

Svibanj 2018.

ISSN 1847-2273 (tiskana inačica)

ISSN 2584-7244 (mrežna inačica)

# Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM



Volumen 10., Broj 1.

**KroHem**

## **Impresum**

Bilten Krohema

Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM

Volumen 10., Broj 1., Svibanj 2018.

ISSN 1847-2273 (tiskana inačica)

ISSN 2584-7244 (mrežna inačica, on-line)

### **Nakladnik:**

Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM

### **Za nakladnika:**

Igor Aurer

### **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  
Antonija Babić  
Marko Barešić  
Drago Batinić  
Ernest Bilić  
Ervina Bilić  
Ines Bojanic  
Ivana Budisavljević  
Romana Čeović  
Lana Desnica  
Antica Duletić Načinović  
Nadira Duraković  
Davorka Dušek  
Neven Franjić  
Zlatko Giljević  
Koraljka Gjadrov Kuveždić  
Magdalena Grce  
Dragana Grohovac  
Aron Grubešić  
Ita Hadžisejdić  
Ivan Host  
Ivana Ilić

Ana Terezija Jerbić Radetić  
Nives Jonjić  
Irena Karas  
Miljenko Katunarić  
Tajana Klepac Pulanić  
Lucija Kraljević  
Lejla Kurić  
Ružica Lasan-Trčić  
Gordan Lauc  
Andreja Lukić Suknaić  
Dina Ljubas Kelečić  
Toni Matić  
Sanja Mazić  
Milan Milošević  
Zdravko Mitrović  
Marinka Mravak-Stipetić  
Damir Nemet  
Sabina Novaković Coha  
Slobodanka Ostojić Kolonić  
Steven Živko Pavletić  
Vlatko Pejša  
Zinaida Perić

Vlatka Periša  
Duška Petranović  
Igor Petriček  
Ema Prenc  
Maja Pučić Baković  
Dražen Pulanić  
Ljubica Rajić  
Violeta Rezo Vranješ  
Sunčica Ries  
Goran Rinčić  
Ranka Serventi-Seiwerth  
Marija Stanić  
Nina Šaban  
Branimir Ivan Šepc  
Barbara Tomic  
Antonela Trobentar  
Toni Valković  
Radovan Vrhovac  
Tamara Vukić  
Renata Zadro  
Ana Zelić Kerep  
Silva Zupančić Šalek

### **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 u potpunosti su dostupni su na web stranicama Krohema: [www.krohem.hr](http://www.krohem.hr)

# Sadržaj

<b>Igor Aurer:</b>	
Uvodnik .....	2
<b>Damir Nemet:</b>	
Zaklada Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem – karika koja je nedostajala .....	3
<b>Silva Zupančić Šalek, Dražen Pulanić, Slobodanka Ostojić-Kolonić, Vlatko Pejša, Toni Valković, Damir Nemet:</b>	
Hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje primarne imune trombocitopenije u odraslih .....	5
<b>Renata Zadro:</b>	
Utjecaj direktnih oralnih antikoagulanata na rezultate koagulacijskih pretraga .....	14
<b>Zdravko Mitrović:</b>	
Stariji bolesnici s agresivnim limfomom – je li dob najvažniji parametar? .....	17
<b>Sabina Novaković Coha, Goran Rinčić:</b>	
Limfom plaštene zone .....	20
<b>Ita Hadžisejdić, Miljenko Katunarić, Toni Valković, Nives Jonjić:</b>	
Tekuća biopsija i njezin značaj u hematologiji .....	23
<b>Barbara Tomić, Ernest Bilić:</b>	
Prolazni mijeloproliferativni poremećaj u djece s Downovim sindromom .....	26
<b>Sunčica Ries, Koraljka Gjadrov Kuveždić:</b>	
Akutna eritroidna leukemija: stari/novi entitet-morfološka reklassifikacija slučajeva u KBC-u Zagreb od 2008. do 2016. godine .....	30
<b>Ana Zelić Kerep:</b>	
<i>Chimeric antigen receptor T-cells</i> – od ideje do komercijalno dostupnog proizvoda .....	33
<b>Duška Petranović, Ana Terezija Jerbić Radetić, Antonela Trobentar, Antica Duletić Načinović, Ivan Host, Dragana Grohovac, Neven Franjić, Marija Stanić, Ivana Budisavljević, Aron Grubešić, Toni Valković:</b>	
Kvaliteta života hematoloških bolesnika .....	36
<b>Dražen Pulanić, Lana Desnica, Ranka Serventi-Seiwerth, Marinka Mravak-Stipetić, Ervina Bilić, Romana Čeović, Nadira Duraković, Zinaida Perić, Lucija Kraljević, Ernest Bilić, Ines Bojanić, Sanja Mazić, Igor Petriček, Dina Ljubas Kelečić, Tamara Vukić, Tajana Klepac Pulanić, Branimir Ivan Šepc, Marko Barešić, Irena Karas, Ljubica Rajić, Toni Matić, Davorka Dušek, Nina Šaban, Ema Prenc, Lejla Kurić, Antonija Babić, Ivana Ilić, Violeta Rezo Vranješ, Zlatko Giljević, Milan Milošević, Maja Pučić Baković, Magdalena Grce, Gordan Lauc, Renata Zadro, Drago Batinić, Radovan Vrhovac, Steven Živko Pavletić, Damir Nemet:</b>	
Pet godina multidisciplinarnog tima za kroničnu bolest presatka protiv primatelja KBC Zagreb .....	38
<b>Iz knjige “Institut Ruđer Bošković - Ljudi i dogadaji 1950. - 2000.”, autori Tanja Rudež i Krunoslav Pisk:</b>	
Kako su znanstvena postignuća na Institutu Ruđer Bošković dovela do prvog presađivanja koštane srži u Hrvatskoj (sjećanja Milivoja Boranića) .....	42
<b>Ružica Lasan-Trčić:</b>	
Pola stoljeća fuzijskih gena .....	47
<b>Andreja Lukić Suknaić:</b>	
<i>In memoriam:</i> Zlatka Nemet – Lojan, dr. med. (1953. - 2018.) .....	50
<b>Silva Zupančić Šalek:</b>	
<i>In memoriam:</i> Prim. mr. sc. Vinko Bogdanić, dr. med. (1938. - 2018.) .....	51
<b>Vlatka Periša:</b>	
Kalendar predstojećih hematoloških skupova .....	53
<b>Dražen Pulanić:</b>	
Deset godina časopisa „Bilten Krohema“ .....	55

