. Infekcija virusom humane imunodeficijencije,
13. Nemogućnost toleriranja terapije 5-azacitidinom,

14. Kandidati za alogeničnu transplantaciju matičnih stanica.

U kontrolnu skupinu bit će uključeno 20 zdravih dobrovoljaca definiranih za dob i spol.

### Inicijalna obrada bolesnika s MDS-om

U bolesnika sa sumnjom na MDS bit će učinjena dijagnostička obrada putem dnevne bolnice ili odjela hematologije ustanova uključenih u studiju.

Ona će uključivati sljedeće pretrage prema Hrvatskim smjernicama za dijagnozu i liječenje bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti.

Početna obrada će uključivati kompletnu krvnu sliku, broj retikulocita, biokemijske pretrage (AST, ALT, GGT, LDH, GUK, bilirubin, kreatinin, željezo, UIBC, TIBC, feritin, beta-2-mikroglobulin, elektroforeza serumskih bjelančevina), koncentraciju eritropoetina, vitamina B12 i folne kiseline, leukogram, citološku punkciju koštane srži, biopsiju koštane srži, kariogram, protočnu citometriju, FISH na tumor supresor p53, EKG, ultrazvuk abdomena, RTG srca i pluća, serologiju na HCV, HBV, HIV, CMV i parvo B19 virus.

U slučaju sumnje na sindrom preklapanja učinit će se dodatna obrada na paroksizmalnu noćnu hemoglobinuriju i aplastičnu anemiju. Važno je naglasiti da će aspirat koštane srži biti centralno i neovisno analiziran od strane dvaju citologa djelatnika Zavoda za citologiju i citogenetiku u Kliničkoj bolnici Merkur prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije.

U slučaju potvrdne dijagnoze MDS-a, bolesnici će biti stratificirani po IPSS bodovnom riziku. Dodatna stratifikacija će uključivati bodovni indeks Svjetske zdravstvene organizacije (WPSS) i revidirani IPSS bodovni indeks. S obzirom na to da je MDS bolest starije životne dobi, provest će se i stratifikacija prema komorbiditetima preko „MDS Specific Comorbidity Index“ i „Charlson Comorbidity Index“ bodovnih sustava.

Bolesnici, koji zadovoljavaju ključne kriterije nakon potpisanog informiranog pristanka bit će uključeni u studiju.

### Struktura studije

Svim ispitanicima će se nakon postavljanja dijagnoze visokorizičnog MDS-a uzorkovati periferna krv za analizu cirkulirajuće miRNA. Nakon toga slijedi početak liječenja s 5-azacitidinom u dozi od 75 mg/m<sup>2</sup> kroz 4 ciklusa (trajanje ciklusa je 28 dana). Nakon 4. ciklusa učinit će se procjena aktivnosti

osnovne bolesti koja će uključivati citološku punkciju koštane srži te će se odrediti odgovor s obzirom na kriterije međunarodne radne grupe za MDS. U slučaju progresije bolesti ili stabilne bolesti, liječenje 5-azacitidinom se neće nastavljati te će ti ispitanici ući u praćenje uz najbolje potporno liječenje po odluci nadležnog hematologa. U slučaju kompletnog ili parcijalnog odgovora, liječenje 5-azacitidinom će se nastaviti. Ta procjena aktivnosti bolesti je i druga vremenska točka uzorkovanja periferne krvi za analizu miRNA. Sljedeća vremenska točka uzimanja uzorka za miRNA je procjena aktivnosti bolesti nakon 6 ciklusa 5-azacitidina prema kriteriju međunarodne radne grupe za MDS. U slučaju gubitka odgovora (gubitak kompletne ili parcijalne remisije) bolesnici se neće nastaviti liječiti 5-azacitidinom te ulaze u skupinu praćenja. Bolesnici, koji su zadržali odgovor, nastavit će se liječiti 5-azacitidinom do progresije bolesti (točka uzimanja uzoraka za miRNA) ili neprihvatljive toksičnosti liječenja.

Bolesnici u skupini praćenja će se pratiti individualno ovisno o potrebi za transfuzijom krvnih derivata. U slučaju sumnje na razvoj sekundarne AML učinit će se citološka punkcija koštane srži s uzimanjem uzoraka za protočnu citometriju. Ako se potvrdi leukemijska transformacija, tim ispitanicima bit će uzorkovana krv za analizu miRNA.

Zaključno, uzorkovanje periferne krvi za miRNA će biti u sljedećim vremenskim točkama:

1. Dijagnoza,
2. Nakon 4. ciklusa 5-azacitidina,
3. Nakon 6. ciklusa 5-azacitidina,
4. Nakon progresije bolesti u ispitanika koji su zadržali odgovor nakon 6 ciklusa 5-azacitidina,
5. Pri leukemijskoj transformaciji.

Svi bolesnici će biti praćeni minimalno 2 godine. Zdravim dobrovoljcima će biti uzeta periferna krv samo jednom.

Izdvajanje i purifikacija ekstracelularne mikroRNA (veličine 18 - 100 nukleotida) iz plazme, bit će

učinjena komercijalnim kitom miRNeasy Serum/Plasma Kit (50) (QIAGEN GmbH) prema protokolu proizvođača.

Za detekciju, kvantifikaciju i određivanje profila najznačajnijih miRNA u bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom (MDS) bit će korišten miScript PCR System (QIAGEN GmbH) koji se sastoji od:

- miScript II Reverse Transcription Kit (QIAGEN GmbH),
- miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN GmbH) iCustom miScript miRNA PCR Array (CMIPA9696-12; 8 genes x 12 samples) dizajniran za određivanje profila miRNA let-7-a, miRNA-16, miRNA-21, miRNA-144, miRNA-451, miRNA-651 i miRNA-655.

Za analizu podataka bit će korišten miScript miRNA PCR Array Data Analysis Software kojem se slobodno pristupa putem mrežne stranice <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>. Istovremeno se pristupa miScript miRNA PCR Array Data Analysis Software-u i miScript miRNA PCR Array Data Analysis Excell Template-u u koje se upisuju dobiveni podaci o Ct vrijednostima. Oba se automatski kvantificiraju koristeći DDCt metodu relativne kvantifikacije i interpretiraju rezultate kontrolnih uzoraka, a rezultate prikazuju u nekoliko različitih formata (tablično, grafički, trodimenzionalno).

Studija će se provoditi u sljedećim ustanovama:

1. Zavod za hematologiju, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska,
2. Zavod za hematologiju, Klinički bolnički centar „Sestre Milosrdnice“, Zagreb, Hrvatska.

Planirano trajanje studije je 4 godine. Tijekom prve dvije godine u studiju će biti uključeni ispitanici s pretpostavkom da ćemo uključiti 20 ispitanika godišnje. Kraj studije je definiran kao 2 godine od zadnjeg ciklusa 5-azacitidina posljednjeg uključene bolesnika.



## Imuna trombocitopenija prije kronične mijelomonocitne leukemije - poveznica?

**dr. sc. Zdravko Mitrović, dr. med., prof. dr. sc. Rajko Kušec, dr. med.**

*Zavod za hematologiju*

*Klinika za unutarnje bolesti*

*Klinička bolnica Dubrava, Zagreb*

*i Medicinskii fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

*Adresa autora za dopisivanje:*

*E-pošta: mitrovic@mef.hr*

Imuna trombocitopenija (ITP) je uzrokovana imunom destrukcijom trombocita i njihovih prekursora u koštanoj srži. S druge strane, kronična mijelomonocitna leukemija (CMML) je klonska bolest mijeloidne matične stanice koja u svojim kasnijim fazama može biti praćena trombocitopenijom zbog poremećenog sazrijevanja odnosno potiskivanja megakariocita. Povezanost tih dviju bolesti može biti i slučajna, jer autoimune bolesti se često javljaju u starijoj dobi u kojoj se tipično pojavljuje CMML. Prije nekoliko godina studije na registrima bolesnika s mijelodisplastičkim sindromom (MDS), koji je u ranijim klasifikacijama obuhvaćao i CMML, otkrile su povećanu incidenciju autoimunih bolesti u toj skupini bolesnika u rasponu od 8% do 23% (1,2). Perniciozna anemija nosi 2.4x veći rizik za razvoj MDS-a, reumatoidni artritis 1.7x (1), a bilo koja autoimuna bolest u anamnezi 2.1x (2). U novije vrijeme, do sličnih postotaka došle su studije na manjim skupinama bolesnika (112 odnosno 123 bolesnika), ali samo s CMML-om: autoimune bolesti su bile prisutne u 16% (3) odnosno 19.5% pacijenata (4). Najčešće autoimune bolesti povezan s CMML-om su polimialgija reumatika u 6.3% pacijenata, Hashimotov tireoiditis u 3.6% te imuna trombocitopenija u 2.7% (3). U studiji američkih autora, ITP je bio najčešća autoimuna bolest s pojavnosti od 5.7%, zatim giht s 4.9%, a onda psorijaza u 4.1% pacijenata (4). Relativno velike razlike u incidenciji različitih tipova autoimunih bolesti, ovisne o njihovoj definiciji, npr. neke studije uzimaju reumatske srčane greške kao autoimunu bolest.

Ciljanu povezanost ITP-a i CMML-a retrospektivno je istraživala francuska grupa autora (5). U Francuskom registru za ITP koji broji 565 bolesnika, identificirano je osam bolesnika s ITP-om i CMML-om, a pridodano je još 13 slučajeva opisanih u literaturi. U toj skupini od 21 bolesnika, median dobi bio je 65 godina, 62% su muškarci; najniži

broj trombocita se kretao između 3 i 105  $\times 10^9/L$ , prosječno 30  $\times 10^9/L$ ; prosječan broj monocita bio je 6.9  $\times 10^9/L$ . ITP je demaskirao CMML u 17 slučajeva, u 4 slučaja se CMML razvio kasnije, nakon 16 mjeseci pa čak i devet godina. Svi bolesnici osim jednoga su bili CMML tip-1, a 6 od 16 bolesnika je imalo citogenetske promjene. Kod točno trećine bolesnika bolest se transformirala u akutnu mijeloidnu leukemiju, nakon prosječno 15 mjeseci.

Budući da se CMML među ostalim očituje i trombocitopenijom, postoji dijagnostički izazov kako razlikovati trombocitopeniju zbog CMML-a prema ITP-u kako pri dijagnozi tako i tijekom kasnijeg praćenja. Najvažnije je učiniti punkciju koštane srži s posebnim osvrtom na broj i morfologiju megakariocita. Od koristi mogu biti i antitrombocitna protutijela i eventualna prisutnost drugih autoimunih bolesti. Ako je broj trombocita nizak odnosno bolesnik krvari ili je potreban neki kirurški zahvat, davanje transfuzije trombocita može razjasniti radi li se o pravom ITP-u. Ako postoji imuna komponenta, transfuzije trombocita neće biti učinkovite.

Terapijski pristup ITP-u kontekstu CMML je jednak kao i u ITP-u bez CMML-a. Prva linija liječenja su kortikosteroidi, dok je davanje intravenskih immunoglobulina (IVIG) u ovom kontekstu ipak slabije učinkovito nego kod „običnog“ ITP-a (5). U slučaju neuspjeha daje se rituksimab, imunosupresivi, dapsone, danazol, a neki bolesnici su uspješno splenektomirani. Mogu se dati i agonisti trombopoetinskih receptora, iako zbog njihovog potencijalnog djelovanja na mijelomonocitnu lozu, treba biti oprezan. Terapijski pristup liječenju CMML-a uz ITP je isti kao i bez ITP-a i uključuje hidroksiureju, azacitidin ( $L < 13,0$  prema kriterijima HZZO-a) i alotransplantaciju krvotvornih matičnih stanica za mlađe od 65 godina.

Naposlijetku, može se zaključiti da postoji veza između CMML-a i autoimunih bolesti, dok za ITP i

CMML to i nije sasvim sigurno, jer tumorski monociti i megakariociti mogu biti dio istog klona (trombocitopenija zbog inefektivne hematopoeze). Ako postoji veza, može se pretpostaviti da se CMML razvio kao posljedica imune disregulacije u sklopu ITP-a (proupalni citokini → aktivacija NF-kappaB signalnog puta → slobodni kisikovi radikali → promocija mutageneze i genetske nestabilnosti u k.srži → klonska proliferacija monocita) (3). S druge strane, ITP može biti posljedica CMML-om trigeriranog imunog odgovora (pojačana apoptoza i smanjen klirens apoptotičnih stanica, aktivacija citotoksičnih T-stanica, poremećeno lučenje citokina) (5).

Do sada su u KB Dubrava evidentirana tri bolesnika s istodobno prisutnim CMML-om i ITP-om. Sva tri bolesnika bili su muškarci u dobi od 59 do 72 godine u vrijeme dijagnoze ITP-a. Radilo se o blažoj do umjerenoj trombocitopeniji koja nije zahtijevala liječenje (vrijednosti trombocita su se kretale od 40 do  $100 \times 10^9/L$ ), a dva bolesnika su imala dokazana antitrombocitna protutijela. Nakon 2 do 4 godine dijagnosticiran je CMML. Jedan bolesnik je liječen kratko hidroksiurejom zbog CMML tip-1, a umro je zbog komplikacija prometne nesreće. Drugi bolesnik se transformirao iz CMML-2 u akutnu leukemiju i ubrzo potom umro od krvarenja – nije reagirao na kortikosteroide, IVIG i eltrombopag, a niti na transfuzije trombocita. Najmlađi bolesnik, s CMML tip-2, liječen je azacitidinom nakon čega je planirana alogenična transplantacija koštane srži.

Jesu li značajke i prognoza CMML-a s ITP-om drugačije nego kod CMML-a bez ITP-a za sada nije poznato. No, to daje poticaj za znanstveni pristup tom pitanju u okviru potencijalne Krohemove studije. Potrebno je identificirati pacijente sa svim kliničkim podacima (tijek, obilježja, antitrombocitna protutijela, ostale autoimune bolesti/markeri...), a bilo bi poželjno pohraniti uzorke (koštana srž, periferija) za potencijalne analize koje nisu rutinski dostupne (analiza mutacija, sekvencioniranje, microRNA...).

#### Literatura:

1. Anderson LA, Pfeiffer RM, Landgren O, Gadalla S, Berndt SI, Engels EA. Risks of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *Br J Cancer*. 2009;100:822-8.
2. Kristinsson SY, Björkholm M, Hultcrantz M, Derolf ÅR, Landgren O, Goldin LR. Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011;29:2897-903.
3. Elbæk MV, Sørensen AL, Hasselbalch HC. Chronic inflammation and autoimmunity as risk factors for the development of chronic myelomonocytic leukemia? *Leuk Lymphoma*. 2016;57:1793-9.
4. Peker D, Padron E, Bennett JM i sur. A close association of autoimmune-mediated processes and autoimmune disorders with chronic myelomonocytic leukemia: observation from a single institution. *Acta Haematol*. 2015;133:249-56.
5. Hadjadj J, Michel M, Chauveheid MP, Godeau B, Papp T, Sacre K. Immune thrombocytopenia in chronic myelomonocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2014;93:521-6.

## Očuvanje fertiliteta u hematoloških bolesnika

**Ana Zelić Kerep, dr. med.**

Zavod za hematologiju KBC Zagreb

E-pošta: azelic987@gmail.com

S poboljšanjem preživljenja oboljelih od malignih hematoloških bolesti napuštamo stare izazove i dobivene bitke i nailazimo na nove neosvojene teritorije. Naše liječenje više nije usmjereno samo na uništavanje maligne bolesti, nego i na očuvanje cjelokupne kvalitete života, što uključuje očuvanje fertiliteta u naših bolesnika, koji su nerijetko u generativnoj dobi i koji su donedavno bili u naponu snage, sa svim životnim planovima i ambicijama. Stoga je bitno da ovu temu sagledamo kao dio procesa liječenja u kojem sudjelujemo s našim pacijentima i pacijenticama, kao dio medicine temeljene na dokazima, sa svim svojim spoznajama i ograničenjima.

### Zašto se trebamo baviti očuvanjem fertiliteta u hematoloških bolesnika?

Liječenje hematoloških malignih bolesti je sve uspješnije, te je preživljenje zahvaljujući novim terapijskim mogućnostima i napretku potporne terapije sve bolje. Također, poznato je i da je dob rađanja sve veća (1), što nosi veći rizik od oboljenja od bilo koje bolesti, pa tako i od maligne bolesti. Nadalje, kod žena koje su liječene od maligne bolesti 40% je manje uspješnih trudnoća<sup>2</sup>. Provedena su i istraživanja koja govore u prilog tome da je i kod pacijenata sve veći interes za očuvanjem fertiliteta, što se u cijelom procesu pružanja zdravstvene skrbi uvijek nastoji uzeti u obzir. Također, dokazano je da osobe liječene od leukemije imaju, uz osobe liječene od karcinoma dojke i karcinoma vrata maternice, najniže stope ostvarenih uspješnih trudnoća (2).

### Na koji način maligna bolest utječe na smanjenje fertiliteta u naših bolesnika?

Gubitak fertiliteta u oboljelih od malignih hematoloških bolesti može biti posljedica utjecaja same bolesti, ili može nastupiti zbog gonadotoksičnog učinka kemoterapije ili radioterapije. Sama maligna bolest može infiltrirati reproduktivne organe, te time smanjiti ili u potpunosti onemogućiti reproduktivnu funkciju bolesnika. Lokalna radioterapija zdjelice ili hipotalamične osi, te iradijacija cijelog tijela također imaju negativan utjecaj. Kemoterapija

ima toksičan učinak na germinativni epitel i proizvodnju spermija u muškaraca, efekt koji može biti kratkotrajan ili dugotrajan, ovisno o protokolu liječenja. Kod žena je situacija zamršenija, radi se potencijalnom iscrpljenju ovarijske rezerve i nastupu prerane menopauze u žena kod kojih je provedeno liječenje maligne bolesti. Smatra se da kemoterapija uništava folikule koji su ovisni o gonadotropinima, tj. folikule koji parakrinim mehanizmima stvaraju negativnu povratnu spregu, te time sprječavaju aktivaciju drugih primordijalnih folikula. Ova teorija govori da uništenjem ovih folikula koji su odgovori za negativnu povratnu spregu dolazi do pretjerane aktivacije primordijalnih i primarnih folikula, koji ulaze u atreziju, te se time smanjuje rezerva folikula ovarija. Posljedično tome, raste rizik od prerane menopauze, čak i slučaju povratka cikličke funkcije jajnika.

### Stratifikacija rizika od gubitka fertiliteta

Prema ESMO-u (European Society for Medical Oncology) iz 2013. godine, koje su reevaluirane 2015. godine na sastanku stručnjaka koji se bave očuvanjem fertiliteta u oboljelih od malignih bolesti, rizik se može stratificirati u nekoliko kategorija, ovisno o postotku žena s trajnom amenorejom, odnosno udjelu muškaraca s trajnom azoospermijom. Sličnu stratifikaciju predlažu i ASCO (American Society of Clinical Oncology) iz 2006. godine (3,4).

**Tablica 1. Stratifikacija rizika od gubitka fertiliteta ovisno o načinu liječenja - prilagođeno iz: "Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting". BMC Medicine (2016) 14:1**

STUPANJ RIZIKA/% trajne amenoreje, tj. azoospermije	TIP LIJEČENJA	
	ŽENE	MUŠKARCI
<b>Visok rizik - &gt;80% trajna amenoreja, tj. dugotrajna azoospermija</b>	HSC transplantacija – ciklofosamid/TBI ili ciklofosamid/busulfan; zračenje zdjelice	>2.5 Gy Klorambucil 1.4 g/m <sup>2</sup> Ciklofosamid 19 g/m <sup>2</sup> Prokarbazin 4 g/m <sup>2</sup> Melfalan 140 mg/m <sup>2</sup>
<b>Umjeren rizik – 40-60% žena s trajnom amenorejom; visoka vjerojatnost trajne azoospermije</b>	BEACOPP	Busulfan 600 mg/kg Ifosfamid 42 g/m <sup>2</sup> BCNU 300 mg/m <sup>2</sup>
<b>Nizak rizik - &lt;20% žena s trajnom amenorejom; privremeno smanjenje broja spermija</b>	ABVD u žena starijih od 32 godine CHOP 4-6 ciklusa Antraciklini/citarabin ALL terapija	Doksorubicin 770 mg/m <sup>2</sup> Tiotepa 440 mg/m <sup>2</sup> Citozin arabinozid 1 g/m <sup>2</sup> Vinblastin 50 g/m <sup>2</sup> Vinkristin 8 g/m <sup>2</sup>
<b>Minimalan rizik</b>	ABVD u žena <32 g MTX vinkristin	Bleomicin Dakarbazin Etopozid MTX Mitoksantron Tiogvanin Prednizon

### Metode očuvanja fertiliteta u žena i muškaraca

Za muškarce je standard krioprezervacija sperme, prije samog započinjanja liječenja maligne bolesti, preporučuje se uzeti 1-3 uzorka sperme, što je u većini slučajeva izvedivo. Daljnje opcije kod muškaraca je krioprezervacija tkiva testisa, što je teže izvedivo, te ograničeno mogućnošću infiltracije tkiva testisa malignim stanicama, a i sam postupak nije uvijek tehnički izvediv, tim više što može odložiti početak liječenja.

Za žene je situacija nešto zamršenija, naime, ESMO i ASCO u svojim preporukama navode kao zlatni standard krioprezervaciju oocite ili embrija kao metodu očuvanja fertiliteta u žena kojima predstoji liječenje maligne bolesti. To podrazumijeva protokol stimulacije ovarija, koji standardno traje 2 tjedna, no čak i uz modificirane protokole koji traju 3-5 dana nije moguće odlagati kemoterapiju u hematoloških bolesnika. Uzevši u obzir i same rizike ovarijske stimulacije, kao što je životno ugrožavajuće stanje sindroma hiperstimulacije ovarija, ta metoda često nije metoda izbora za naše bolesnice. Nadalje, transpozicija ovarija u slučaju zračenja zdjelice također nije u potpunosti sigurna metoda, a uključuje kirurški zahvat sa svim svojim komplikacijama, te nosi opasnost infiltracije tkiva ovarija malignim stanicama. Krioprezervaciju tkiva ovarija stručnjaci navode samo u kontekstu liječenja predpubertalnih djevojčica, stoga to nije metoda izbora za naše bole-

snice. Američke smjernice u širem kontekstu očuvanja fertiliteta bolesnicama (a i bolesnicima) preporučuje također posvajanje i surogat majčinstvo.

Jedna od metoda o kojoj se sve više govori, i koja je dokazana studijama na bolesnicama liječenim od karcinoma dojke jest hormonska supresija ovarija. Teorija je da se konkomitantnom primjenom agonista gonadotropin-oslobađajućih hormona suprimira hormonska stimulacija ovarija, čime se smanjuje prokrvljenost tkiva ovarija, imitirajući time predpubertalno stanje. Na takav način čuva se ovarijska rezerva, jer više primordijalnih folikula ostaje netaknuto.

### Trenutne preporuke i smjernice za očuvanje fertiliteta u maligno oboljelih

Na već ranije spomenutom sastanku stručnjaka za očuvanje fertiliteta maligno oboljelih održanom u Italiji 2015. godine raspravljalo se o dosadašnjim dokazima i spoznajama, što je objavljeno 2016. godine (5). Donesene su preporuke na temelju dosadašnjih znanstvenih dokaza, te iskustava istaknutih stručnjaka u ovom polju. Za naglasiti je da većina preporuka nema razinu dokaza veću od III, što je indikator potrebe za dobro dizajniranim velikim randomiziranim kontroliranim studijama i pažljivo određenim ishodima koji će biti evaluirani. Općenito se smatra da je hormonska stimulacija ovarija za potrebe krioprezervacije oocite ili embrija sigurno.

na, i ne povisuje rizik od karcinoma dojke, s iznimkom klomifena. Trudnoća nakon liječenja maligne bolesti smatra se sigurnom, no potrebno je odrediti najbolji trenutak za planiranje trudnoće, imajući na umu teratogenost kemoterapeutika. Vrijeme trudnoće treba biti određeno individualno ovisno o vrsti bolesti i liječenja, te najmanjem riziku od relapsa. Usprkos tome što imamo razrađene sustave za stratifikaciju rizika od gubitka fertiliteta sve bolesnice i bolesnice treba uputiti specijalistu za očuvanje fertiliteta. Prilikom procjene rizika od gubitka fertiliteta osim tipa liječenja i sama dob bolesnika/bolesnice određuje pristup metodama za potencijalno očuvanje reproduktivne funkcije, uz komorbiditete i stanje fertiliteta prije oboljenja.

Studije za sada pokazuju konfliktne rezultate što se tiče kongenitalnih malformacija u djece začete prirodnim putem, od očeva koji su nedavno bili liječeni od maligne bolesti. U ovim preporukama nema vremenskog okvira nakon kojeg se može tvrditi da ne postoji rizik od kongenitalnih malformacija, te je potreban oprez u savjetovanju ovih bolesnika. Već navedene metode krioprezervacije oocite ili embrija smatraju se najučinkovitijom metodom, o ograničenju ovih metoda je već bilo govora.

Upotreba hormonske ovarijske supresije preporučuje se za bolesnice oboljele od karcinoma dojke, i to je najviša razina dokaza i snaga preporuke, IA. Imajući na umu snagu znanstvenih dokaza, dostupnost i minimalno odlaganje početka kemoterapije smatra se da je hormonsku supresiju ovarija potrebno ponuditi kao opciju maligno oboljelim ženama, iako neka društva ovu metodu još uvijek smatraju eksperimentalnom.

Proces očuvanja fertiliteta u maligno oboljelih treba započeti komunikacijom, koja prema ASCO smjernicama nije samo od strane nadležnog liječnika, nego od svih zdravstvenih radnika uključenih u proces pružanja zdravstvene skrbi. Naglašava se psihosocijalna komponenta procesa očuvanja fertiliteta i reproduktivne funkcije, te individualni pristup svakom bolesniku.

Usprkos tome što za hormonsku ovarijsku supresiju raspolažemo s najvišom razinom dokaza i snagom preporuke, naglašava se uloga krioprezervacije oocite i embrija u očuvanju fertiliteta onkoloških bolesnika. Donedavno se smatralo da su dokazi u prilog GnRH u najmanju ruku konfliktni, no nekoliko recentnih studija potvrđuje korist hormonske ovarijske supresije. 2 velike randomizirane kontrolirane studije objavljene su 2015., POEMS-SWOG S0230, te PROMISE-GIM6 (7,8). POEMS-SWOG obuhva-

tila je bolesnice s karcinomom dojke koje su imale pozitivne hormonske receptore, dok je studija PROMISE-GIM6 obuhvatila bolesnice s karcinomom dojke koje su bile negativne na hormonske receptore. U obje studije bolesnice koje su uzimale hormonsku ovarijsku supresiju imale su 70-72% manje zatajenja ovarija, uz značajno povećanje uspješnih trudnoća. U studiji PROMISE-GIM6 bolesnice su praćene 7.3 godine, čime se pokazalo da je došlo do povratka menstrualnog ciklusa u 72.6% bolesnica koje su uzimale GnRH analoge, prema 64% u kontrolnoj skupini. U POEMS-SWOG S0230 studiji od 18 bolesnica koje nisu uzimale GnRH analoge 12 ih je imalo uspješnu trudnoću, dok je od 25 žena koje su uzimale GnRH 22 imalo uspješnu trudnoću, od čega je 18 bilo uspješnih poroda (odds ratio 2.45,  $p < 0.03$ ). 13 metaanaliza je provedeno koje zaključuju da postoji mogućnost koristi od upotrebe GnRH analoga za smanjenje učestalosti prerane menopauze povezane s kemoterapijom. U svom editorijalu objavljenom u časopisu *Future Oncology* Blumenfeld navodi 22 studije koje su pokazale korist od GnRH analoga, u usporedbi s 8 studija koje nisu pokazale korist (6).

### Što je s hematološkim bolesnicima?

Sve do sada navedene studije koje su krovne organizacije istaknule kao relevantne provedene su na bolesnicama oboljelim od karcinoma dojke. Međutim, istraživanja provedena isključivo na hematološkim bolesnicama imaju inkonzistentne rezultate. Istraživanje objavljeno 2007. godine provedeno na bolesnicama oboljelim od Hodgkinovog limfoma, od 30 bolesnica koje su uz kemoterapiju primale GnRH analoge 27 ih je nakon završetka kemoterapije imalo povratak menstrualnog ciklusa, dok je od 26 bolesnica u kontrolnoj skupini 20 razvilo prerano iscrpljenje ovarija (9). Druga studija provedena na 29 žena oboljelih od Hodgkinovog limfoma zaključila je da GnRH ne djeluju protektivno na ovarije, no mogu odgoditi preranu menopauzu povezanu s kemoterapijom (10). S druge strane, German Hodgkin Study Group zaključuje, doduše na samo 10 bolesnica, da nema nikakve koristi od upotrebe GnRH analoga (11). Nerandomizirana prospektivna studija iz 2012. provedena na 83 bolesnice ukazala je da kod bolesnica oboljelih od limfoma koje su podvrgnute autolognoj transplantaciji matičnih stanica ima značajne koristi od GnRH analoga, u smislu smanjenja toksičnosti za ovarije, dok isto nije zaključeno za bolesnice oboljele od leukemije (12). Provedeno je više manjih studija na sličnom broju bolesnica, čiji rezultati ukazuju na slične spoznaje

(13-15). S druge strane, retrospektivna studija objavljena 2016. godine analizirala je 123 bolesnika i bolesnice liječene od Hodgkinovog limfoma ABVD i BEACOPP protokolom, a autori zaključuju da vrsta protokola nije definitivni prediktor gubitka fertiliteta (16). Ono što se posebno ističe je da nakon liječenja ABVD i BEACOPP protokolom zaista jest visok postotak amenoreje, no isto tako je u onih bolesnica koje su pokušale začeti prirodnim putem zabilježen visok postotak uspješnih trudnoća (45.2 % ABVD i 34.6 % BEACOPP grupa). Bolesnice u ovoj studiji nisu dobivale konkomitantno GnRH analoge. Također valja istaknuti studiju objavljenu 2016. godine autora Demeestere et al. u kojoj je praćeno 129 bolesnica tijekom 7 godina nije dokazala korist od GnRH analoge (17).

Za sada znanstveni dokazi upućuju prema potencijalnoj koristi od hormonske ovarijske supresije kao metode očuvanja ovarijske funkcije i fertiliteta, a dostupnost i minimalno odlaganje početka kemoterapije čine GnRH analoge posebno atraktivnima za hematološke bolesnike. Nuspojave su tijekom primjene podnošljive, u vidu navala vrućine, vaginalne suhoće, dok dugotrajna upotreba može dovesti do osteopenije i osteoporoze. Još jedan povoljan učinak je i smanjenje menorigije uzrokovane trombocitopenijom. Međutim, stručnjaci, a i smjernice i dalje predlažu upotrebu više modaliteta očuvanja fertiliteta, uz same GnRH analoge. S obzirom na to da je trudnoća zlatni standard za mjeru očuvanja fertiliteta, a dosadašnja istraživanja nemaju sasvim usporedive rezultate potrebno je provesti veće dugoročne prospektivne studije. Kako sve veći broj znanstvenih dokaza govori u prilog GnRH agonistima, a neke bolesnice već sada imaju na raspolaganju upotrebu GnRH agonista potrebno je razmišljati o nacionalnim smjernicama, da bismo u konačnici pružili najbolju moguću skrb našim bolesnicima. Usprkos, doduše manjem broju, znanstvenih dokaza koji ne govore u prilog GnRH agonistima, treba ih, između ostalog, ponuditi bolesnicima generativne dobi kojima predstoji liječenje maligne bolesti.

#### Literatura:

1. Matthews TJ, Hamilton BE. First births to older women continue to rise. NCHS Data Brief. 2014 May;(152):1-8.
2. Stensheim H, Cvancarova M, Møller B, FossåSD. Pregnancy after adolescent and adult cancer: a population-based matched cohort study, *Int J Cancer*, 2011, vol. 129(pg. 1225-1236) <https://doi.org/10.1002/ijc.26045>
3. Loren AW et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update *J Clin Oncol*. 2013 Jul 1;31(19):2500-10. doi: 10.1200/JCO.2013.49.2678. Epub 2013 May 28.
4. Peccatori FA et al. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013 Oct; 24 Suppl 6:vi160-70. doi: 10.1093/annonc/mdt199. Epub 2013 Jun 27.
5. Lambertini M, Del Mastro L, Pescio MC, Andersen CY, Azim Jr HA, Peccatori FA et al. Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. *BMC Medicine* (2016) 14:1 DOI 10.1186/s129216-015-0545-7
6. Blumenfeld Z. Editorial: Endocrine prevention of chemotherapy-induced ovarian failure. *Future Oncology* July 2016, Vol. 12, No. 14, Pages 1671-1674, DOI 10.2217/fon-2016-0182
7. Lambertini M, Boni L, Michelotti A et al. GIM Study Group. Ovarian suppression with triptorelin during adjuvant breast cancer chemotherapy and long-term ovarian function, pregnancies, and disease-free survival: a randomized clinical trial. *JAMA* 314 (24), 2632–2640 (2015)
8. Moore HCF, Unger JM, Phillips K A et al. Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 372 (10), 923–932 (2015).
9. Castelo-Branco C, Nomdedeu B, Camus A, et al. Use of gonadotropin-releasing hormone agonists in patients with Hodgkin's disease for preservation of ovarian function and reduction of gonadotoxicity related to chemotherapy. *Fertil Steril*. 2007; 87:702-705.
10. Giuseppe L, Attilio G, Edoardo DN, et al. Ovarian function after cancer treatment in young women affected by Hodgkin disease (HD). *Hematology*. 2007; 12:141-147
11. Behringer K, Wildt L, Mueller H et al. German Hodgkin Study Group. No protection of the ovarian follicle pool with the use of GnRH-analogues or oral contraceptives in young women treated with escalated BEACOPP for advanced-stage Hodgkin lymphoma. Final results of a phase II trial from the German Hodgkin Study Group. *Ann Oncol* 2010; 21: 2052–2060.
12. Blumenfeld Z, Patel B, Leiba R et al. Gonadotropin releasing hormone agonist may minimize premature ovarian failure in young women undergoing autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril* 2012; 98: 1266–1270.
13. Blumenfeld Z, Avivi I, Eckman R et al. Gonadotropin releasing hormone agonist decreases chemotherapy induced gonadotoxicity and premature ovarian failure in young female patients with Hodgkin lymphoma. *Fertil Steril* 2008; 89: 166–173
14. Falorio S, Angrilli F, Fioritoni G, et al. Gonadotropin-releasing hormone analog treatment for the prevention of treatment-related ovarian failure and infertility in women of reproductive age with Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49: 1087-1093.
15. Huser M, Crha I, Ventruba P, et al. Prevention of ovarian function damage by a GnRH analogue during chemotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Hum Reprod*. 2008; 23:863-868
16. Boltežar L, Pintarić K, Jezeršek Novaković B. Fertility in young patients following treatment for Hodgkin's lymphoma: a single center survey. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(3):325-333. doi:10.1007/s10815-015-0636-6.
17. Demeestere I et al. No Evidence for the Benefit of Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist in Preserving Ovarian Function and Fertility in Lymphoma Survivors Treated With Chemotherapy: Final Long-Term Report of a Prospective Randomized Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Aug 1; 34(22):2568-74. doi: 10.1200/JCO.2015.65.8864. Epub 2016 May 23.