## Uvodnik

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

Nakon 12 godina postojanja (i više ako ubrojimo one kad se zvao NASH) KROHEM je dobio 3. predsjednika.

Prof. dr. Damir Nemet je u svom mandatu finansijski i organizacijski stabilizirao udrugu, čime je osigurao njenu budućnost. Osnovao je Zakladu KROHEM-a koja će, uvjeren sam, olakšati mlađim kolegama bavljenje znanosću i istraživanjima. Modificirao je raspored događanja na našim sastancima, ostavljajući malo više vremena za upoznavanje ljepota hrvatskih krajeva što je ponekad znalo uzne-miriti sponzore, ali uvjeren sam, doprinijelo da mi, članovi KROHEM-a, s više zadovoljstva sudjelujemo na sastancima.

Velika mi je čast što ste mi ukazali povjerenje da nastavim putem kojim su našu udrugu poveli prof. dr. Boris Labar i prof. dr. Damir Nemet. Nadam se da će to povjerenje opravdati. Ne smijemo smetnuti s uma da je KROHEM osnovan po uzoru na uspješne kooperativne skupine iz drugih zemalja prvenstveno kako bi omogućio provođenje kliničkih i drugih istraživanja u hematologiji. Temelj za ispunjavanje tog cilja su aktivnosti radnih skupina. Stoga se nadam da ćemo na proljetnom sastanku usvojiti promjene statuta po kojima će njihovi voditelji postati članovi upravnog odbora i tako i formalno preuzeti upravljanje udrugom. Ovo proljeće ćemo sastanak započeti odvojenim sastancima radnih skupina, olakšavajući tako slobodniju raspravu i razmjenu ideja, planova i programa istraživanja. Ako se to pokaže korisnim, nastaviti ćemo s time i na sljedećim sastancima. Većina članova je podržala organizaciju redovitih sastanaka KROHEM-a dva

puta godišnje osim kad se bude održavao kongres Hrvatskog društva za hematologiju (HDH) pa ćemo s time nastaviti. Mnogi su međutim imali primjedbe na previše satelitskih simpozija. Pokušat ćemo ih reducirati, no oni su za sada važan izvor prihoda i farmaceutske tvrtke su jako zainteresirane za njih, pa ćemo pokušati naći zlatnu sredinu i prvenstveno ih dogovarati za prikaze novih lijekova ili indikacija. Jedna od ne tako uspješnih aktivnosti KROHEM-a su naši registri. Kvaliteta podataka ne zadovoljava. Obzirom da podaci iz stvarnog života postaju sve važniji, kako zdravstvenoj administraciji i osiguravateljima, tako i farmaceutskim tvrtkama, moramo na tome poraditi. Dosadašnji načini upisivanja podataka se nisu pokazali optimalnim i možda je došlo vrijeme da pronađemo drugačije, efikasnije rješenje. O tome ćemo razgovarati na ovogodišnjoj skupštini. Naposlijetku, obzirom da se HDH etablirao te da su skoro svi hematolozi članovi i tog društva i KROHEM-a, mislim da KROHEM i HDH moraju blisko surađivati. U tom duhu će, kao što se na kongresu HDH-a prošle jeseni održao sastanak KROHEM-a, stručni program ovog proljetnog sastanka biti organiziran u suradnji s HDH-om.

Dragi članovi KROHEM-a, pred nama je uzbudljivo vrijeme s puno novih mogućnosti. Da bismo ih mogli ostvariti, trebamo se potruditi svi zajedno. Ni predsjednik niti voditelji radnih skupina to ne mogu sami. S veseljem očekujemo vaše nove ideje, prijedloge i aktivnosti, kako bismo unaprijedili hrvatsku i svjetsku hematologiju, na korist svima, a prvenstveno našim bolesnicima!