## Transplantacija od poluidentičnog darivatelja – iskustva KBC Zagreb

**Doc. dr. sc. Nadira Duraković, dr. med.**

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb  
Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

E-pošta: nadira.durakovic@mef.hr

U posljednjih desetak godina, ulaskom kondicioniranja reduciranog intenziteta u širu medicinsku praksu, liječenje bolesnika alogeničnom transplantacijom krvotvornih matičnih stanica postalo je dostupno je većem broju bolesnika, prije svega starijim bolesnicima, kao i onima s komorbiditetima. No i dalje smo uvelike ograničeni dostupnošću darivatelja. Naime, računa se da samo 25% bolesnika ima HLA identičnog srodnog darivatelja, u našoj populaciji otprilike 70% ima dostupnog HLA identičnog nesrodnog darivatelja. Dostupnost nesrodnih HLA-podudarnih darivatelja još je manja u populacijama velike etničke raznolikosti, pa se tako već desetljećima pokušavaju iznaći dobre opcije u kojima bi se koristili takozvani «alternativni» darivatelji, haploidentični darivatelji odnosno matične stanice pupkovine. Transplantacija od haploidentičnog darivatelja osobito je privlačna opcija; gotovo svi bolesnici imaju dostupnog haploidentičnog darivatelja. Ipak, s obzirom na činjenicu da je HLA nepodudarnost na toj razini uz standardno kondicioniranje nosilo više problema u obliku učestalog odbacivanja odnosno neprihvatljivo visoke incidencije bolest presatka protiv primatelja (GVHD od *engl. Graft-versus-host disease*), rijetko je haploidentična transplantacija bila konačni izbor. U nekoliko centara su pokušali dizajnirati kondicioniranje u haploidentičnoj transplantaciji tako da su u pokušaju da smanje postotak odbacivanja primjenjivali vrlo intenzivno mijeloablativno kondicioniranje, dok su incidenciju GVHD-a (ujedno i odbacivanje) pokušali prevenirati primjenom visokih doza selekcioniranih CD34+ stanica. I uistinu, postigli su zadovoljavajući postotak prihvata transplantata uz prihvatljivu incidenciju GVHD-a ali uz cijenu niskog preživljenja bez znakova bolesti (1). Pravu revoluciju na polju haploidentične transplantacije, ne samo radi mogućnosti korištenja haploidentičnih darivatelja već radi postavljanja nove paradigme i načina razmišljanja u prevenciji GVHD-a donosi skupina iz Baltimorea koja 2002. godine publicira prve kliničke podatke (2) a 2008. objavljuje rezultate centra u Baltimoreu i centra u Seattlu (3). Pristup

je revolucionaran utoliko što omogućava selektivnu depleciju izrazito aloreaktivnih T stanica dok istovremeno očuva imunost protiv infekcija i maligne bolesti. I u tu svrhu koristi infuziju ciklofosfamida u visokoj dozi 3. i 4. dan nakon transplantacije. Ciklofosfamid se inače uvelike koristi u kondicioniranju prije transplantacije, u svrhu supresije primateljevog imunološkog odgovora i prevencije odbacivanja. No koliko je sigurna upotreba ciklofosfamida u visokim dozama nakon transplantacije? Ustvari dosta sigurna. Hematopoetska matična stanica izražava visoku razinu aldehid dehidrogenaze, enzima odgovornog za staničnu rezistenciju na ciklofosfamid, dok su B i T limfociti, te NK stanica iznimno su osjetljive na citotoksične učinke ciklofosfamida upravo zato što ne posjeduju istu visoku razinu aldehid dehidrogenaze (4). Tako je npr. moguće da nakon primjene ciklofosfamida u sličnim dozama u terapiji autoimunih bolesti dolazi do kompletnog oporavka hematopoeze (5).

Također, otprije je poznata vrijednost ciklofosfamida (Cy) u prevenciji odbacivanja transplantata u animalnim modelima ako se primijeni NAKON transplantacije. Tako je 1963.g Berenbaum pokazao da Cy produžuje preživljenje alogeničnih kožnih presadaka u miševa, osobito ako se lijek primijeni 1-3 dana nakon transplantacije (6); Santos i Owens su pokazali da Cy suprimira incidenciju i težinu GVHD-a u štakora nakon infuzije stanica slezene (DLI), osobito ako se primijeni 2 dana nakon DLI (7), dok su Mayumi i sur. uspjeli inducirati toleranciju za non-MHC odnosno “minor“ MHC antigene tako da primjene infuziju stanica slezene (infuziju darivateljevih limfocita, DLI), potom Cy nakon 2-3 dana – životinje su postale tolerantne na alogenične stanice (imale su trajan darivateljev kimerizam), ali su bile sposobne odbaciti kožne presatke od trećih darivatelja (8). Čini se da je “tajna” u vremenski pravilnoj primjeni u odnosu na transplantaciju, što je razrađeno u animalnim modelima, kako u pitanju doze tako i u pitanju vremena aplikacije: naime vrlo je bitno primijeniti dovoljno visoku dozu ciklofosfamida i u relativno uskom vremenskom prozoru.

Nakon infuzije transplantata izrazito aloreaktivne T stanice prepoznaju strane HLA molekule na dendritičkim stanicama primatelja, bivaju aktivirane u Th1 smjeru i započinju proliferaciju koja je najsnažnija trećeg dana nakon transplantacije. Ako se tada primijeni ciklofosamid on zapravo uzrokuje klonalnu deleciju visoko aloreaktivnih klonova, dok su ne-aloreaktivni T limfociti pošteđeni. Tako ciklofosamid sprječava ne samo odbacivanje već i GVHD.

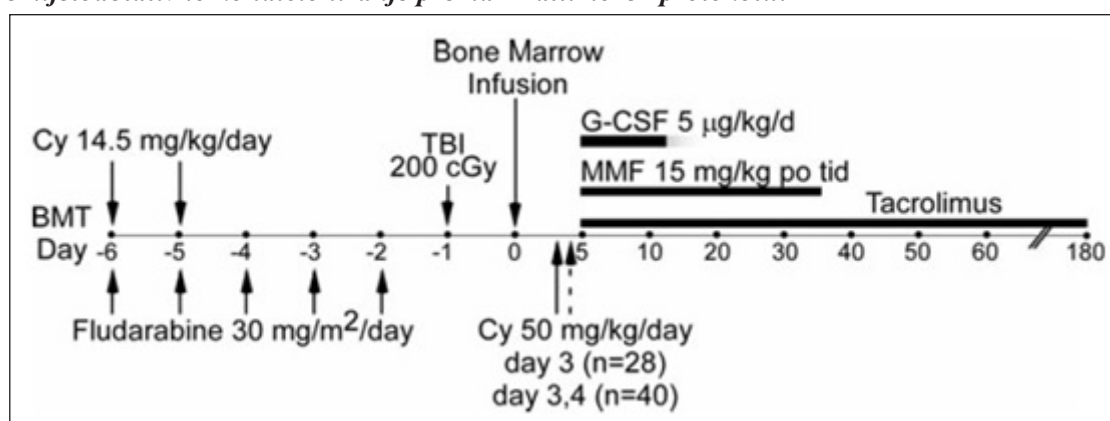
Prvi objavljeni rezultati bili su ohrabrujući: uz odbacivanje u 13% bolesnika zabilježena je kumulativna incidencija GVHD gradusa II-IV i III-IV nakon 200 dana od 43% i 6%, dok je kumulativna incidencija mortaliteta nevezanog uz relaps iznosila 15% a relapsa nakon 1 godine 51%. Ukupno preživljenje i preživljenje bez događaja iznosili su 36% i 26% nakon 2 godine. Također je pokazan trend niže kumulativne incidencije cGVHD-a u bolesnika koji su dobili 2 doze ciklofosamida, što je nađeno i u kasnijim studijama (3). Kasnije studije pokazale su da, za razliku od nesrodne transplantacije kada razlike u HLA stupnju kompatibilnosti donose izraziti porast incidencije GVHD, to u ovoj vrsti transplantacije nije slučaj: veća HLA inkompatibilnost nije značila i veću incidenciju GVHD-a (9). Do danas su brojni centri objavili svoja iskustva u primjeni haploidentične transplantacije. Iako nisu dostupni rezultati usporednih randomiziranih studija, retrospektivne analize, kao ona Raiola i suradnika, govore u prilog tvrdnji da je haploidentična transplantacija jednako vrijedna

u pogledu incidencije GVHD-a, mortaliteta povezanog s transplantacijom, incidencije relapsa osnovne bolesti i ukupnog preživljenja (10).

U KBC-u Zagreb smo u periodu od 2012. do kraja 2016. učinili ukupno 17 haploidentičnih transplantacija u 16 bolesnika, od čega 12 u posljednje dvije godine. Analizirali smo podatke 16 transplantacija kod kojih je u trenutku analize proteklo više od 100 dana od transplantacije.

Medijan dobi iznosio je 40 godina (raspon 22-63 godine), devet bolesnika su bile žene, 7 muškarci. Predominantno su bolesnici transplantirani radi akutne mijeloične leukemije (n=10), 2 transplantacije (u jednog bolesnika) učinjene su radi kronične mijeloične leukemije, 3 radi Hodgkinove bolesti i jedna radi akutne mijeloične leukemije. Darivatelji su u 6 transplantacija bili brat odnosno sestra, u 5 transplantacija dijete, u 4 transplantacije majka te u jednoj transplantaciji otac. U 12 transplantacija bolesnici su kondicionirani tzv «Baltimore» nemijeloablativnim protokolom (Slika 1.), dok smo u 4 slučaja primijenili mijeloablativno kondicioniranje koristeći standardni BuCy protokol. Sljedeći originalnu ideju transplantacije predominantno smo koristili koštanu srž kao izvor transplantata (n=13), pri čemu smo pokušavali transplantirati najmanje  $4 \times 10^8$  stanica s jezgrom/kg tjelesne težine primatelja, što nam je uglavnom i polazilo za rukom: medijan stanica s jezgrom transplantata iznosio je  $5.13 (1.84 - 8.21) \times 10^8/\text{kgTT}$ .

**Slika 1. Nemijeloablativno kondicioniranje prema «Baltimore» protokolu.**

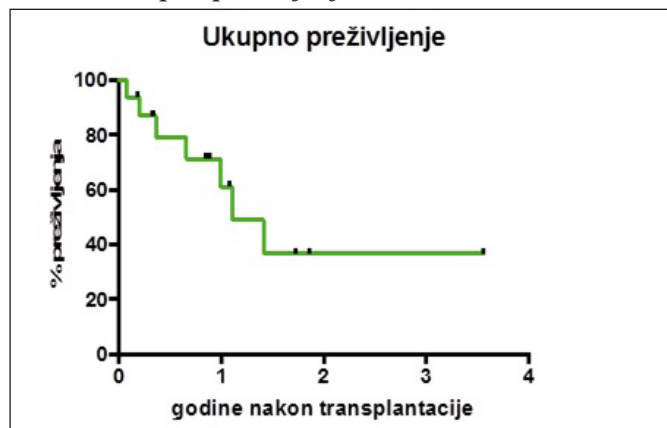


U dva slučaja (12.5%) zabilježili smo odbacivanje transplantata, jedan bolesnik je transplantiran ponovno, od istog darivatelja ali nakon intenzivnijeg kondicioniranja te koristeći periferne matične stanice, dok je druga bolesnica imala pozitivna donor-specifična protutijela i nije se pokušalo učiniti drugu transplantaciju s obzirom na to da nije ima-

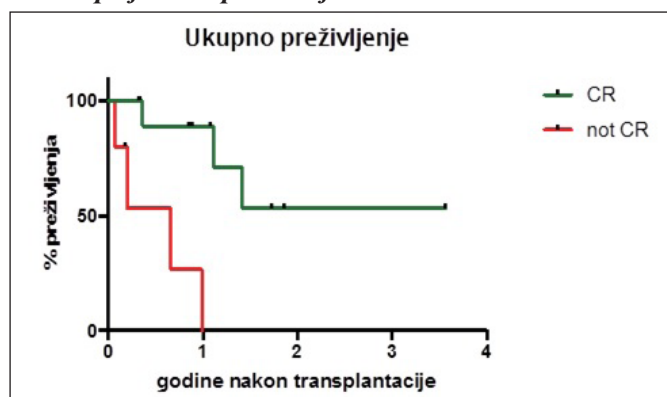
la alternativnog darivatelja. Jedan bolesnik je kod oporavka imao relaps osnovne bolesti. U ostalih 13 oporavak hematopoeze nakon transplantacije bio je zadovoljavajući: oporavak neutrofila uslijedio je nakon 21.5 dana (raspon 13 – 30), dok je oporavak trombocita neovisan o transfuzijama uslijedio nakon medijana od 28 dana (raspon 12 – 45). Incidencija

akutnog GVHD bila je relativno niska, 3 od 13 bolesnika (23%) imali su aGVHD. Napomenuti svakako moramo da su dva bolesnika razvila aGVHD nakon što su dobili DLI, jedan radi relapsa, drugi radi gubitka kimerizma. Kronični GVHD zabilježen je u dva bolesnika (15%). Medijan ukupnog preživljenja naše skupine bolesnika iznosio je 1.1 godinu (Slika 2), uz statistički značajno dulje preživljenje u skupini bolesnika koji su transplantirani u kompletnoj remisiji u usporedbi s onima koji su imali rezidualnu bolest u trenutku transplantacije (Slika 3,  $p=0.001$ ).

**Slika 2. Ukupno preživljenje.**



**Slika 3. Ukupno preživljenje u odnosu na stanje bolesti prije transplantacije.**



Iako je naša skupina transplantiranih bolesnika malena, iskustvo koje sada imamo u ovoj vrsti transplantacije vrlo je dragocjeno. Sasvim suvereno sada možemo ustvrditi da je haploidentična transplantacija uz primjenu poslijetransplantacijskog ciklofosfamida provediva, tehnološki nezahtjevna transplantacija, koja nam omogućava da većem broju bolesnika ponudimo transplantaciju kao jednu od opcija kada razmatramo terapijski plan; koja donosi skraćeno vrijeme potrage za darivateljem, i koja u konačnici bolesnicima nudi jednaku mogućnost uspješne transplantacije uz usporedive rizike u odnosu na transplantaciju od HLA srodnog podudarnog ili nesrodnog darivatelja.

## Literatura:

1. Reisner Y, Martelli MF. Tolerance induction by 'megadose' transplants of CD34+ stem cells: a new option for leukemia patients without an HLA-matched donor. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 536–541.
2. O'Donnell P V, Luznik L, Jones RJ, Vogelsang GB, Leffell MS, Phelps M *et al.* Nonmyeloablative bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched related donors using posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; **8**: 377–86.
3. Luznik L, O'Donnell P V, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M *et al.* HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; **14**: 641–50.
4. Jones RJ, Barber JP, Vala MS, Collector MI, Kaufmann SH, Ludeman SM *et al.* Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 1995; **85**: 2742 LP-2746.
5. Brodsky R, Petri M, Smith B, Seifter E, Spivak J, Styler M *et al.* Immunoablative High-Dose Cyclophosphamide without Stem-Cell Rescue for Refractory, Severe Autoimmune Disease. *Ann Intern Med* 1998; **129**: 1031–1035.
6. Berenbaum M, Brown I. Prolongation of homograft survival in mice with single doses of cyclophosphamide. *Nature* 1963; **200**: 84.
7. Santos G, Owens A. Production of graft-versus-host disease in the rat and its treatment with cytotoxic agents. *Nature* 1966; **210**: 139–40.
8. Mayumi H, Himeno K, Tokuda N, Nomoto K. Drug-induced tolerance to allografts in mice. VII. Optimal protocol and mechanism of cyclophosphamide-induced tolerance in an H-2 haplotype-identical strain combination. *Transpl Proc* 1986; **18**: 363–9.
9. Kasamon YL, Luznik L, Leffell MS, Kowalski J, Tsai H-L, Bolaños-Meade J *et al.* Nonmyeloablative HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation with High-Dose Posttransplantation Cyclophosphamide: Effect of HLA Disparity on Outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; **16**: 482–489.
10. Raiola AM, Dominiotto A, di Grazia C, Lamparelli T, Gualandi F, Ibatci A *et al.* Unmanipulated Haploidentical Transplants Compared with Other Alternative Donors and Matched Sibling Grafts. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 1573–1579.

## Uloga gena HLA-DPB1 u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica

Marija Maskalan<sup>1</sup>, Marija Burek Kamenarić<sup>1</sup>, Ranka Serventi-Seiwerth<sup>2</sup>, Katarina Štingl Janković<sup>1</sup>, Mirta Mikulić<sup>2</sup>, Renata Žunec<sup>1</sup>, Nadira Duraković<sup>2</sup>, Zorana Grubić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Odjel za tipizaciju tkiva, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb

<sup>2</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Marija Maskalan, mag.biol.mol.

Odjel za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb

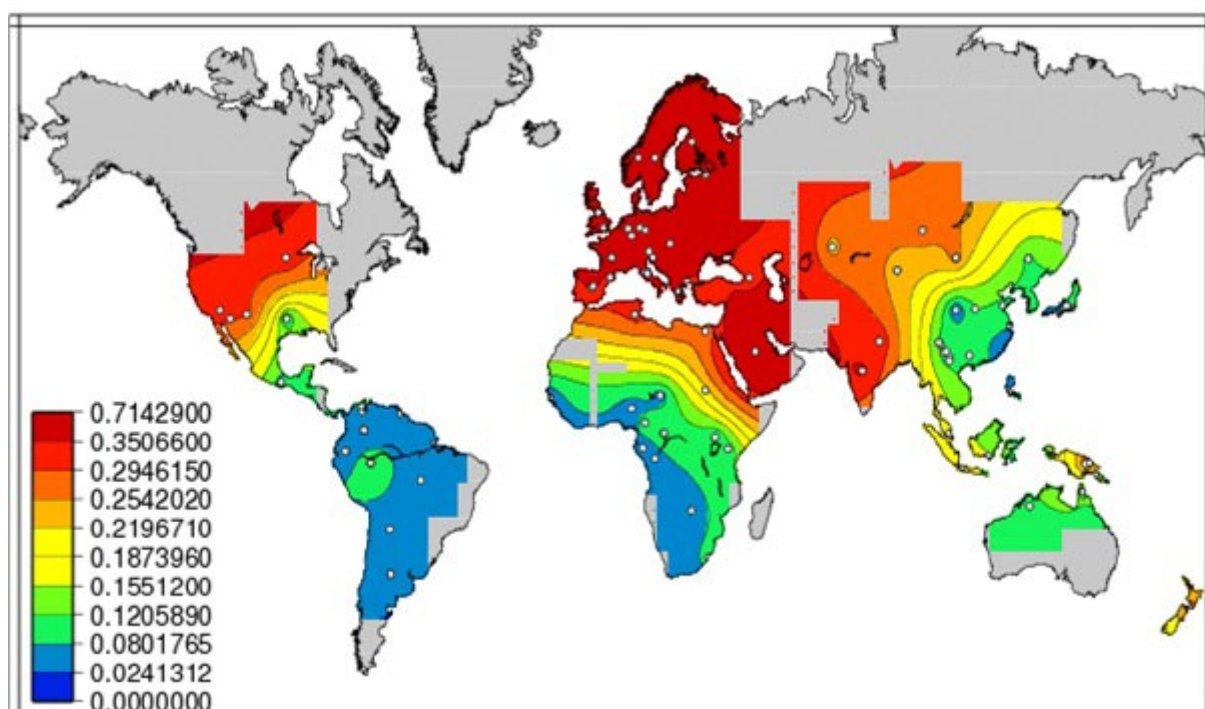
E-pošta: mmaskala@kbc-zagreb.hr

### UVOD

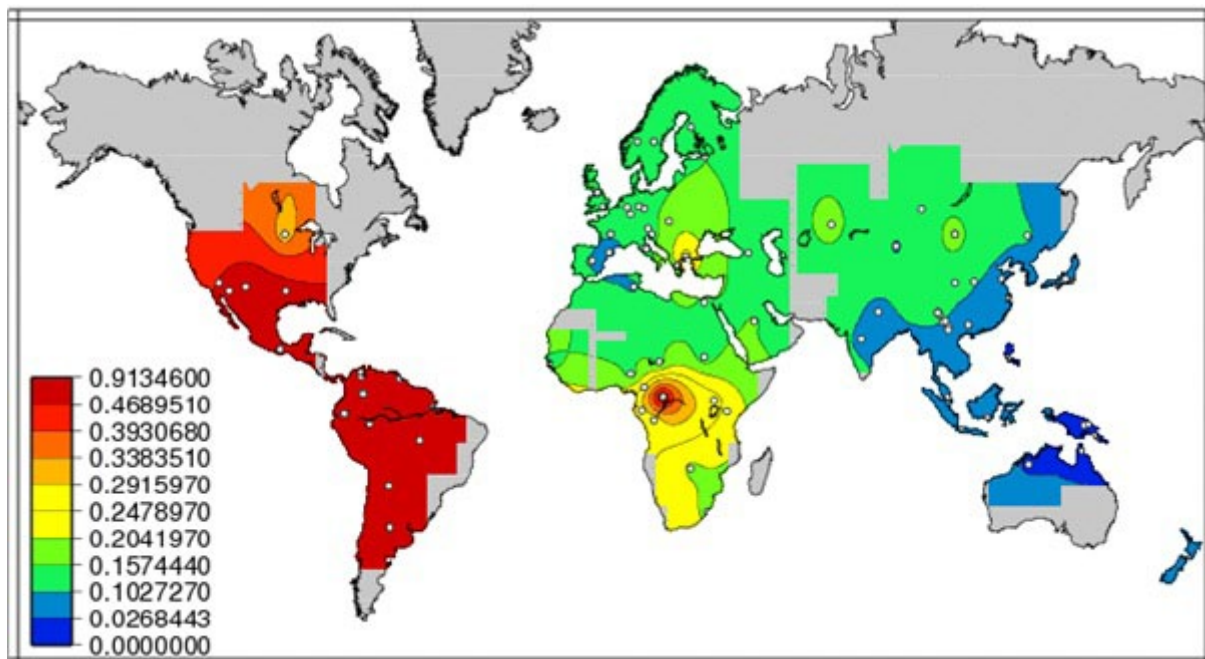
Subregija HLA-DP nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6, na dijelu 6p21.31 centromerično u odnosu na subregije HLA-DQ i -DR. Prvi je put opisana 1980. godine kao zasebna skupina gena HLA razreda II koja izaziva odgovor limfocita T (1). Molekule HLA-DP građom su nalik svim ostalim molekulama HLA razreda II. Građene su od  $\alpha$  lanca koji je kodiran nisko polimorfnim genom HLA-DPA1 (do danas je poznato 44 različitih alela koji kodiraju 22 proteina) i  $\beta$  lanca koji kodira visoko polimorfni gen HLA-DPB1 (do danas poznato 740 različitih alela, a broj proteina nešto je manji i iznosi 615) (2). Učestalost rekombinacije između lokusa HLA-DP i ostalih lokusa HLA razreda II veća je nego među drugim lokusima HLA, što za rezultat ima slabu neravnotežu udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD) između alela HLA-DP i ostalih alela HLA razreda II.

U Europi i Sjevernoj Americi najčešći alel lokusa HLA-DPB1 je DPB1\*04:01 (Slika 1). Njegova učestalost u Sjevernoj Americi smanjuje se prema jugu, a ujedno se povećava učestalost alela HLA-DPB1\*04:02 pa u Središnjoj i Južnoj Americi prevladava upravo taj alel (Slika 2) (3). Prema istraživanju koje je proveo Sidney sa suradnicima ukupno pet alela HLA-DPB1 prisutno je s učestalošću većom od 15% u sedam populacija (Australija, Europa, Sjeverna Amerika, Oceanija, Južna Amerika, Jugoistočna Azija i subsaharska Afrika). To su aleli: DPB1\*01:01, DPB1\*02:01, DPB1\*04:01, DPB1\*04:02 i DPB1\*05:01, istovremeno tih 5 alela čini ukupno 80% alela DPB1 prisutnih u navedenim populacijama (4). Istraživanje raspodjele alela HLA-DPB1 u našoj populaciji pokazalo je da je najčešći alel DPB1\*04:01 što je u skladu s raspodjelom tog alela DPB1 u Europi i Sjevernoj Americi (među popula-

Slika 1. Učestalost HLA-DPB1\*04:01 u svijetu



(Preuzeto iz reference 3.)

**Slika 2. Učestalost HLA-DPB1\*04:02 u svijetu**

(Preuzeto iz reference 3.)

cijama europskog porijekla) (3). Naime, za razliku od raspodjele alela na drugim klasičnim lokusima HLA, na lokusu HLA-DPB1 uvijek je jedan alel zastupljen s učestalošću od približno 40%.

U usporedbi s genima subregije HLA-DQ i -DR, o genu HLA-DPB1 ne postoji tako velik broj istraživanja i dugi niz godina je zanemaran jer se nije znala njegova uloga/važnost u imunološkoj reakciji, stoga nije ni bio sastavni dio algoritma pri odabiru nesrodnog podudarnog davatelja u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica (TKMS). Treba istaknuti da njegova biološka funkcija i dalje ostaje slabo razjašnjena i predmet je istraživanja (6). Jedan od razloga dugogodišnje je uvjerenje da molekule HLA-DP ne igraju tako važnu ulogu u imunološkoj reakciji u odnosu na molekule HLA-DR i -DQ. Osim toga, prisutnost molekula HLA-DP na staničnim membranama znatno je manja od molekula HLA-DR i -DQ. Molekule HLA-DP prisutne su na svim stanicama na kojima su i ostale molekule HLA razreda II, ali ih je zbog male ekspresije puno teže posebno izolirati. Također, istraživanja provedena u proteklom razdoblju pokazala su da nisu sve nepodudarnosti u alelima HLA-DPB1 jednako imunogenične (6). U istraživanju iz 2004. godine Zino i suradnici utvrdili su da razlike u polimorfizmima aminokiselina na specifičnim mjestima u molekuli HLA, pogotovo onima koje su uključene u prepoznavanje limfocita T, mogu tvoriti štetnije nepodudarnosti koje su temeljene na odgovoru limfocita T na aloantigene (6). Prema tome, limfociti T jače, odnosno slabije, prepoznaju određene alele HLA-DPB1

i temeljem toga su svrstani u skupine nedopuštenih, odnosno dopuštenih nepodudarnosti između bolesnika i nesrodnog davatelja u programu TKMS. Autori su na temelju križne aloreaktivnosti limfocita T alele lokusa HLA-DPB1 svrstali u tri skupine; aleli DPB1\*09:01, DPB1\*10:01 i DPB1\*17:01 tvore skupinu izrazito imunogeničnih alela, aleli DPB1\*03:01, DPB1\*14:01 i DPB1\*45:01 pripadaju skupini srednje imunogeničnih, a svi preostali aleli DPB1 su u skupini slabo imunogeničnih. S obzirom na podjelu alela HLA-DPB1 u tri skupine algoritam nepodudarnosti je nazvan algoritam TCE3 (engl. *T-cell epitope algorithm*). Kasnije je objavljen prošireni algoritam TCE4 koji uključuje gen HLA-DPB1\*02 kao posebnu grupu u kojoj je imunogeničnost slabija od one u grupi dva, ali jača od one u grupi 3 (7). Ovisno o kombinaciji alela HLA-DPB1 koju imaju bolesnik i njegov nesrodni davatelj, nepodudarnosti HLA-DPB1 se onda dijele u dopuštene i nedopuštene. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su nedopuštene nepodudarnosti povezane s učestalijom pojavom GvHD-a (engl. *graft versus host disease*) i manjim preživljavanjem bolesnika nakon TKMS-a (8).

Stoga je i cilj ovog rada bio istražiti utjecaj podudarnosti, odnosno nepodudarnosti HLA-DPB1 između bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja na ishod TKMS-a, čime bi se moglo pomoći u objašnjenju važnosti gena HLA-DPB1 u transplantaciji.

## MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na uzorku od 100 parova bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja. Bole-

snici su bili iz različitih regija Republike Hrvatske i svi su liječeni TKMS u Zavodu za hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti, KBC-a Zagreb. Njihovi davatelji bili su nesrodni, dobrovoljni davatelji iz Hrvatskog registra dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica (engl. *Croatian Bone Marrow Donor Registry*, CBMDR) ili iz svjetskog registra dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica (engl. *Bone Marrow Donor Worldwide*, BMDW). Osnovne osobine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja prikazane su u Tablici 1. Svim su ispitanicima prethodno određeni aleli HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 te kasnije i aleli HLA-DPB1.

Za određivanje gena HLA-DPB1 niskom rezolucijom korištena je metoda PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*), proizvođača Olerup (Olerup SSP® typing kits, Vienna, Austria) (9). Metoda se temelji na vezanju specifičnih početnica za određenu sekvencu DNA, tj. umnažanju određene sekvence – gena HLA-DPB1.

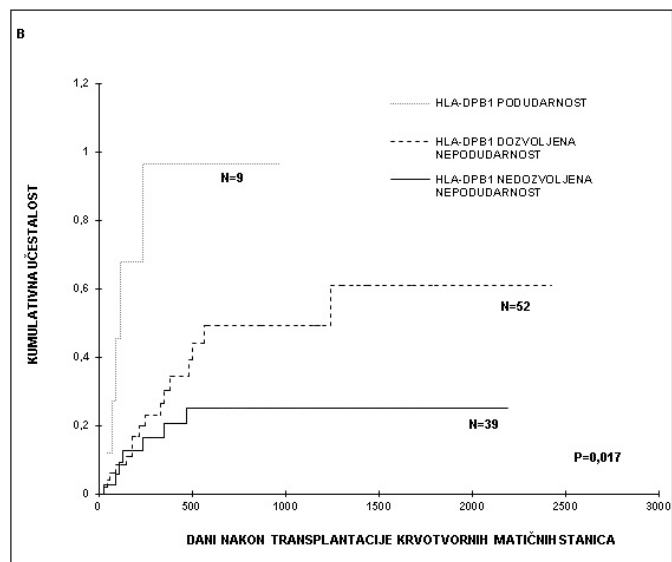
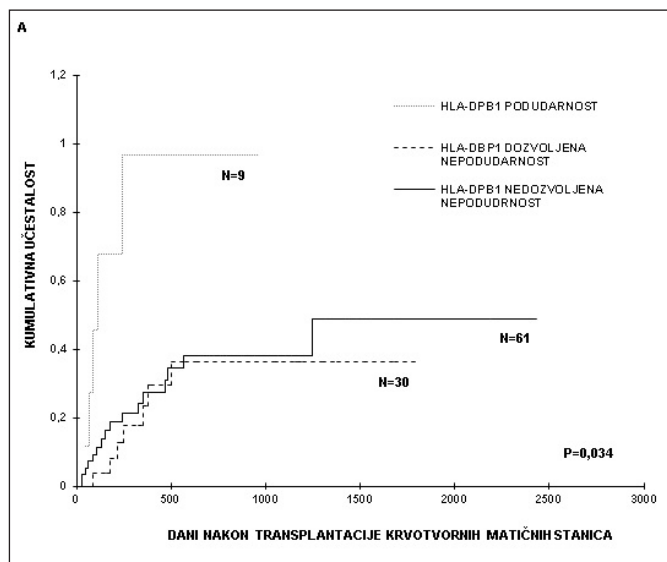
Aleli gena HLA-DPB1 (visoka rezolucija) određeni su metodom PCR-SSO (engl. *Sequence Specific Oligonucleotides*) korištenjem setova Immucor Lifecodes HLA-SSO (Immucor Transplant Diagnostics, Inc, Stamford, USA) i Luminex aparata (The Luminex® 200™ System). Metoda se temelji na hibridizaciji umnoženih produkata na specifične oligonukleotidne probe koje su vezane na površini mikrosfera (10).

Učestalost alela HLA-DPB1 dobivena je izravnim brojenjem, u slučaju da je određen samo jedan alel, osoba se smatra homozigotom za taj alel.

### Slika 3. Povezanost podudarnosti HLA-DPB1, dozvoljenih i nedozvoljenih nepodudarnosti HLA-DPB1 s relapsom bolesti prema:

A) algoritam T-staničnih epitopa podijeljenih u tri grupe (TCE3)

B) algoritam T-staničnih epitopa podijeljenih u četiri grupe (TCE4) između bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja



Procjena preživljavanja bolesnika nakon transplantacije provedena je uporabom Kaplan-Meierove analize. Za procjenu relapsa bolesti, smrtnosti nevezane uz relaps i pojavu reakcije transplantata protiv primatelja korištena je kumulativna učestalost. Sve statističke analize provedene su pomoću programa XLSTAT-Biomed solution software, version 2016.2, a razina statističke značajnosti bila je  $P < 0,05$ .

## REZULTATI

U skupini bolesnika pronađena su samo 22 od 740 (3,0%) do danas poznatih alela HLA-DPB1 (2). Najčešći alel DPB1 među bolesnicima bio je alel HLA-DPB1\*04:01 s učestalošću od 41,5%, slijedili su ga aleli DPB1\*04:02 (16,5%), i DPB1\*02:01 (12,5%). Preostalih 19 alela HLA-DPB1 imalo je učestalost manju od 5%.

Od 100 parova bolesnik/nesrodni davatelj, samo ih je 5 bilo potpuno podudarno za svih 12 alela HLA, a 4 su para bila podudarna za alele HLA-DPB1, ali imali su nepodudarnost na nekom od preostalih 5 testiranih lokusa HLA. Time je stopa podudarnosti za alele HLA iznosila 9%. Preostali 91 par imao je jednu nepodudarnost na lokusu HLA-DPB1 uz 0 (10/10, N=61), 1 (HLA 9/10, N=26) ili 2 (8/10, N=4) nepodudarnosti na ostalim lokusima HLA. Prema algoritmu TCE3 dopuštene nepodudarnosti imala su 52/91 (57,1%) para bolesnik/nesrodni davatelj, a nedopuštene nepodudarnosti 39/91 (42,9%) parova. Kada se pri podjeli uzme u obzir algoritam TCE4, 30/91 (33,0%) parova bolesnik/nesrodni davatelj imali su dopuštene nepodudarnosti, a 61/91 (67,0%) par nedopuštene nepodudarnosti.