Vaš predsjednik KROHEM-a,  
Prof. dr. Igor Aurer

## Zaklada Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti – karika koja je nedostajala

Prof. dr. sc. Damir Nemet



Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti KROHEM je u lipnju 2017. osnovala Zakladu pod nazivom Zaklada Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti, skraćeno Zaklada KROHEM-a. Svrha djelovanja Zaklade je unaprjeđenje hrvatske hematologije kroz obrazovanje liječnika i drugih stručnjaka koji djeluju u području dijagnostike i liječenja hematoloških bolesti, poticanje temeljnih i kliničkih istraživanja te njegovanje izvrsnosti u stručnom i znanstvenom radu u području hematologije.

### Koji su ciljevi Zaklade KROHEM-a?

Zaklada je neovisna, neprofitna organizacija čiji su ciljevi pružanje finansijske, stručne i svake druge pomoći liječnicima specijalantima i specijalistima internističke i pedijatrijske hematologije, internistima koji se bave hematologijom te svim djelatnicima visoke stručne spreme koji se bave dijagnostikom i liječenjem hematoloških bolesti, u vidu plaćanja školarina za poslijediplomske studije kao i za svaki drugi oblik poslijediplomskog usavršavanja i cjeloživotnog učenja u području hematologije u Republici Hrvatskoj i u inozemstvu. Osim poticanja edukacije Zaklada pruža finansijsku i svu drugu podršku za realizaciju znanstvenih i stručnih istraživanja u području hematologije te potiče izvrsnost nagrađivanjem najboljih znanstvenih i stručnih radova i postignuća iz područja hematologije.

### Što Zaklada znači za hrvatsku hematologiju?

Osnivanjem Zaklade KROHEM-a hrvatska hematologija je zaokružila svoj organizacijski okvir koji se sastoji od Hrvatskog hematološkog društva Hrvatskog liječničkog zbora koje je temeljni oblik strukovne organizacije i u pravnom smislu predstavnik hrvatske hematologije prema vlastima, zatim Kooperativne grupe KROHEM koja je glavno operativno tijelo hematološke struke i znanosti u Hrvatskoj te konačno Zaklade koja je promotor edukacije, stručnih i znanstvenih istraživanja te potica-

telj izvrsnosti u hrvatskoj hematologiji. Kako bi hrvatska hematologija napredovala i dostigla svjetske standarde na cijelom teritoriju Hrvatske potrebno je da svaka od ovih komponenti u svojim okvirima djeluje na najbolji mogući način.

Moto djelovanja Zaklade je obrazovanje, znanost, poticanje izvrsnosti i humanost kao vizija moderne i uspješne medicine.

### Tko upravlja Zakladom?

Zakladna tijela su Upravitelj Zaklade, Upravno vijeće i Nadzorni odbor. Upravitelj Zaklade je prof. dr. sc. Damir Nemet, a Upravno vijeće i Nadzorni odbor čine najistaknutiji stručnjaci u području hematologije u Republici Hrvatskoj. Upravno vijeće čine:

- Prof. dr. sc. Igor Aurer, Klinički bolnički centar Zagreb
- Prof. dr. sc. Petar Gačina, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice
- Prim. dr. Marinka Jakić Bubalo, Klinički bolnički centar Split
- Prof. dr. sc. Branimir Jakšić, Klinička bolnica Merkur, u mirovini
- Prof. dr. sc. emer. Boris Labar, Klinički bolnički centar Zagreb, u mirovini
- Prof. dr. sc. Mirando Mrsić, saborski zastupnik, Zagreb
- Prof. dr. sc. Slobodanka Ostojić Kolonić, Klinička bolnica Merkur
- Prof. dr. sc. Vlatko Pejša, Klinička bolnica Dubrava
- Prim. dr. Jasmina Sinčić Petričević, Klinički bolnički centar Osijek
- Prof. dr. sc. Toni Valković, Klinički bolnički centar Rijeka

### Nadzorni odbor čine:

- Prof. dr. sc. Ernest Bilić, Klinički bolnički centar Zagreb

- Prim. dr. Božena Coha, Opća bolnica Dr. Josip Benčević, Slavonski Brod
- Prof. dr. sc. Slavko Gašparov, Klinička bolnica Merkur

## Kako Zaklada osigurava sredstva za ispunjenje svoje svrhe i ciljeva?

Sredstva Zaklade prikupljaju se redovitim godišnjim uplatama Zakladnika tj. KROHEM-a, donacijama fizičkih i pravnih osoba te članova-podupiratelja Zaklade, djelatnostima Zaklade, prilozima domaćih i stranih fizičkih i pravnih osoba kao i na ostale načine propisane zakonom.

## Kako Zaklada provodi dodjelu sredstava?

Zaklada raspisuje javni natječaj za dodjelu sredstava. Povjerenstvo imenovano od strane Upravnog vijeća Zaklade odlučuje o dodjeli sredstava prema Pravilniku o kriterijima i postupku dodjele sredstava.