Od ishoda nakon TKMS-a, analizirani su ukupno preživljenje, smrtnost nevezana uz relaps bolesti, GvHD i relaps bolesti. Analiza navedenih ishoda nakon TKMS-a pokazala je jedino za relaps bolesti statistički značajnu razliku s obzirom na dopuštene i nedopuštene nepodudarnosti HLA-DPB1 (Slika 3). U našoj skupini 23 bolesnika imala su relaps bolesti. Parovi bolesnik/nesrodni davatelj koji su bili podudarni za alele HLA-DPB1 imali su značajno povećanu pojavu relapsa u odnosu na bolesnike koji su sa svojim davateljima imali i dopuštene i nedopuštene nepodudarnosti. Prema algoritmu TCE3 statistička značajnost bila je  $P=0,017$  (OR=2,53 [CI, 0,74–6,56]), a prema algoritmu TCE4, P vrijednost iznosila je  $P=0,034$  (OR=1,95 [CI, 0,31–4,87]), (Slika 3). Nije uočena razlika u pojavi relapsa između skupine s dopuštenim i nedopuštenim nepodudarnostima HLA-DPB1.

### RASPRAVA

Analiza raspodjele alela HLA-DPB1 među bolesnicima pokazala je da je najčešći alel HLA-DPB1\*04:01, što je u skladu s rezultatima prethodnog istraživanja među zdravim nesrodnim ispitanicima kao i podacima za druge populacije Europe i Sjeverne Amerike (populacije europskog porijekla) (3, 5). Ovaj je nalaz i u skladu s velikom studijom provedenom 2007. godine na uzorku od 5929 parova primatelj – nesrodni davatelj (8).

Brojni autori smatraju da aleli HLA-DPB1 imaju ulogu u nastanku GvHD-a, relapsu bolesti i preživljavanju bolesnika nakon transplantacije (7, 11). Unatoč većem broju istraživanja provedenih u posljednjih desetak godina diljem svijeta, jedinstvenog zaključka još uvijek nema, a rezultati pojedinih studija su suprotni. Ovaj rad je pokazao da je samo mali broj bolesnika (4%) podudaran sa svojim nesrodnim davateljem za alele lokusa HLA-DPB1, što je u skladu s nalazima drugih autora (8). Jedno od objašnjenja je što je LD između alela HLA-DQB1 i -DPB1 puno manji nego između ostalih alela HLA, što za rezultat ima veliku nepodudarnost za alele HLA-DPB1 između bolesnika i nesrodnog davatelja KMS-a koji su na ostalim lokusima HLA podudarni. Dodatno objašnjenje za izostanak podudarnosti HLA-DPB1 između parova bolesnik-nesrodni davatelj leži i u činjenici da između lokusa HLA-DQB1 i -DPB1 postoji tzv. „vruće mjesto“ za rekombinaciju i stoga je učestalost rekombinacija na tom odsječku kromosoma 6 česta (8). Nalaz o najvećem broju parova koji je bio s jednom nepodudarnošću za alele DPB1 očekivan je jer su i drugi autori iznijeli slične podatke (8,

12). Analiza uloge dopuštenih i nedopuštenih nepodudarnosti HLA-DPB1 unutar naše skupine parova nije pokazala nikakve statistički značajne razlike, osim u slučaju pojave relapsa kod bolesnika koji su bili potpuno podudarni sa svojim nesrodnim davateljima za alele HLA-DPB1. Isti zaključak iznesen je i u istraživanjima drugih autora (13, 14). Moguće objašnjenje pozitivnog djelovanja nepodudarnosti HLA-DPB1 na relaps bolesti je da veliki broj leukemijskih stanica ima izražene antigene HLA-DPB1 na svojoj površini i mogu ih ubiti citotoksični limfociti T koji su specifični za te antigene (molekule) DPB1 čime se izaziva pozitivan učinak presatka protiv leukemije (engl. *graft versus leukemia effect*, GvL) (15, 16). Na ovaj način, alospecifični limfociti T koji su odgovorni za GvHD, mogu biti i direktno odgovorni za anti-leukemijski učinak s antigenima HLA-DPB1 kao specifičnim metama GvL-a. Rutten i suradnici su u svom radu pokazali da su HLA-DP specifični limfociti T **pronađeni kod bolesnika s pozitivnim kliničkim odgovorom**, i s i bez GvHD-a te je zaključak bio da ravnoteža između GvHD-a i GvL-a **u svakom bolesniku ovisi o različitim faktorima, mikrookolišu, ali i o indukciji drugih imunoloških odgovora** (17). U cjelokupnoj našoj skupini bolesnika (bez obzira na nepodudarnosti na drugim lokusima HLA) uočili smo bolje preživljavanje onih s dopuštenim nepodudarnostima, međutim to nije bio slučaj unutar skupine bolesnika koji su imali HLA-DPB1 podudarnog davatelja. Stoga možemo reći da su naši podaci djelomično u skladu s radom iz 2009. godine u kojem autori iznose zaključak da bolesnici s dopuštenim nepodudarnostima HLA-DPB1 imaju bolje sveukupno preživljavanje za razliku od onih s nedopuštenim nepodudarnostima (7). Povezanost nepodudarnosti HLA-DPB1 s povišenim rizikom od pojave GvHD-a u našem radu nije dokazana.

Iako nema sumnje da geni HLA-DP imaju ulogu u imunološkom odgovoru, u većini transplantacijskih centara odabir nesrodnog davatelja KMS-a ne uključuje i podudarnost za alele HLA-DPB1. Naime, u pojedinim centrima se jedino u slučaju većeg broja 10/10 HLA podudarnih davatelja provodi i tipizacija za alele HLA-DPB1 s ciljem odabira onog koji je najpodudarniji. Međutim, treba istaknuti da to iziskuje dodatno vrijeme, osobito u onim situacijama kad su ti, potencijalni, nesrodni davatelji iz različitih registara.

Na temelju naših rezultata možemo reći da uloga gena HLA-DPB1, a time i nužnost njihovog određivanja u programu TKMS-a, treba biti istražena na daleko većem broju ispitanika.

**Tablica 1. Osobine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja**

<b>Osnovne osobine bolesnika i njihovih nesrodnih davatelja</b>		
<b>Broj parova primatelj/nesrodni davatelj</b>	100	
<b>Dob primatelja: godine, median (raspon)</b>	37	(18-62)
<b>Dob davatelja: godine, median (raspon)</b>	34	(18-55)
<b>Spol - primatelj/davatelj</b>		
ženski-ženski	20	
ženski-muški	15	
muški-ženski	28	
muški-muški	37	
<b>Dijagnoza</b>		
Akutna mijeloična leukemija (AML)	37	
Akutna limfatična leukemija (ALL)	19	
Mijelodisplastični sindrom (MDS)	11	
Kronična mijeloična leukemija (CML)	7	
Non-Hodgkin limfom (NHL)	5	
Hodgkin limfom(HL)	4	
Mijelofibroza	4	
Teška kombinirana imunodeficijencija, SCID	3	
Kronična limfatična leukemija (CLL)	2	
Ostalo	8	
<b>Protokol kondicioniranje</b>		
Mijeloablativno (MAC)	46	
Sniženog intenziteta (RIC)	54	
<b>Izvor matičnih stanica</b>		
Koštana srž (KS)	27	
Periferna krv (PK)	73	
<b>Podudarnost HLA</b>		
Podudarnost HLA 12/12	5	
Podudarnost HLA 10/10, HLA-DPB1 nepodudarni	61	
Podudarnost HLA 9/10, HLA-DPB1 nepodudarni	26	
Podudarnost HLA 8/10, HLA-DPB1 nepodudarni	4	
HLA-DPB1-podudarni, nepodudarnost na ostalim lokusima	4	
<b>Podudarnost HLA-DPB1</b>		
0 nepodudarnosti	9	
1 nepodudarnost	60	
2 nepodudarnosti	31	
<b>Dozvoljene/nedozvoljene nepodudarnosti HLA-DPB1</b>		
Dozvoljene nepodudarnosti TCE3/TCE4	61/39	
Nedozvoljene nepodudarnosti (GvH) TCE3/TCE4	20/33	
Nedozvoljene nepodudarnosti (HvG) TCE3/TCE4	19/28	

Legenda: GvH = smjer graft versus host; HvG = smjer host versus graft; HLA = human leukocyte antigen; TCE3 = T-stanični epitopi podijeljeni u tri grupe; TCE4 = T-stanični epitopi podijeljeni u četiri grupe

**Literatura:**

1. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski J. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J of Human Genetics*. 2009; 54: 15-39.
2. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IPD-IMGT/HLA Database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research*. 2015; **43** :D423-431.
3. Lancaster AK, Single RM, Solberg OD, Nelson MP, Thomson G. PyPop update - a software pipeline for large-scale multilocus population genomics. *Tissue Antigens*. 2007; 69 (s1), 192-197.
4. Sidney J, Steen A, Moore C, Ngo S, Chung J, Peters B, Sette A. Five HLA-DP molecules frequently expressed in the worldwide human population share a common HLA supertypic binding specificity. *J Immunol*. 2010; 184(5): 2492-503.
5. Grubic Z, Zunec R, Naipal A, Kastelan A, Giphart MJ. Molecular analysis of HLA class II polymorphism in Croats. *Tissue Antigens*. 1995; 46(4): 293-8.
6. Zino E, Frumento G, Marktel S, Sormani MP, Ficari F, Di Terlizzi S, Parodi AM, Sergeant R, Martinetti M, Bontadini A, Bonifazi F, Lisini D, Mazzi B, Rossini S, Servida P, Ciceri F, Bonini C, Lanino E, Bandini G, Locatelli F, Apperley J, Bacigalupo A, Ferrara GB, Bordignon C, Fleischhauer K. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood*. 2004; 103: 1417-24.
7. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, Sacchi N, Sormani MP, Marcon J, Lamparelli T, Fanin R, Garbarino L, Miotti V, Bandini G, Bosi A, Ciceri F, Bacigalupo A, Fleischhauer K; Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo, Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) e Terapia Cellulare.; Italian Bone Marrow Donor Registry. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009; 114(7): 1437-44.
8. Shaw B, Gooley T, Malkki M, Madrigal A, Begovich A, Horowitz M, Gratwohl A. The importance of HLA-DPB1 in unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2007; 110: 4560-6.
9. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992; 39: 225-35.
10. Dalva K, Beksac M. HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex™ technology. *Methods Mol Med*. 2007; 134: 61-9.
11. Serventi-Seiwerth R, Mikulic M, Mrcic M, Grubic Z, Bojanic I, Stingl K, Labar B. Transplantacija alogenih krvotvornih matičnih stanica od HLA podudarnog nesrodnog darivatelja. *Medicina Fluminensis*. 2011; 47(4): 381-8.
12. Ludajic K, Balavarca Y, Bickeböller H, Pohlreich D, Kouba M, Dobrovolna M, Vrana M, Rosenmayr A, Fischer GF, Fae I, Kalhs P, Greinix HT. Impact of HLA-DPB1 allelic and single amino acid mismatches on HSCT. *Br J Haematol*. 2008; 142(3): 436-43.
13. Shaw BE, Marsh SG, Mayor NP, Russell NH, Madrigal JA. HLA-DPB1 matching status has significant implications for recipients of unrelated donor stem cell transplants. *Blood*. 2006; 107: 1220-1226.
14. Pidala J, Lee SJ, Ahn KW, Spellman S, Wang HL, Aljurf M, Askar M, Dehn J, Fernandez Viña M, Gratwohl A, Gupta V, Hanna R, Horowitz MM, Hurley CK, Inamoto Y, Kassim AA, Nishihori T, Mueller C, Oudshoorn M, Petersdorf EW, Prasad V, Robinson J, Saber W, Schultz KR, Shaw B, Storek J, Wood WA, Woolfrey AE, Anasetti C. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2014; 124(16): 2596-606.
15. Ibsch C, Gallot G, Vivien R, Diez E, Jotereau F, Garand R, Vié H. Recognition of leukemic blasts by HLA-DPB1-specific cytotoxic T cell clones: a perspective for adjuvant immunotherapy post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23(11): 1153-9.
16. Herr W, Eichinger Y, Beshay J, Bloetz A, Vatter S, Mirbeth C, Distler E, Hartwig UF, Thomas S. HLA-DPB1 mismatch alleles represent powerful leukemia rejection antigens in CD4 T-cell immunotherapy after allogeneic stem-cell transplantation. *Leukemia*. 2017; 31(2): 434-445.
17. Rutten CE, van Luxemburg-Heijs SA, Halkes CJ, van Bergen CA, Marijt EW, Oudshoorn M, Griffioen M, Falkenburg JH. Patient HLA-DP-specific CD4+ T cells from HLA-DPB1-mismatched donor lymphocyte infusion can induce graft-versus-leukemia reactivity in the presence or absence of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013; 19(1): 40-8.

## Daljnji razvoj multidisciplinarnog tima za kroničnu bolest presatka protiv primatelja KBC Zagreb – novi projekt

Dražen Pulanić<sup>1</sup>, Lana Desnica<sup>2</sup>, Ranka Serventi-Seiwerth<sup>2</sup>, Marinka Mravak-Stipetić<sup>3</sup>, Ervina Bilić<sup>4</sup>, Romana Čević<sup>5</sup>, Nadira Duraković<sup>2</sup>, Zinaida Perić<sup>2</sup>, Lucija Kraljević<sup>2</sup>, Ernest Bilić<sup>6</sup>, Ines Bojanić<sup>7</sup>, Sanja Mazić<sup>7</sup>, Igor Petriček<sup>8</sup>, Dina Ljubas<sup>9</sup>, Tamara Vukić<sup>10</sup>, Tajana Klepac Pulanić<sup>11</sup>, Branimir Ivan Šepić<sup>4</sup>, Marko Barešić<sup>12</sup>, Irena Karas<sup>9</sup>, Ljubica Rajić<sup>6</sup>, Toni Matić<sup>6</sup>, Davora Dušek<sup>13</sup>, Magdalena Grce<sup>14</sup>, Lejla Kurić<sup>15</sup>, Antonija Babić<sup>15</sup>, Violeta Rezo Vranješ<sup>16</sup>, Zlatko Giljević<sup>17</sup>, Milan Milošević<sup>18</sup>, Ivana Ilić<sup>19</sup>, Renata Zadro<sup>15</sup>, Drago Batinić<sup>15</sup>, Radovan Vrhovac<sup>2</sup>, Steven Živko Pavletić<sup>20</sup>, Damir Nemet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet Osijek Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, <sup>2</sup>Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>3</sup>Zavod za oralnu patologiju, Klinika za stomatologiju KBC Zagreb i Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>4</sup>Klinika za neurologiju KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>5</sup>Klinika za kožne i spolne bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>6</sup>Klinika za pedijatriju, Zavod za hematologiju i onkologiju KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>7</sup>Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC Zagreb, <sup>8</sup>Klinika za oftalmologiju KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>9</sup>Zavod za gastroenterologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>10</sup>Klinički zavod za rehabilitaciju i ortopedsku pomagala KBC Zagreb, <sup>11</sup>Dom zdravlja istok, Zagreb, <sup>12</sup>Zavod za kliničku imunologiju i reumatologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb, <sup>13</sup>Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", <sup>14</sup>Institut Ruđer Bošković, <sup>15</sup>Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>16</sup>Klinički zavod za kliničku i molekularnu biologiju KBC Zagreb, <sup>17</sup>Zavod za endokrinologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>18</sup>Škola narodnog zdravlja Andrija Štampar i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <sup>19</sup>Klinički zavod za patologiju i citologiju KBC Zagreb, <sup>20</sup>Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, SAD.

Adresa autora za kontaktiranje:

Doc. dr. sc. Dražen Pulanić, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Medicinski fakultet Osijek Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku

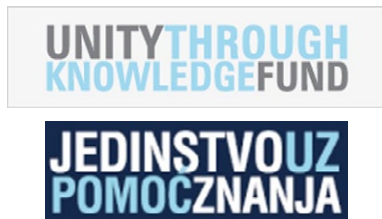
E-pošta: dpulanic@yahoo.com

Kronična bolest presatka protiv primatelja (eng. *Chronic Graft versus Host Disease - cGVHD*) najvažnija je kasna komplikacija nakon transplantacije alogeničnih krvotvornih matičnih stanica (aloTKMS) koja se javlja u 40 do 70% osoba nakon aloTKMS. Bolest je u porastu zbog više razloga poput sve manjeg peritransplantacijskog mortaliteta, presadbe perifernih krvotvornih matičnih stanica, starije životne dobi transplantiranih bolesnika i sve većeg broja transplantacija od nesrodnog darivatelja. Kronični GVHD je aloimunosna i autoimunosna bolest koja zahvaća brojne organe, zahtijeva multidisciplinarni pristup s različitim subspecijalistima i dugotrajnu imunosupresivnu terapiju.

U prethodnim brojevima Biltena KROHEMA izvijestili smo da je u KBC Zagreb u 2013. godini formiran multidisciplinarni tim za liječenje cGVHD-a i dugotrajnih komplikacija nakon aloTKMS-a u

suradnji s National Cancer Institute (NCI), NIH, SAD uz projektnu potporu fonda „Jedinstvo uz pomoć znanja“ (eng. *Unity Through Knowledge Fund, UKF*) financiranog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta RH i Svjetske banke. Riječ je o međunarodnom projektu "*Clinical and biological factors determining severity and activity of chronic Graft-versus-Host Disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*", čiji su voditelji bili prof. dr. Steven Živko Pavletić iz NCI/NIH, SAD, i prof. dr. Damir Nemet iz Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb. Taj UKF-ov projekt istraživanja kroničnog GVHD-a trajao je dvije godine uz sudjelovanje osam institucija (NCI/NIH iz SAD, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Institut Ruđer Bošković, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Dom

zdravlja Zagreb – istok, Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM), uz suradnju niza kliničara i laboratorijskih istraživača različitih specijalnosti. Projekt je završio s pozitivnim recenzijama a uspostavljeni multidisciplinarni tim za kronični GVHD KBC Zagreb nastavlja dalje s radom.



Osim formiranja multidisciplinarnog tima za cGVHD i standardizacije pristupa bolesnicima s cGVHD-om korištenjem najsuvremenijih NIH kriterija i evaluacija, projekt o kroničnom GVHD-u doveo je do niza znanstveno-istraživačkih potprojekata, razvoja originalne baze podataka i *web* stranice projekta, nove opreme, te znanstvene produkcije koja se očitovala brojnim kongresnim priopćenjima i publikacijama. Između ostaloga, članovi tima su aktivno sudjelovali na međunarodnim i domaćim

znanstvenim kongresima i sastancima s 25 kongresnih priopćenja (poster i oralne prezentacije): 6. kongres Hrvatskog društva hematologa i transfuziologa s međunarodnim sudjelovanjem, Rovinj, ožujak 2014.; međunarodni kongres European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), Milano, Italija, travanj 2014.; međunarodni kongres European Federation for Neurological Societies - Joint Congress of European Neurology, Istanbul, Turska, svibanj, 2014.; redovni polugodišnji sastanak KROHEM-a u Osijeku, studeni 2014.; međunarodni kongres EBMT u Istanbulu, Turska, ožujak 2015.; međunarodni kongres Leukemia and Lymphoma u Dubrovniku, rujan 2015.; redovni polugodišnji sastanak KROHEM-a u Zadru, studeni 2015.; međunarodni kongres EBMT u Valenciji, Španjolska, travanj 2016.; redovni polugodišnji sastanak KROHEM-a u Osijeku, travanj 2016.; redovni polugodišnji sastanak KROHEM-a u Lovranu, studeni 2016.; međunarodni kongres EBMT u Marseilleu, Francuska, ožujak 2017.

Do sada je naš tim objavio sedam radova o cGVHD-u u časopisima indeksiranim u CC/SCI. Također je tiskan posebni tematski broj časopisa

*Slika 1. Tri međunarodna simpozija o cGVHD u Zagrebu, 2013.-2016.*



*Croatian Medical Journal* posvećen kroničnom GVHD-u, u kojem je sudjelovalo više inozemnih kolega sa svojim radovima, uz domaće stručnjake. Više članova našeg tima za cGVHD je sudjelovalo na međunarodnim sastancima o cGVHD-u u Europi i SAD-u, dok je nekoliko članova tima bilo tijekom trajanja UKF projekta na kraćim stručno-znanstvenim boravcima u centru za cGVHD u NCI/NIH u SAD-u.

Međunarodna aktivnost u području kroničnog GVHD-a rezultirala je i organizacijom tri vrlo uspješna međunarodna simpozija o kroničnom GVHD-u održana u Zagrebu u studenom 2013., svibnju 2015. i rujnu 2016. godine (organizatori prof. dr. Damir Nemet i prof. dr. Steven Živko Pavletić) gdje je sudjelovalo mnogo vrhunskih međunarodnih i domaćih stručnjaka iz područja kroničnog GVHD-a (Slika 1. i 2.).

Posljednji, 3. međunarodni simpozij o cGVHD-u održan u Zagrebu od 20. do 21. rujna 2016. imao je i edukacijski karakter organiziran kao napredni poslijediplomski tečaj u kojem su sudjelovali najuglednija imena iz područja kroničnog GVHD i transplantacije u hematologiji iz Europe, SAD-a i Kanade (čak 15 inozemnih predavača), uz 20 domaćih stručnjaka. Simpoziju je prisustvovalo više od stotinu polaznika iz inozemstva i Hrvatske, većinom mlađih hematologa ali i bazičnih istraživača iz različitih zemalja zainteresiranih za cGVHD. Polaznici i predavači su izrazili veliko zadovoljstvo odličnom organizacijom sastanka, vrlo kvalitetnim stručnim, znanstvenim i edukativnim sadržajem simpozija te mogućnošću izravne komunikacije s kolegama.

**Slika 2. Treći međunarodni simpozij o cGVHD u Zagrebu, 20.-21. rujna 2016.**



U radu Multidisciplinarnog tima za kronični GVHD i dalje sudjeluje veliki broj stručnjaka raznih specijalizacija – i kliničara i laboratorijskih stručnjaka – s uspješnom suradnjom s drugim europskim i američkim centrima koji se bave s cGVHD, čime je KBC Zagreb u tom segmentu postao prepoznat i na međunarodnoj razini kao pozitivni primjer razvoja struke i vrsne skrbi visoko diferentnih bolesnika s kroničnim GVHD-om.

Recentno je na natječaju Hrvatske zaklade za znanost odobren novi veliki četverogodišnji znanstveni projekt “Novi biomarkeri kronične bolesti presatka protiv primatelja” čiji je voditelj doc. dr. Dražen Pulanić, čime će rad Multidisciplinarnog tima za kronični GVHD dobiti dodatni podstrek.

Naime, danas je u svijetu jedan od najvećih znanstvenih interesa u području cGVHD-a ispitivanje potencijalnih dijagnostičkih, prognostičkih i prediktivnih biomarkera cGVHD-a, koji bi koristili u postavljanju dijagnoze, u procjeni rizika nastanka ili progresije bolesti, te u procjeni odgovora na terapiju i ishoda kroničnog GVHD-a. Stoga se može očekivati da će s novim projektom o biomarkerima u cGVHD-u naš multidisciplinarni tim nastaviti slijediti pa dijelom čak i predvoditi svjetske trendove u kroničnom GVHD-u.



## Fibrilacija atrijska kao komplikacija liječenja ibrutinibom

doc. dr. sc. Nikola Bulj, dr. med.<sup>1</sup>, Goran Rinčić, dr. med.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinika za bolesti srca i krvnih žila, KBC „Sestre milosrdnice“, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>2</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC „Sestre milosrdnice“

E-pošta: nikolabulj@gmail.com

### Uvod

Fibrilacija atrijska jedan je od najčešćih poremećaja srčanog ritma kojeg karakterizira apsolutno aritmična srčana akcija uz izostanak mehaničke funkcije miokarda s povećanom sklonošću nastanka tromba u aurikuli lijevog atrijsa. Smatra se da je oko trećina ishemijskih moždanih udara kardioemboličkog podrijetla, najčešće uslijed fibrilacije atrijsa.

Učestalost fibrilacije atrijske raste s dobi bolesnika, tako da je prevalencija iznad 70. godine života veća od 5%, a po nekim autorima i do 10%, poglavito u bolesnika starijih od 80 godina. Porastom prevalencije fibrilacije atrijske s dobi, raste i rizik moždanog udara, tako da na primjer taj rizik u populaciji bolesnika između 50-59 godina iznosi 1.5%, dok u populaciji bolesnika između 80-89 godina rizik raste do zabrinjavajućih 23%. Stoga ne čudi da je prevencija tromboemboličkih događaja, u prvom redu antikoagulantnom terapijom, temeljna strategija liječenja ovih bolesnika u cilju redukcije ukupnog mortaliteta, broja hospitalizacija i unapređenja kvalitete života (1-4).

Preporuke za liječenje fibrilacije atrijske redovito objavljuje Europsko kardiološko društvo, a zadnja revizija teksta objavljena je 2016. godine. Načelno, prema trajanju bolesti, bolesnike s fibrilacijom atrijske možemo podijeliti u tri podskupine: bolesnike s paroksizmalnom fibrilacijom atrijske (koja spontano prestaje ili ona koja traje kraće od 48 sati), bolesnike s perzistentnom fibrilacijom atrijske (obično traje duže od 7 dana) i bolesnike s permanentnom fibrilacijom atrijske (obično traje duže od godinu dana). Podjela je važna jer definira strategiju liječenja koja je u svih bolesnika usmjerena prema dva cilja: 1. odluka o kontroli ritma ili frekvencije i 2. odluka o liječenju antikoagulantnom terapijom. Bolesnici s paroksizmalnom fibrilacijom atrijske mogu se pokušati konvertirati u sinusni ritam bez prethodne antikoagulantne terapije bilo primjenom antiaritmika (propafenon ili amiodaron), bilo izravnom električnom kardioverzijom. S druge strane, u bolesnika s perzistentnom fibrilacijom atrijske povećan je rizik tromboze lijeve

aurikule, ali je konverzija u sinusni ritam moguća ili uz premedikaciju antikoagulantnom terapijom 3-4 tjedna prije konverzije ili uz pregled aurikule transezofagusnom ehokardiografijom. Bolesnicima kojima je utvrđena permanentna ili kronična fibrilacija atrijska konverzija u sinusni ritam nije moguća, pa se terapijska strategija temelji na kontroli srčane frekvencije (najčešće primjenom blokatora beta adrenergičnih receptora) uz obilgatnu antikoagulantnu terapiju (5).

Uvodno je napomenuto da antikoagulantna terapija dokazano poboljšava ukupni kardiovaskularni ishod i smrtnost bolesnika s atrijskom fibrilacijom. Odluka o uvođenju antikoagulantne terapije temelji se na procjeni rizika moždanog udara s jedne, i procjeni rizika krvarenja s druge strane. Rizik moždanog udara procjenjuje se CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc tablicom rizika koja procjenjuje godišnji rizik za razvoj moždanog udara temeljem kliničkih parametara (dob, spol, raniji moždani udar ili tranzitorna ishemijska ataka, te anamneza srčanog popuštanja, arterijske hipertenzije i šećerne bolesti). Muškarci s 2 ili više bodova i žene s 3 ili više bodova trebali bi biti liječeni antikoagulantnom terapijom. Rizik krvarenja procjenjuje se tzv. HAS-BLED tablicom rizika koja u obzir uzima slične kliničke parametre kao i CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc, uz dodatak anamneze krvarenja, uzimanja lijekova koji povećavaju rizik krvarenja i poremećaj bubrežne i jetrene funkcije. Zbroj bodova veći od 3 ukazuje na visok rizik krvarenja (6,7).

Prilikom izbora antikoagulantne terapije na raspolaganju imamo dvije opcije: varfarin i izravne oralne antikoagulanse (DOAC – od eng. direct oral anticoagulant). Načelno, prednost u terapijskoj strategiji imaju DOAC zbog jednostavnijeg doziranja, postojanijeg antikoagulantnog efekta, bržeg nastupa djelovanja, izostanka potrebe za kontrolom koagulacijskih parametara, te veće učinkovitosti uz manji rizik krvarenja u usporedbi s varfarinom. Na raspolaganju imamo izravne inhibitore aktiviranog faktora Xa (apiksabam i rivaroksabam) i inhibitor trombina (dabigatran). Apiksabam i dabigatran su

dostupni u dvije terapijske doze, od kojih se one niže (dabigatran 2x110 mg i apiksabam 2x2.5 mg) primjenjuju u starijih bolesnika i bolesnika s oštećenjem bubrežne funkcije (8-10).

### **Fibrilacija atrijske kao komplikacija liječenja ibrutinibom**

Liječenje limfoproliferativnih bolesti inhibitorom Brutonove kinaze ibrutinibom povećava sklonost razvoja atrijske fibrilacije koja se javlja u oko 5-7.7% svih liječenih bolesnika (11). Mehanizam kojim ibrutinib povećava rizik atrijske fibrilacije nije do kraja razjašnjen ali se pretpostavlja da je barem djelomično povezan s inhibicijom puta fosfoinozid 3-kinaze (PI3-Akt) u tkivu atrijske za kojeg se pretpostavlja da sudjeluje u prilagodbi atrijske na rastuću napetost stijenke (12). Fibrilacija atrijske najčešće se javlja nakon početka terapije ibrutinibom, obično u prva 3-4 mjeseca od početka terapije, iako rizik za nastanak postoji i kasnije. S obzirom na to da preporuke za liječenje ibrutinibom izazvane fibrilacijom atrijske nisu donešene, strategija liječenja temelji se na ranije navedenim preporukama Europskog kardiološkog društva.

Može se pretpostaviti da će većina bolesnika liječenih ibrutinibom kao komplikaciju razviti ili paroksizmalnu ili perzistentnu fibrilaciju atrijske. Prema važećim smjernicama, optimalna terapija bio bi pokušaj konverzije u sinusni ritam s obzirom na to da većina antiaritmika i lijekova koji se koriste u kontroli frekvencije (s izuzetkom beta blokatora) ulaze u interakcije s ibrutinibom. Ovo se posebno odnosi na verapamil i diltiazem koji koriste isti metabolički put (CYP3A4/5), kao i na amiodaron koji povisuje serumske koncentracije ibrutiniba. Nadalje, izravna transezofagusnom ehokardiografijom vođena kardioverzija dokida potrebu za prethodnom premedikacijom antikoagulantnim lijekovima u trajanju najmanje 3-4 tjedna (14).

Posebnu pozornost izazivaju oni bolesnici koji boluju od permanentne fibrilacije atrijske i oni koji zbog visokog CHA2DS2-VASc zbira zahtijevaju antikoagulantnu terapiju. Poznato je da bolesnici liječeni ibrutinibom imaju povećanu sklonost krvarenju uslijed promijenjene agregacije trombocita. Skoro polovica bolesnika razvije neko od manjih krvarenja (petehije i ekhimoze), dok su velika krvarenja rjeđa (3-4%). Mehanizam nastanka krvarenja je kompleksan i ne uključuje ADP-om posredovanu aktivaciju i agregabilnost trombocita, već je agregabilnost trombocita posredovana Brutonovom i Tec kinazom inhibirajući signalni put koji potiče

kolagen vezivanjem za glikoprotein VI (GPVI) (13). Stoga ne čudi rastuća zabrinutost o visokom riziku krvarenja uz pridruženu terapiju atrijske fibrilacije oralnim antikoagulantima. Ovdje valja istaknuti da je primjena varfarina u bolesnika s atrijskom fibrilacijom uzrokovanom ibrutinibom kontraindicirana, te da se kao antikoagulant izboru (iako nedostavno istraženi) nameću DOAC, poglavito oni koji su dostupni u nižim dozama. Posebno je istaknut dabigatran, koji uz mogućnost nižeg doziranja nudi i mogućnost trenutnog antidota (idarucizumaba) koji je odobren od nadležnih agencija i dostupan na tržištu. Idarucizumab je monoklonsko protutijelo koje u kratkom vremenu (oko 5 minuta) potpuno dokida učinke dabigatrana u slučaju velikog (najčešće u centralnom živčanom sustavu) krvarenja. Apiksabam je također dostupan u nižoj dozi i nameće se kao zadovoljavajuća alternativa čiji se antidot također očekuje u skorijoj budućnosti.

Odluku o uvođenju antikoagulantne terapije u bolesnika s ibrutinib vezanom atrijskom fibrilacijom također donosimo na temelju odnosa procjene rizika tromboze (odnosno moždanog udara) i rizika krvarenja korištenjem ranije navedenih CHA2DS2-VASc i HAS-BLED bodovnih tablica rizika. Bolesnici s CHA2DS2-VASc zbirom manjim od 2 ne trebaju uzimati antikoagulantne lijekove i mogu nastaviti terapiju ibrutinibom. Oni koji imaju zbir 2 mogu dobiti DOAC i razmotriti nastavak terapije ibrutinibom. Bolesnici s CHA2DS2-VASc zbirom 3 ili većim, ali HAS-BLED manjim od 3 moraju dobiti antikoagulantnu terapiju (optimalno dabigatran ili apiksabam u nižoj dozi) uz koju se može razmotriti nastavak terapije ibrutinibom. Bolesnici s HAS-BLED zbirom višim od 3, dakle oni s vrlo visokim rizikom krvarenja, ne smiju biti liječeni ibrutinibom. Kod ovih bolesnika se može razmotriti postupak okluzije lijeve aurikule nakon čega se može razmotriti nastavak terapije ibrutinibom (15).

### **Zajednička uloga kardiologa i hematologa u bolesnika liječenih ibrutinibom**

Bolesnici s limfoproliferativnim bolestima koji se liječe inhibitorima Brutonove kinaze zahtijevaju multidisciplinarni pristup, u prvom redu hematologa koji lijekove indiciraju i čiji učinak prate, a u drugom kardiologa koji vrše probir i liječenje rizičnih bolesnika s fibrilacijom atrijske. U kardiološkoj obradi ovih bolesnika potrebno je učiniti kompletan i detaljan kardiološki pregled, elektrokardiogram (ev. 24-satni Holter elektrokardiogram) uz obvezni ehokardiografski pregled. Poznato je da bolesnici s arterijs-

kom hipertenzijom, šećernom bolesti i ishemijskom bolesti srca imaju povećan rizik nastanka fibrilacije atrijske. Također, ranije zabilježena atrijska fibrilacija višestruko povećava rizik recidiva. Ehokardiografski pregledi ukazuju na one bolesnike s dilatacijom lijeve atrijske koji nose visoki rizik fibrilacije, ali i na one sa strukturnom bolesti srca, u prvom redu ishemijskom, valvularnom ili kardiomiopatijom. Nadalje, uloga kardiologa neophodna je u praćenju bolesnika (klinički i elektrokardiografski) nakon započinjanja terapije ibrutinibom, posebno u prvih 6 mjeseci kada je i rizik fibrilacije najviši, a u cilju prepoznavanja (često asimptomatske) fibrilacije atrijske i donošenja odluke o strategiji liječenja.