## Zaklada je dodijelila prve stipendije za doktorske studije za akademsku godinu 2017./2018.

Zaklada je na početku svog djelovanja već dodijelila četiri stipendije za školarine doktorskih studija studentima doktorskih studija na medicinskim i srodnim fakultetima u Republici Hrvatskoj:

- Ivani Horvat, Ogrizovićeva 13, 10000 Zagreb
- Idi Hude, Franje Tuđmana 27, 10431, Sveti Nedelja
- Marinu Međugorcu, Horvačanska 39, 10000 Zagreb
- Zrinku Šaleku, Kneza Trpimira 43, 10432 Bregana

U tijeku je raspisivanje natječaja za dodjelu sredstava za stručna i znanstvena istraživanja te natječaj za godišnju nagradu za najbolja postignuća u hematologiji. Na proljetnom sastanku KROHEM-a bit će dodijeljene nagrade za najbolja postignuća u hrvatskoj hematologiji u 2017. godini.

## Zašto treba biti podupiratelj Zaklade?

Podupiratelj Zaklade omogućava ostvarivanje ciljeva Zaklade, poticanje obrazovanja liječnika i drugih stručnjaka koji djeluju u području dijagnostike i liječenja hematoloških bolesti, primjenu novih terapijskih pristupa i lijekova, pomoći u provođenju bazičnih i kliničkih istraživanja te poticanje izvrsnosti kroz nagradivanje najuspješnijih, a sve s krajnjim ciljem unaprjeđenja hrvatske medicine i dobrobiti naših bolesnika.

## Kako donirati i postati član-podupiratelj Zaklade?

Zakladi mogu donirati sredstva i pristupiti kao članovi podupiratelji fizičke i pravne osobe. Članovi podupiratelji Zaklade financijskim sredstvima i na druge načine doprinose ostvarivanju ciljeva i svrhe Zaklade. Član podupiratelj pomaže djelatnost Zaklade godišnjom uplatom sredstava (članarine) prema vlastitim mogućnostima ali u pravilu ne manje od 500 eura u kunskoj protuvrijednosti za pravne osobe odnosno 30 eura u kunskoj protuvrijednosti za fizičke osobe.

Zaklada svakom članu podupiratelju i donatoru dodjeljuje prigodnu zahvalnicu.

## SVI ČLANOVI KROHEM-A UČLANITE SE U ZAKLADU I POSTANITE PODUPIRATELJ ZAKLADE!

Kako bismo ostvarili ciljeve Zaklade pozivamo sve članove KROHEM-a da se učlane te financijski i na sve druge načine, sudjelovanjem u aktivnostima Zaklade kao i promoviranjem Zaklade i sakupljanjem donacija, pomognu rad Zaklade jer time pomažu napredak hrvatske hematologije, a direktno ili indirektno i svoj osobni napredak.

Sve informacije o Zakladi, Statut te Pravilnik o kriterijima i načinu dodjele sredstava, nalazi se na web stranici Zaklade [www.zaklada-krohem.hr](http://www.zaklada-krohem.hr)



## Hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje primarne imune trombocitopenije u odraslih\*

**Silva Zupančić Šalek<sup>1</sup>, Dražen Pulanić<sup>1</sup>, Slobodanka Ostojić-Kolonić<sup>2</sup>, Vlatko Pejša<sup>3</sup>, Toni Valković<sup>4</sup>, Damir Nemet<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Referentni centar Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske za nasljedne i stečene bolesti hemostaze, Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Medicinski fakultet Osijek Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku

<sup>2</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>3</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Dubrava, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

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

### Adresa autora za kontaktiranje:

Prof. dr. sc. Silva Zupančić Šalek, dr. med.

Referentni centar Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske za nasljedne i stečene bolesti hemostaze

Odjel za hemostazu i trombozu, te benigne bolesti krvotvornog sustava

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

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Medicinski fakultet Osijek Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku

Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb

E-pošta: silva.zupancic-salek@zg.t-com.hr

### Sažetak

Radna skupina za bolesti hemostaze i tromboze Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (KROHEM), Referentni centar Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske za nasljedne i stečene bolesti hemostaze, te Hrvatsko hematološko društvo Hrvatskog liječničkog zbora izradili su hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje odraslih bolesnika s primarnom imunom trombocitopenijom (ITP). Detaljnim kliničkim i laboratorijskim pregledom treba isključiti niz čestih uzroka sekundarne trombocitopenije. Predlaže se individualizirani pristup liječenju, gdje se odluka o početku aktivnog liječenja temelji na ozbiljnosti i riziku krvarenja, broju trombocita, životnom stilu, starosti bolesnika i komorbiditetima. Prva linija terapije ITP su kortikosteroidi, s ili bez primjene intravenskih imunoglobulina. U drugoj terapijskoj liniji predlaže se splenektomija ili liječenje agonistima trombopoetinskih receptora. Kod splenektomiranih bolesnika s relapsom ITP, preporučuje se liječenje agonistima trombopoetinskih receptora. Alternativno se sugerira mogućnost primjene rituksimaba i drugih imunosupresiva u drugoj ili kasnijoj terapijskoj liniji.

**Ključne riječi:** imuna trombocitopenija, dijagnoza, liječenje, smjernice, Hrvatska.

### Uvod

Primarna imuna trombocitopenija (ITP) je stečeni autoimunosni poremećaj koji dovodi do izoliranog smanjenja broja trombocita ispod  $100 \times 10^9 / L$  u perifernoj krvi, uz izostanak uzročnog ili osnovnog stanja koje je moglo dovesti do trombocitopenije.<sup>1</sup> Imuna trombocitopenija zahvaća sve dobne i etničke skupine. U odraslih oboljelih od ITP omjer žena pre-

ma muškarcima je 1,2–1,9.<sup>2–4</sup> Incidencija ITP raste s dobi i najveća je u osoba starijih od 60 godina.<sup>2,4–5</sup> U Europi je procijenjena incidencija ITP u odraslih od 1 do 3,2 na 100 000 osoba,<sup>2,4–5</sup> dok podaci za Hrvatsku nisu poznati. Posljednjih godina se u svjetskoj literaturi postigla standardizacija terminologije ITP-a. Zadržan je akronim ITP, no on više ne znači

\* Rad je objavljen u Liječničkom vjesniku (Liječ Vjesn. 2017;139:192–8.) te ga prenosimo uz odobrenje glavnog urednika Liječničkog vjesnika.

„idiopatska trombocitopenična purpura“, već „imuna trombocitopenija“, jer značajan udio bolesnika nema purpuru.<sup>1</sup> Također, kako bi se uzela u obzir varijabilnost normalnih razina trombocita različitih populacija i kako bi se izbjegla kriva dijagnoza, za dijagnozu ITP je potrebna razina trombocita ispod  $100 \times 10^9/L$  u perifernoj krvi. Imuna trombocitopenija se dijeli prema trajanju bolesti na: a) akutnu (novodijagnosticiranu) ITP u trajanju do tri mjeseca nakon postavljanja dijagnoze, b) perzistentnu ITP koja traje od tri do dvanaest mjeseci nakon postavljanja dijagnoze, i c) kroničnu ITP koja traje dulje od 12 mjeseci nakon postavljanja dijagnoze.<sup>1,6</sup>

Radna skupina za bolesti hemostaze i tromboze Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti (KROHEM) i Referentni centar Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske za nasljedne i stecene bolesti hemostaze, zajedno s Hrvatskim hematološkim društvom Hrvatskog liječničkog zbora, nakon analize objavljenih radova izradili su hrvatske smjernice za dijagnostiku i liječenje odraslih bolesnika s primarnom ITP. U izradi ovih smjernica sudjelovali su hematolozi iskusni u radu s odraslim bolesnicima koji boluju od ITP. Snaga preporuke i razina dokaza temeljila se na GRADE sustavu (engl. *Grading of Recommendation, Assessment, Development and Evaluation group*) međunarodne ekspertne skupine za donošenje smjernica utemeljene na dokazima.<sup>6,7</sup> Preporuke koje se snažno preporučuju označene su brojem 1 i terminom „preporučuju se“, dok su one s malom snagom dokaza označene brojem 2 i terminom „predlaže se“. Nakon navedenog broja koji označava snagu preporuke slijedi slovo koje označava razinu dokaza: A – visoka razina dokaza, B – srednja razina dokaza, C – niska razina dokaza, D – vrlo niska razina dokaza. Ove smjernice su namijenjene primarno hematolozima ali i liječnicima drugih specijalizacija koji liječe bolesnike s ITP, kako bi se standardizirala dijagnostika i liječenje ove bolesti u našoj državi. Izrada smjernica nije finansijski potpognuta.

## Dijagnostika primarne ITP

S obzirom na veliki broj potencijalnih uzroka trombocitopenije, nema zlatnog standarda pri postavljanju dijagnoze primarne ITP. Detaljnim anamnestičkim i kliničkim pregledom treba pokušati isključiti niz čestih uzroka sekundarne trombocitopenije: virusne bolesti, imunodeficijencije, autoimunosne bolesti (osobito SLE i antifosfolipidni sindrom), limfoproliferativne bolesti, primjenu antitrombocitnih i drugih lijekova te recentno primije-

njenih cjepiva. Tijekom pregleda bolesnika bitno je provjeriti postoje li uz simptome krvarenja i hepatosplenomegalija, limfadenopatija, ili znaci kongenitalnih poremećaja. U analizi hematoloških nalaza treba potvrditi izoliranu trombocitopeniju s razinom trombocita  $< 100 \times 10^9/L$ , uz normalan broj leukocita i diferencijalnu krvnu sliku. Anemija je moguća samo uz značajna krvarenja. U obradu je svakako potrebno uključiti citološki razmaz periferne krvi, broj retikulocita, direktni antiglobulinski test, kvantitativno određivanje imunoglobulina, testiranje na HIV, HCV, te Helicobacter pylori. Tijekom obrade mogu se odrediti i antitrombocitna, antifosfolipidna i antinuklearna antitijela, hormoni štitnjače, te PCR na parvovirus i CMV, iako temeljem razine dokaza ne postoje izrazite preporuke za navedene pretrage u obradi ITP. U perifernom razmazu krvi u bolesnika s ITP trombociti su normalne veličine ili veliki, dok je morfologija eritrocita i leukocita normalna. Analiza koštane srži nije potrebna u bolesnika s tipičnom prezentacijom ITP, no može biti informativna u starijih od 60 godina, u bolesnika sa sustavnim simptomima, u kojih postoji sumnja na hematološku neoplazmu te u onih u kojih se planira splenektomija.<sup>1,6</sup> Uz morfološku analizu koštane srži, treba razmotriti i protočnu citometriju i citogenetiku.<sup>1</sup>