#### Literatura:

1. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, et al. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 98:946.
2. Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, et al. Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:371.
3. Patel NJ, Deshmukh A, Pant S, et al. Contemporary trends of hospitalization for atrial fibrillation in the United States, 2000 through 2010: implications for healthcare planning. *Circulation* 2014; 129:2371.
4. Lip GY, Brechin CM, Lane DA. The global burden of atrial fibrillation and stroke: a systematic review of the epidemiology of atrial fibrillation in regions outside North America and Europe. *Chest* 2012; 142:1489.
5. Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J* 2016; 37:2893.
6. Friberg L, Rosenqvist M, Lip GY. Evaluation of risk stratification schemes for ischaemic stroke and bleeding in 182 678 patients with atrial fibrillation: the Swedish Atrial Fibrillation cohort study. *Eur Heart J* 2012; 33:1500
7. Lip GY. Implications of the CHA2DS2-VASc and HAS-BLED Scores for thromboprophylaxis in atrial fibrillation. *Am J Med* 2011; 124:111.
8. Connolly SJ, Ezekowitz MD, Eikelboom YS, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation; *N Engl J Med* 2009; 361:1139.
9. Patel MR, Mahaffey KE, Garg J, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation; *N Engl J Med* 2011; 365:883.
10. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJV, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation; *N Engl J Med* 2011; 365:981.
11. Shanafelt T, et al. Atrial Fibrillation in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. Poster presented at: 57th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Dec 5-8; Orlando. 2015.
12. Byrd J, et al. Response: Additional data needed for a better understanding of the potential relationship between atrial fibrillation and ibrutinib. *Blood*. 2015;125(10):1673.
13. Levade M, David E, Garcia C, Laurent PA, Cadot S, Michallet AS, Bordet JC, Tam C, Sié P, Ysebaert L, Payrastre B. Ibrutinib treatment affects collagen and von Willebrand factor-dependent platelet functions. *Blood*. 2014 Dec 18;124(26):3991-5
14. Mulligan SP, Ward CM, Whalley D, Hilmer SN. Atrial fibrillation, anticoagulant stroke prophylaxis and bleeding risk with ibrutinib therapy for chronic lymphocytic leukaemia and lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2016 Nov;175(3):359-364
15. Shatzel JJ, Olson SR, Tao DL, McCarty OJ, Danilov AV, DeLoughery TG. Ibrutinib-associated bleeding: pathogenesis, management and risk reduction strategies. *J Thromb Haemost*. 2017 Feb 9. doi: 10.1111/jth.13651. Review

## Zbrinjavanje krvarenja u bolesnika na direktnim oralnim antikoagulansima

Marijo Vodanović<sup>1,2</sup>, Dražen Pulanić<sup>1,3,4</sup>, Ana Boban<sup>1,3</sup>, Silva Zupancić Šalek<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb  
Referentni centar Ministarstva zdravstva za hemostazu i trombozu

<sup>2</sup> Zdravstveno veleučilište, Zagreb

<sup>3</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>4</sup> Medicinski fakultet Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Adresa autora za dopisivanje:

Marijo Vodanović, dr.med

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

E-pošta: marijo.vodanovic@gmail.com

### 1. Uvod

Antikoagulansi su lijekovi s ciljem liječenja i prevencije tromboze. Venski tromboembolizam je treći uzrok kardiovaskularnog mortaliteta. Najvažnija nuspojava antikoagulantnih lijekova su krvarenja (1). Tradicionalni antikoagulansi nefrakcionirani heparin (UFH) i antagonisti vitamina K (VKA) imaju antidote (protamin sulfat, vitamin K). U situacijama težeg krvarenja zbog VKA, mogu se koristiti svježe smrznuta plazma te koncentracije protrombinskog kompleksa. Razvojem novih antikoagulansa (parenteralnih i oralnih) javila se potreba razvoja novih antidota za neutralizaciju njihovog učinka kod krvarenja i hitnih operativnih zahvata (2).

Direktni oralni antikoagulansi (DOAK-i) ili novi oralni antikoagulansi (NOAK-i) (nazivaju se još i ciljno specifičnim antikoagulansima) su dabigatran kao direktni inhibitor trombina (DTI), te inhibitori FXa: rivaroksaban, apiksaban, edoksaban, betriksaban. Primjenjuju se zadnjih nekoliko godina u svrhu prevencije moždanog udara i sistemskog tromboembolizma u bolesnika s fibrilacijom atrijske (FA), liječenju i sekundarnoj prevenciji duboke venske tromboze (DVT), plućne embolije (PE), te tromboprofilaksi nakon velikih ortopedskih zahvata. Imaju manje interakcija s hranom nego VKA, brže ostvaruju antitrombotski učinak, i nema potrebe redovitog praćenja učinka. Pokazali su bolji sigurnosni profil nego VKA (3). Metaanaliza koja je uključila više studija s preko 100,000 bolesnika pokazala je smanjenje velikih krvarenja u skupini bolesnika na DOAK-ima u odnosu na varfarin za 28%, dok je smanjena incidencija intrakranijskih i fatalnih krvarenja za 50% (4). Kod bolesnika s renalnom insuficijencijom (CrCl < 50 ml/min) bila je manja incidencija hemoragijskog moždanog udara (5). Sveukupna stopa mortaliteta bila je manja kod bolesnika na ispitivanom DOAK-u (dabigatranu) (6).

Tablica 1. Farmakološke karakteristike direktnih oralnih antikoagulansa.

Parametar	Dabigatran	Rivaroksaban	Apiksaban
Ciljno mjesto djelovanja	FXa	Trombin (IIa)	FXa
Oralna bioraspoloživost	80-100%	6,5%	~50%
Vežanje za proteine plazme	92-95%	34-35%	87%
Prolijek	Ne	Da	Ne
Poluvijek (h)	5-13	12-14	~12
Tmax (h)	2-4	2-6	3-4
Bubrežni klirens	33%	85%	27%

Prema novoj dopunskoj listi lijekova HZZO-a iz veljače 2017. direktni oralni antikoagulansi dabigatran (Pradaxa), rivaroksaban (Xarelto) i apiksaban (Eliquis) odobreni su u Hrvatskoj za sljedeće indikacije:

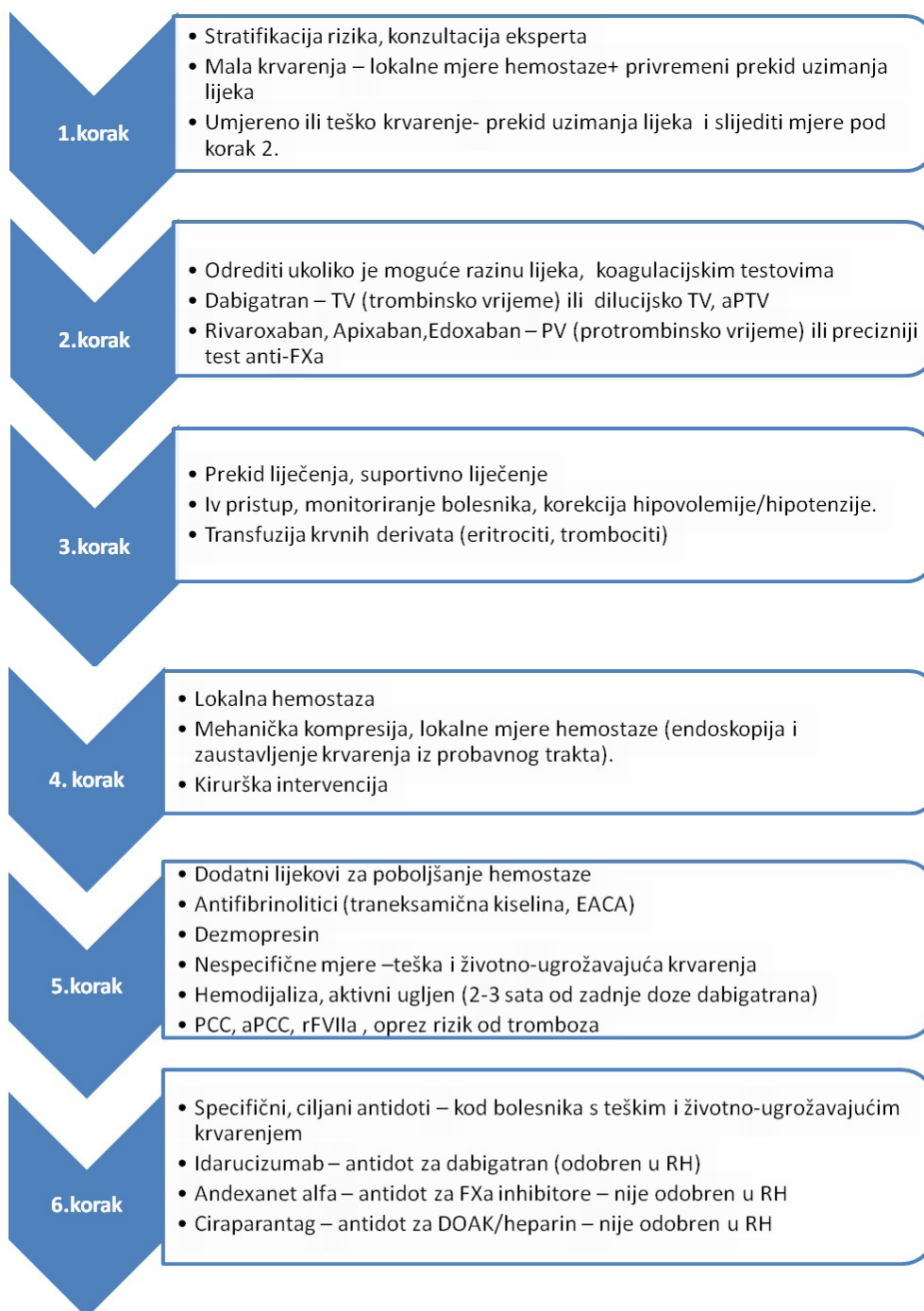
1. Prevencija moždanog udara i sistemske embolije u odraslih osoba s nevalvularnom atrijskom fibrilacijom s jednim ili više sljedećih čimbenika rizika: 1. prethodni moždani udar, tranzitorna ishemična ataka ili sistemska embolija; 2. ejekcijska frakcija lijevog ventrikula < 40%; 3. simptomatsko zatajenje srca, stupanj  $\geq 2$  prema klasifikaciji NYHA; 4. dob  $\geq 75$  godina; 5. dob  $\geq 65$  godina povezana s jednim od sljedećeg: dijabetes melitus, koronarna bolest srca ili hipertenzija, a koji ne postižu s varfarinom ciljnu vrijednost INR-a (INR 2-3).
2. Za liječenje duboke venske tromboze najduže do 6 mjeseci i liječenje plućne embolije najduže do 12 mjeseci, te prevenciju opetovane duboke venske tromboze i plućne embolije nakon duboke venske tromboze u odraslih bolesnika s dokazanim poremećajem u zgrušavanju. Pradaxa i Xarelto su prihvaćeni za obje indikacije, dok je Eliquis samo za prvu navedenu indikaciju.

Cilj ovog rada jest pokazati racionalni pristup zbrinjavanju krvarenja i neutralizaciji učinka DOAK-a, jer je sve više bolesnika na direktnim oralnim antikoagulansima.

## 2. Krvarenje kod bolesnika na direktnom oralnom antikoagulanu.

Postupke u liječenju bolesnika koji krvare i imaju u terapiji DOAK pokazuje Slika 1 (7).

**Slika 1. Koraci u zbrinjavanju krvarenja bolesnika na direktnom oralnom antikoagulanu.**



Na slici je navedeno šest ključnih koraka koji su važni u pristupu zbrinjavanja krvarenja bolesnika na DOAK-u. Prvo je potrebno procijeniti stanje bolesnika koji najčešće dolazi u hitnu ambulantu. Nakon ciljane anamneze i fizikalnog pregleda slijedi procjena hemodinamskog statusa. Potrebno je identificirati rizične čimbenike koji osim lijeka povećavaju sklonost krvarenju (kronična bubrežna bolest,

jetrena bolest, ranije krvarenje pod antikoagulansima, konkomitantna primjena druge antitrombotske terapije, raniji moždani udar, hipertenzija, starija dob > 75 g, alkoholizam, mala mišićna masa). Treba razmotriti sve lijekove koji mogu biti u interakciji s DOAK-om, te vrijeme koje je proteklo od zadnje doze lijeka. Uvijek je potrebno procijeniti težinu krvarenja i anemije te bubrežnu funkciju. **Manje**

**krvarenje** uključuje epistakse, ekhimoze, menoraģije i uobičajeno se zaustavljaju lokalnim mjerama hemostaze. Lijek se prekida ako se procjeni da je veća korist od prekida nego što je rizik od tromboembolizma. Kod učestalih manjih krvarenja, može se također smanjiti doza lijeka. Neke studije su pokazale da bolesnice na rivaroxabanu imaju 25% teža menstrualna krvarenja nego na VKA (8).

**Umjereno teško krvarenje.** To su subakutna gastrointestinalna, urogenitalna krvarenja, ali koja ne zahtijevaju transfuziju krvi, teža kožna krvarenja, odnosno refraktorne epistakse ili menoraģije. Uzimanje DOAK-a se prekida i potrebno je uz mjere koje su navedene u prvom i drugom koraku, koristiti dodatne lijekove za postizanje hemostaze poput antifibrinolitika (traneksamična kiselina), npr. kod menoraģija. Kod gastroenterološkog i genitourinarnog krvarenja potrebno je locirati mjesto endoskopski i zaustaviti krvarenje.

Kod **teških krvarenje** koje može biti i životno ugrožavajuće, potrebno je uz navedene mjere liječenja primijeniti specifične ili ako nisu dostupni nespecifične antidote za reverziju, odnosno poništavanje antikoagulantnog učinka DOAK-a.

Najveća blagodan DOAK-a jest da nije potrebno praćenje terapijskog učinka radi predvidljive farmakokinetike, međutim kad je potrebno određivati koagulacijske testove, nailazi se na zapreke. Tekuća kromatografija/tandem masena spektrometrija je zlatni standard mjerenja razine DOAK-a, međutim nije dostupna u redovitom radu, osim u svrhu istraživanja (9). U hitnoj službi bolnica najčešće su samo dostupni PV (INR) i aPTV koji su nedostatni za mjerenje učinka DOAK-a, ali ih uvijek treba odrediti prije samog postupka zbrinjavanja krvarenja. Učinak DOAK-a na koagulacijske testove pokazuje Tablica 2.

**Tablica 2. Utjecaj direktnih oralnih antikoagulanasa na koagulacijske testove.**

Klasa lijeka	DOAK	Standardni koagulacijski testovi			Specijalni koagulacijski testovi		
		PV	aPTV	TV	dTV	ECT/ECA	anti-Fxa aktivnost
<b>Dir. inh. trombina</b>	Dabigatran	↑/↔	↑	↑	↑	↑	
<b>FXa inhibitor</b>	Rivaroksaban	↑/↔	↑/↔	N/A	N/A	N/A	↑
	Apiksaban	↑/↔	↑/↔	N/A	N/A	N/A	↑
	edoksaban	↑/↔	↑/↔	N/A	N/A	N/A	↑

Puno precizniji testovi su dilucijsko trombinsko vrijeme (dTT od „dilute thrombin time“), vrijeme zgrušavanja ekarinom (ECT „ecarin clotting time“) ili ECA („ecarin chromogenic assay“) te anti FXa.

### 3. Specifični i nespecifični antidoti u za reverziju učinka DOAK-a.

Mjerenje razine DOAK-a može se savjetovati kod bolesnika s rizikom ili anamnezom ranijeg krvarenja. To su bolesnici s malom ili velikom tjelesnom masom, bubrežnom insuficijencijom, stariji od 75 godina, te na antitrombocitnoj terapiji (acetilsalicilna kiselina, NSAR) (10,11). U dosadašnjim studijama (ROCKET-AF) veliko krvarenje je imalo 409 bolesnika, ali je samo 9 bolesnika (2,2%) primalo koncentrat protrombinskog kompleksa (PCC), dok je jedan bolesnik primao aktivirani rekombinantni faktor VII (rFVIIa) (12). S druge strane 4/431 bolesnika (0,9%) s teškim krvarenjem, na rivaroxabanu primali su koncentrat protrombinskog kompleksa (PCC). Davanje svježe smrznute plazme ne korigira koagulacijske testove i ne poništavaju učinak

DOAK-a! Kod masivnih krvarenja mjere transfuzijskog liječenja primjenjuju se neovisno o dostupnosti antidota.

Specifični antidot za dabigatran je idarucizumab, andeksamet-alfa je specifični antidot za FXa inhibitore, dok je ciraparantag antidot širokog spektra za LMWH, UFH, DOAK-e (edoksaban, dabigatran, rivaroksaban i apiksaban).

*Idarucizumab* (BI 655075 Praxbind®) je specifični antidot za dabigatran. Od veljače 2017, odobren je i od strane HZZO-a, te je indiciran u odraslih bolesnika liječenih Pradaxom (dabigatran eteksilat) kada je potrebno brzo poništenje njegovog antikoagulacijskog učinka: za hitne kirurške zahvate/hitne postupke i u slučaju po život opasnog ili nekontroliranog krvarenja.