Nakon inicijalne dijagnostičke obrade, važno je steći uvid u životni stil bolesnika, rizike od ozljeda i krvarenja vezane uz zanimanje i uobičajene tjelesne aktivnosti, te procijeniti učestalost i simptome krvarenja. Važno je utvrditi komorbiditete, provjeriti koristi li bolesnik antitrombocitne ili druge lijekove ili pripravke.<sup>8</sup> S bolesnikom treba raspraviti i usvojiti učinkoviti i minimalno rizičan terapijski plan, koji omogućava ostvarenje dobre kvalitete života. Asimptomatski bolesnici i oni sa samo blagim simptomima krvarenja (isključivo blaža kožna krvarenja, petehije i slično) mogu se samo opservirati uz periodičnu kontrolu tijeka bolesti i broja trombocita, pod uvjetom da razina trombocita ne ukazuje na znatan rizik ozbiljnih krvarenja (stabilan broj trombocita u simptomatskih bolesnika je veći od  $50 \times 10^9/L$  ili u asimptomatskih veći od  $30 \times 10^9/L$ ).<sup>1,6</sup>

## Prva linija terapije ITP-a

Odluka o početku aktivnog liječenja individualna je za svakog bolesnika i temelji se na ozbiljnosti krvarenja, broju trombocita, riziku krvarenja, životnom stilu, starosti bolesnika i komorbiditetima. Broj trombocita u kojeg se uobičajeno započinje liječenje jest  $< 30 \times 10^9/L$ . Međutim, kako je već istaknuto, broj trombocita nikako nije jedina i izolirana odrednica

početka liječenja. Liječenje se može započeti uz razinu trombocita  $<50 \times 10^9/L$ , ukoliko se primjerice radi o mlađem bolesniku aktivnijeg ili rizičnijeg životnog stila, sportašu, fizičkom radniku, ili pak simptomatskom bolesniku s niz komorbiditeta. Preferencije bolesnika, dostizanje adekvatne kvalitete života i nuspojave liječenja također znatno utječe na terapijski plan već u inicijalnoj fazi liječenja, a izrazito su bitne ukoliko se liječenje ITP nastavlja kroz više mjeseci.<sup>9,10</sup> Treba uzeti u obzir i udio od oko 10% bolesnika s ITP u kojih se bolest spontano povlači i bez terapije.<sup>9</sup>

**Kortikosteroidi s ili bez intravenskih imunglobulina** su okosnica prve terapijske linije, uz ostale hitne (eng. *rescue*) postupke prema potrebi (1B). Primjenjuje se nekoliko shema:

- prednizon 1 mg/kg (0,5-2,0 mg/kg) dnevno *per os* tijekom 2-4 tjedna do postizanja odgovora trombocita (Tablica 1). Alternativno se može primijeniti metilprednizolon *per os* ili *iv* u ekvivalentnim kortikosteroidnim dozama. Nakon postizanja odgovora, doza lijeka se postupno smanjuje. Oko 70-80% bolesnika odgovori na liječenje tijekom nekoliko dana do nekoliko tjedana.<sup>11</sup>
- Umjesto prednizona ili metilprednizolona mogu se primijeniti visoke pulsne doze deksametazona 40 mg *iv* dnevno tijekom 4 dana, u 28-dnevnim ciklusima (ili svakih 2-4 tjedna), kroz 4 ciklusa. Iako je prikazana visoka stopa održanih dugotrajnih odgovora od 60% (čak do 80% kod primjene 3-6 ciklusa), nema randomizirane usporedbe sa standardnim liječenjem kortikosteroidima.<sup>1,12</sup>

Nedovoljna je razina i snaga dokaza temeljem kojih bi određeni kortikosteroidni protokol imao prednost u prvoj terapijskoj liniji. U odabiru pristupa liječenju značajnu ulogu imaju želje bolesnika i liječnika te iskustva pojedinih centara. Međunarodne smjernice predlažu dulju primjenu kortikosteroida u odnosu na kraću (2B), temeljem studije koja je analizirala usporedbu primjene kratkotrajne terapije (intravenski imunglobulin (IVIg) ili intravenski kortikosteroidi kroz tri dana nakon čega se primao placebo od 4.-21. dana) u odnosu na dugotrajniju terapiju (IVIg ili intravenski kortikosteroidi tijekom prva tri dana nakon čega su slijedili oralni kortikosteroidi od 4.-21. dana), u kojoj je uočeno dulje trajanje odgovora u skupini bolesnika liječenih dugotrajnjom terapijom.<sup>13</sup> Unatoč relativno brzom odgovoru u 50% do 90% bolesnika liječenih kortikosteroidi-

ma, u čak 39% bolesnika liječenje kortikosteroidima mora se prekinuti ili je potrebno smanjiti dozu zbog razvoja nuspojava. Redukcije doze ili prekid liječenja kod bolesnika koji su odgovorili na liječenje karakterizira niska stopa održanih odgovora, stoga su remisije nakon prekida kortikosteroidne terapije održane tek u 10-30% bolesnika.<sup>1,9,14-16</sup>

**Intravenski imunglobulin (IVIg)** se primjenjuju uz kortikosteroide ukoliko je potrebno brzo povišiti broj trombocita, primjerice kod krvarenja ili kod neodgodivog kirurškog zahvata (1B). Višekratno ili periodično se mogu primijeniti u bolesnika s izostankom ili nedostatnim odgovorom na kortikosteroide. Uz premedikaciju, IVIg se može primijeniti u dnevnoj dozi od 1 g/kg tjelesne težine jednokratno ili opetovano tijekom dva dana (svaki dan 1 g/kg). Alternativno se IVIg može primijeniti u dnevnoj dozi od 0,4 g/kg tjelesne težine tijekom pet dana. Očekuje se odgovor na liječenje u oko 80% bolesnika, vrijeme do odgovora od oko dva do četiri dana, no kratko trajanje odgovora na razini nekoliko dana do nekoliko tjedana. Perzistentni odgovor na liječenje IVIg zabilježen je u vrlo malog udjelu bolesnika.<sup>17</sup> Nuspojave liječenja uključuju glavobolju, aseptički meningitis, prolaznu neutropeniju, bubrežnu insuficijenciju, trombozu, febrilitet, umor, mučninu, proljev, tahikardiju i poremećaje krvnog tlaka. Kod kontraindikacije za kortikosteroide mogu se iznimno u odabranih bolesnika opetovano koristiti i u monoterapiji.

**Transfuzije koncentrata trombocita** nužne su samo u hitnim slučajevima po život opasnih krvarenja. Tada nadoknada broja trombocita koncentrata trombocita predstavlja jednu od kratkoročnih intervencija.<sup>1</sup> U pravilu, transfuzije koncentrata trombocita u ITP treba izbjegavati, a ako su nužne u vitalno ugrožavajućim krvarenjima, tada se kombiniraju s primjenom intravenskih imunglobulina i kortikosteroida. Također se mogu koristiti tijekom pripreme bolesnika za hitnu splenektomiju. Moguća je i primjena antifibrinolitika (traneksamične kiseline) u hitnim slučajevima životno ugrožavajućih krvarenja, a u takvim situacijama se može razmotriti i primjena rekombinantnog aktiviranog FVIIa, uz oprez zbog povećanog rizika za nastanak tromboze.<sup>6</sup>

**Ostale potencijalno korisne intervencije** primjenjuju se u liječenju bolesnika s ITP, poput reguliranja krvnog tlaka, prekida uzimanja lijekova koji remete funkciju trombocita, sprječavanja obilnih menstruacija u žena, minimaliziranje traume, primjena antifibrinolitika, redukcije rizika tromboze u grupi rizičnih bolesnika, i slično.

Trajanje liječenja kortikosteroidima i intravenskim imunoglobulinima te primjenjene doze ovise o brzini oporavka trombocita i o nuspojavama liječenja. Bolesnika treba uputiti u važnost bilježenja i prijavljivanja nuspojava, infekcija, febriliteta, u proaktivno praćenje krvnog tlaka, glikemije, promjena raspoloženja i izgleda (Cushingoidnih promjena). U procjeni nuspojava kortikosteroida treba voditi računa da bolesnici i hematolozi različito doživljavaju i procjenjuju pojavnosti, težinu i prihvatljivost nuspojava, pri čemu većina poznatih i čestih nuspojava kortikosteroida biva rijde evidentirana ili adekvatno stupnjevana od samih hematologa.<sup>18-19</sup> Permisivnost prema nuspojavama kortikosteroida u bolesnika s ITP nije opravdana s obzirom na potencijalno kurativne ili vrlo učinkovite terapijske opcije druge terapijske linije. Procjena terapijskog uspjeha prikazana je u Tablici 1.

**Tablica 1. Procjena terapijskog odgovora.<sup>6</sup>**

Procjena terapijskog odgovora	
<b>Kompletan odgovor na liječenje:</b>	trombociti $\geq 100 \times 10^9/L$ izmjereni u dva navrata s razmakom od najmanje 7 dana, uz povlačenje svih simptoma krvarenja.
<b>Odgovor na liječenje:</b>	trombociti $\geq 30 \times 10^9/L$ , uz više nego dvostruki porast broja trombocita u odnosu na inicijalne vrijednosti, izmjereno u dva navrata s razmakom od najmanje 7 dana, uz povlačenje svih simptoma krvarenja. U recentijim ispitivanjima odgovorom se smatra postignuta razina trombocita $\geq 50 \times 10^9/L$ .
<b>Izostanak odgovora na liječenje:</b>	trombociti $< 30 \times 10^9/L$ , ili porast broja trombocita koji ne dostiže udvostručenje broja u odnosu na inicijalne vrijednosti, ili pak i dalje prisutni simptomi krvarenja. Broj trombocita mora biti izmjerен u dva navrata, s razmakom od jedan dan ili više.
<b>Gubitak komplettnog odgovora:</b>	pad broja trombocita na $< 100 \times 10^9/L$ nakon postignutog komplettnog odgovora, izmjeren u dva navrata s razmakom od jedan dan ili više, i/ili pojava krvarenja.
<b>Gubitak odgovora:</b>	pad broja trombocita na $< 30 \times 10^9/L$ nakon postignutog odgovora, ili manji porast broja trombocita od udvostručenja inicijalnih vrijednosti, i/ili pojava krvarenja. Broj trombocita mora biti izmjeren u dva navrata s razmakom od jedan dan ili više.
<b>Trajanje odgovora:</b>	vrijeme proteklo od postizanja potpunog odgovora ili odgovora do gubitka odgovora.