To je humano monoklonsko protutijelo, koji pokazuje specifičnost vezivanja za dabigatran 350 puta jače nego trombin, neutralizirajući učinak lijeka (13). Primjena idarucizumaba bez prisutnosti dabigatrana ne pokazuje prokoagulantni učinak i ne utječe na parametre koagulacije (14,15). Preporučuje

na doza je 2x2,5 g (2,5 g/ 50 ml). Lijek se primjenjuje kao dvije infuzije od 2,5 g uzastopce tijekom 5-10 minuta svaka ili u obliku bolus injekcija. Normalizacija dTT i ECT-a događa se nekoliko minuta po završetku primjene. U REVERSE-AD studiji analizirani su rezultati 51 bolesnika s teškim krvarenjem i 39 bolesnika s hitnim kirurškim zahvatima. Medi-jan vremena za normalizaciju hemostaze kod bolesnika s teškim krvarenjima iznosio je 11,4 sati, dok je 94,3% bolesnika koji su primali idarucizumab predoperativno imalo normalnu intraoperativnu hemostazu. Dobro se tolerirao bez teških ili ozbiljnih nuspojava (16). Trombotski incidenti su bili kod 5 bolesnika (17). Može se primijeniti kod bolesnika kod kojih je prošlo manje od 24 sata od uzimanja lijeka odnosno ako krvare i imaju pogoršanje bubrežne funkcije. Klinički značajna krvarenja povezana su s produženim aPTV-om, dTT (dilucijskim trombinskim vremenom) te ECT (ekarinskim vremenom zgrušavanja). Pradaxa® se ponovno može započeti 24 sata nakon primjene Praxbinda®, ako je antikoagulantna terapija neophodna, a bolesnik ima urednu hemostazu.

Nakon primjene Praxbinda, drugi antitrombotski lijekovi (npr. niskomolekularni heparin) mogu se započeti u bilo koje vrijeme. Bubrežno zatajivanje ne utječe na djelovanje idarucizumaba, a doza lijeka se ne prilagođava ovisno o dobi.

*Andeksanet alfa* (PRT064445) je antidot za direktne FXa inhibitore, rekombinantni oblik FXa koji je katalitički neaktivan, ali s jakim afinitetom za FXa inhibitore. U fazi II kliničkog ispitivanja snizio je anti-FXa aktivnosti u bolesnika na apiksabanu za 65%, rivaroksabanu 20-53%, i na edoksabanu 52-73%. Provedene su dvije studije ANNEXA-A i ANNEXA-R koje su ispitivale učinak kod zdravih ispitanika od 50-75 godina. Andeksanet alfa se pokazao kao siguran i dobro podnošljiv antidot, bez protrombotskog učinka (18). Bolesnici su nakon bolusa andexaneta 800 mg primali kontinuiranu infuziju 960 mg kroz 2 sata. Unutar dva sata dolazi do neutralizacije učinka te normalizacije aktivnosti FXa. Međutim, u praćenju bolesnika koji su primali andeksanet alfa u ANNEXA-4 studiji zabilježena je incidencija trombotskih incidenata od 18%, u 30. danu interim analize. Skoro 80% bolesnika imalo je dobru ili odličnu hemostazu 12 sati nakon isteka infuzije antidota (19).

Hemodijaliza se nije pokazala učinkovitom metodom uklanjanja DOAK-a iz krvi, jer se doza dabigatrana može sniziti za oko 50-75%, dok su rivaroksaban i apiksaban snažno vezani za proteine plazme

(87-95%) i ne mogu se ukloniti dijalizom (20,21). Ako je teško krvarenje nastupilo pod dabigatranom i ako je dostupan idarucizumab, ne preporuča se hemodijaliza. Aktivni ugljen se može dati ako je prošlo do 3 sata od uzimanja dabigatrana.

*Ciraparantag* (PER 977) je mala sintetska molekula koja se veže za DTI (direktne inhibitore trombina), inhibitore FXa, heparine (nefrakcionirani i niskomolekularni). Jasan mehanizam djelovanja nije poznat. Kod zdravih dobrovoljaca koji su uzimali edoksaban 60 mg, ciraparantag u dozi 100-300 mg intravenski pokazao je učinak u vidu reverzije učinka inhibitora FXa prateći anti FXa 10-30 minuta nakon primjene, bez potrebe drugog liječenja. Nije bilo porasta fragmenta protrombina 1,2, D-dimera, kao i TFPI („tissue factor pathway inhibitor“) (22,23).

*Nespecifični antidoti su koncentrat protrombinskog kompleksa* (eng. PCC – „prothrombin complex concentrate“) sadrže faktore ovisne o vitaminu K, s tri faktora (II, IX, X) ili četiri faktora (II, VII, IX, X). PCC je pokazao učinak u dozi od 50 IU/kg na direktne inhibitore FXa, dok nije imao učinak na dabigatran. U studiji na 12 dobrovoljaca koji su primali rivaroksaban, protrombinski kompleks je pokazao učinak na normalizaciju PV-a, dok nije utjecao na korekciju laboratorijskih parametara u bolesnika na dabigatranu (24). Aktivirani koncentrat protrombinskog kompleksa (aPCC) npr. FEIBA® poznati su u hemofiliji s inhibitorima. Terapijska je opcija doza od 50-100 IU/kg. U recentnoj studiji s 50 bolesnika koji su bili na rivaroxabanu, aPCC je pokazao najbolji učinak neutralizacije učinka u usporedbi s PCC i rFVIIa, odnosno reverzije antikoagulantnog učinka rivaroksabana prateći vremena stvaranja ugruška (CT „clotting time“) i TGA („thrombin generation assay“) mjerenih tromboelastometrijom ROTEM uređajem (25). Kod životno ugrožavajućeg krvarenja primjenjuje se i PCC 25 U/kg uz mogućnost ponavljanja doze za 8-12 sati. Više doze 50-80 IU/kg preporučuju se u primjenu kod bolesnika sa životno ugrožavajućem krvarenju te koji se podvrgavaju hitnom kirurškom zahvatu. Nema dokaza o koristi dodatne primjene aktiviranog rekombinantnog FVII (90 µg/kg). Primjena koncentrata protrombinskog kompleksa te rFVIIa nosi i rizik od tromboza, posebno kod starijih bolesnika (26).

#### 4. Zaključak

Direktni oralni antikoagulansi su se pokazali učinkovitima u odobrenim indikacijama liječenja i prevencije tromboembolijskih incidenata temeljem dokaza u brojnim studijama. Imaju bolji sigurnosni

profil nego antagonisti vitamina K. Krvarenja koja izazivaju, odnosno hitna potreba za operativnim postupcima nameće pitanje adekvatnog zbrinjavanja, liječenja odnosno antidota. Individualni pristup svakom bolesniku i procjena težine krvarenja je nužna, nakon čega slijedi odluka o mjerama liječenja. Idarucizumab je jedini odobreni specifični antidot, poništava učinak dabigatrana, dok andeksanet alfa uspješno neutralizira učinak inhibitora FXa, međutim nije još odobren. Od nespecifičnih antidota aPCC se pokazao uspješnijim u odnosu na PCC i mogao bi se primjenjivati kao nespecifični antidot za inhibitore FXa kao i kod teških krvarenja u bolesnika na VKA. Potrebne su još daljnje studije, odnosno meta-analize koje će utvrditi postojeće indikacije primjene antidota, vodeći pritom računa o neželjenim nuspojavama, u prvom redu trombozama.

## Literatura

1. Tagalakis V et al. Incidence and mortality from venous thromboembolism in a real-world population: the Q-VTE Study Cohort. *Am J Med.* 2013;126:832 e13-21.
2. Ansell JE. Universal, class-specific and drug-specific reversal agents for the new oral anticoagulants. *J Thromb Thrombolysis.* 2016;41:248-252.
3. Chai-Adisaksopha C, Crowther M, et al. The impact of bleeding complications in patients receiving target-specific oral anticoagulants: a systematic review and meta-analysis. *Blood.* 2014;124(15):2450-2458.
4. Chai-Adisaksopha C et al. Mortality outcomes in patients receiving direct oral anticoagulants: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost.* 2015;13(11):2012-2020.
5. Wilson D, Charidimou A, et al. CROMIS-2 collaborators. Volume and functional outcome of intracerebral hemorrhage according to oral anticoagulant type. *Neurology.* 2016;86(4):360-366.
6. Graham DJ Reichman ME et al. Cardiovascular, bleeding, and mortality risks in elderly Medicare patients treated with dabigatran or warfarin for nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation.* 2015;131(2): 157-164.
7. Shih AW, Crowther MA. Reversal of direct oral anticoagulants: a practical approach. *ASH Educational Book* 2016, 612-619.
8. De Crem N, Peerlinck K, et al. Abnormal uterine bleeding in VTE patients treated with rivaroxaban compared to vitamin K antagonists. *Thromb Res.* 2015;136(4):749-753.
9. Chan NC, Coppens M, et al. Real-world variability in dabigatran levels in patients with atrial fibrillation. *J Thromb Haemost.* 2015;13(3):353-359
10. Held C, Hylek EM, et al. Clinical outcomes and management associated with major bleeding in patients with atrial fibrillation treated with apixaban or warfarin. *Eur Heart J.* 2015;36(20): 1264-1272.
11. Piccini JP, Garg J, et al. Management of major bleeding events in patients treated with rivaroxaban vs warfarin : results from the ROCKET AF trial. *Eur Heart J.* 2014;35(28):1783-1880.
12. Washman JB, Piccini JP. Why develop antidotes and reversal agents for non-vitamin K oral anticoagulants? *J Thromb Thrombolysis.* 2016;41:279-284.
13. Aronis KN, Hylek EM. Who, when and how to reverse non-vitamin K oral anticoagulants. *J Thromb Thrombolysis.* 2016;41:253-272.
14. Pollack CV Jr, Reilly PA, et al. Idarucizumab for dabigatran reversal. *N Engl J Med.* 2015;373(6):511-520.
15. Schiele F, van Ryn J, et al. A specific antidote for dabigatran: functional and structural characterization. *Blood.* 2013; 121(18):3554-3562.
16. Glund S, Stangier J, et al. Idarucizumab, a specific antidote for dabigatran: immediate, complete and sustained reversal of dabigatran induced anticoagulation in elderly and renally impaired subjects. *Blood.* 2014;124(21):344.
17. Glund S, Moschetti V, et al. A randomised study in healthy volunteers to investigate the safety, tolerability and pharmacokinetics of idarucizumab, a specific antidote to dabigatran. *Thromb Haemost.* 2015; 113(5):943-951.
18. Siegal DM, Curnutte JT, et al. Andexanet Alfa for the Reversal of Factor Xa Inhibitor Activity. *N Engl J Med.* 2015;373:2413-2424.
19. Crowther M, Levy GG, et al. A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled trial demonstrating reversal of edoxaban-induced anticoagulation in healthy subjects by andexanet-alfa (PRT064445): a universal antidote for factor Xa (FXa) inhibitors. *Blood.* 2014; 124(21):426938.
20. Singh T, Maw TT, et al. Extracorporeal therapy for dabigatran removal in the treatment of acute bleeding: a single center experience. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(9):1533-1539.
21. Bakhru S, Laulicht B, et al. PER977: a synthetic small molecule which reverses over-dosage and bleeding by new oral natioagulats (abstract). *Circulation.* 2013;128 (suppl 22). Abstract 18809.
22. Ansell JE, Bakhru SH, et al. Use of PER977 to reverse the anticoagulant effect of edoxaban. *N Engl J Med.* 2014;371(22): 2141-2142.
23. Levi M, Moore KT, et al. Comparison of three-factor and four-factor prothrombin complex concentrates regarding reversal of the anticoagulant effects of rivroxaban in healthy volunteers. *J Thromb Haemost.* 2014;12(9):1428-1436.
24. Schultz NH, Tuyet Tran HT, et al. The reversal effect of prothrombin complex concentrate (PCC), activated PCC and recombinant activated factor VII against anticoagulation of Xa inhibitor. *Thrombosis Journal.* 2017;15(6):1-8.
25. Marlu R, Hodaj E, et al. Effect of non-specific reversal agents on anticoagulant activity of dabigatran and rivaroxaban. A randomised crossover ex vivo study in healthy volunteers. *Thromb Haemost* 2012;108:217-224.
26. van Ryn J, et al. Reversibility of the anticoagulant effect of high doses of the direct thrombin inhibitor dabigatran, by recombinant factor VIIa or activated prothrombin complex concentrate. *Haematologica.* 2008;93(suppl.2):148.

## Kalendar predstojećih hematoloških skupova

**Priredila: Vlatka Periša, dr. med.**

- **Proljetni sastanak KROHEMA** od 04.05 do 06.05.2017 u Vodicama (Hrvatska)
- **14<sup>th</sup> International Symposium on Myelodysplastic Syndromes (MDS 2017)** od 03.05 do 06.05.2017 u Valencia (Španjolska)
- **International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** od 04.05 do 06.05.2017 u Honolulu (Hawaii)
- **National Thrombosis Week Educational Meeting** 04.05.2017 u Cardiff (UK)
- **Cancer Associated Thrombosis Symposium** 05.05.2017 u Londonu (UK)
- **Spring School: The Science and Practice of Venous Thromboembolism** od 09.05 do 14.05.2017 u Chalkidiki (Grčka)
- **9<sup>th</sup> Anti-Thrombosis Masterclass** od 18.05 do 19.05.2017 u Madridu (Španjolska)
- **Clinical Updates on Multiple Myeloma** od 19.05 do 21.05.2017 u Parizu (Francuska)
- **Korean Society of Hematology - Joint Symposium** od 26.05 do 27.05.2017 u Seulu (Južna Koreja)
- **Clinical and Laboratory Haemostasis 2017** od 07.06 do 08.06.2017 u Sheffield (UK)
- **14<sup>th</sup> The International Conference on Malignant Lymphoma (ICML)** od 14 do 16.06.2017 u Luganu (Švicarska)
- **22<sup>nd</sup> of EHA** od 22.06 do 25.06.2017 u Madridu (Španjolska)
- **Musculoskeletal Ultrasound in Hemophilia** od 28.06 do 30.06.2017 u San Diego (SAD)
- **ISTH 2017 Congress** od 08.07 do 13.07.2017 u Berlinu (Njemačka)
- **Musculoskeletal Ultrasound in Hemophilia** od 23.08 do 25.08.2017 u San Diego (SAD)
- **US Focus on Myeloproliferative Neoplasms and Myelodysplastic Syndromes** od 04.08 do 05.08.2017 Philadelphia (SAD)
- **Hematology and Oncology 2017** od 29.06 do 01.07.2017 u Bangkoku (Tajland)
- **Society of Hematologic Oncology 2017 Annual Meeting** od 13.09 do 16.09.2017 u Houston (SAD)
- **Highlights of Past EHA-HOPE** od 14.09 do 16.09.2017 u Kairu (Egipat)
- **3<sup>rd</sup> International Conference on New Concepts in Lymphoid Malignancies: Focus on CLL and Indolent Lymphoma** od 15.09 do 17.09.2017 u Mandelieu (Francuska)
- **7. Hrvatski kongres hematologa s međunarodnim sudjelovanjem** od 20.09 do 23.09.2017 u Šibeniku (Hrvatska)
- **4<sup>th</sup> International Conference on Acute Myeloid Leukemia “Molecular and Translational”: Advances in Biology and Treatment** od 05.10 do 07.10.2017 u Estoril (Portugal)
- **9<sup>th</sup> International Conference on Leukemia and Hematologic Oncology** od 05.10 do 06.10.2017 u Londonu (UK)

- **EHA-SWG Scientific Meeting on Challenges in the Diagnosis and Management of Myeloproliferative Neoplasms** od 12.10 do 14.10.2017 u Budimpešti (Mađarska)
- **19<sup>th</sup> Annual John Goldman Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy** od 12.10 do 15.10.2017 u Estoril (Portugal)
- **Musculoskeletal Ultrasound in Hemophilia** od 18.10 do 20.10.2017 u San Diego (SAD)
- **Lebanese Society of Hematology Annual Meeting – EHA Joint Symposium** od 12.10 do 14.10.2017 u Beirut, Libanon
- **EHA Tutorial on Biology and Management of Myeloid Malignancies** od 20.10 do 21.10.2017 u Yerevan (Armenija)
- **Russian Onco-Hematology Society's Conference on Malignant Lymphoma - Joint Symposium** od 26.10 do 27.10.2017 u Moskvi (Rusija)
- **Lymphoma & Myeloma 2017: An International Congress on Hematologic Malignancies** od 26.10 do 28.10.2017 u New York (SAD)
- **Haemophilia Academy 2017** od 30.10 do 03.11.2017 u Edinburgh (Škotska)
- **International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases** od 30.10 do 01.11.2017 u Houston (SAD)
- **Turkish Society of Hematology - EHA Joint Symposium** 3.11.2017 u Antaliji (Turska)
- **Indian Society of Haematology and Blood Transfusion - EHA Joint Symposium** od 02.11 do 05.11.2017 u Guwahati (Assam, India)
- **Argentinian Society of Hematology - EHA Joint Education Day** od 17.11 do 18.11.2017 u Mar del Plata (Argentina)
- **59<sup>th</sup> American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting & Exposition** od 09.12 do 12.12.2017 u Atlanti (SAD)
- **4<sup>th</sup> Congress on Controversies in Thrombosis and Hemostasis (CiTH) 2017 (Not Final)** Location is not final