Ukoliko se razina trombocita normalizirala ili podigla na sigurnu razinu te je po završenom liječenju prvom terapijskom linijom bolesnik bez simptoma krvarenja, nastavlja se praćenje bolesnika i razine trombocita. Ukoliko se nastave ili ponovno jave simptomi bolesti te se ne postigne trajni odgovor na prvu terapijsku liniju, treba ponovno procijeniti ozbiljnost krvarenja, mjesto pojave i trajanje krvarenja. Također treba razmotriti postojeći promjena u anamnezi ili fizikalnom pregledu te ostaloj obradi koja bi upućivala na drugu dijagnozu, sekundarnu trombocitopeniju, ili potrebu daljnje dijagnostičke obrade.

**Kortikosteroidna ovisnost** definira se kao potreba dalnjeg ili intermitentnog liječenja kortikosteroidima kako bi se održala razina trombocita iznad  $30 \times 10^9/L$  i/ili izbjeglo krvarenje.<sup>6</sup>

Gubitak terapijskog odgovora, kortikosteroidna ovisnost te neodrživost kortikosteroidne terapije u duljem periodu liječenja očekuju se u velikog dijela bolesnika, unatoč visokoj stopi kratkoročnih odgovora u prvoj terapijskoj liniji. U prolongiranom tijeku liječenja, prilikom redukcije doze ili prekida liječenja u bolesnika koji prethodno postignu odgovor, remisije su održane u svega 10-30% bolesnika. Kod 39% bolesnika liječenje kortikosteroidima se mora prekinuti ili doza reducirati zbog nuspojava.<sup>1,16,18</sup>

#### *Individualizacija pristupa starijim bolesnicima s ITP*

Kod starijih bolesnika treba voditi računa o komorbiditetima, sigurnosti liječenja, suradljivosti, jednostavnosti i praktičnim aspektima liječenja ITP. Uz procjenu relativnih i apsolutnih kontraindikacija za pojedine terapijske opcije, individualni plan liječenja starijeg bolesnika s ITP treba uključiti edukaciju, smanjenje rizika od krvarenja u središnji živčani sustav (riječ je o riziku koji je inače povišen u starijoj populaciji), procjenu tromboembolijskih rizika (također povišeni rizik u starijih), liječenje kardiovaskularnih i/ili metaboličkih komorbiditeta. Izrazito je kompleksno i izazovno liječenje bolesnika s malignom bolešću, dijabetesom i kardiovaskularnim bolestima koje mogu dovesti u pitanje liječenje kortikosteroidima ili drugim imunosupresivima. Dio starijih bolesnika je znatno manje mobilan. Sklonost bolesnika i mogućnost periodičnih transporta bolesnika do bolnice ili lokalne zdravstvene ustanove znatno utječu na praćenje bolesti i provođenje terapijskog plana. Ključno je osigurati da bolesnik dobro razumije i lako prati terapijski plan kroz edukaciju bolesnika i njegove obitelji.

### *Individualizacija pristupa mlađim bolesnicima s ITP*

Mlađi i radno aktivni bolesnici također zahtijevaju prilagođeni terapijski pristup s jasno definiranim višestrukim ciljevima liječenja. Oni su najčešće orijentirani primarnom cilju izliječenja i nerijetko su već pri prvoj prezentaciji znatno drukčije suočeni s tegobama bolesti u odnosu na starije bolesnike. Mlađi bolesnici često kao imperative postavljaju održavanje profesionalnog života i pune radne sposobnosti, zadržavanje psihičkog i estetskog statusa, očuvanje socijalnih i obiteljskih interakcija, zasnavanje obitelji ili neometano ostvarivanje spolnog života, igre s djecom, bavljenje sportom i hobijima. Profesionalno i fizički aktivnim radnim ljudima, kao i sportašima, ITP nameće specifične profesionalne i socioekonomski probleme. Bolesnici visoko valoriziraju sposobnost za rad i neovisnost od dugotrajnijeg bolničkog liječenja te se vrlo teško mogu pomiriti sa suboptimalnim terapijskim postignućem koje ih privremeno ili trajno može udaljiti od životnih ciljeva. Iako su orijentirani na potencijalno kurativne terapijske opcije i žeze minimalizirati bolničko liječenje, mlađe bolesnike treba adekvatno informirati o omjeru očekivanih koristi u odnosu na potencijalne rizike tijekom liječenja ITP, kao i individualnoj prognozi same bolesti.

### **Terapijske opcije druge linije ITP-a**

Zbog prognostičke nesigurnosti, nastavak liječenja splenektomijom ili farmakoterapijom druge linije predstavlja složeni odabir. Kortikosteroidi nisu okosnica dalnjeg liječenja ITP jer se smanjuje podnošljivost liječenja i suradljivost bolesnika pri prolongiranoj primjeni kortikosteroida, uz porast rizika imunosupresije, dijabetesa, akutnog ili kroničnog zatajenja bubrega, katarakte, kardiovaskularnih bolesti opisanih u populaciji bolesnika s perzistentnom i kroničnom ITP unatoč praksi korištenja niskih i intermitentnih doza.<sup>16,18-19</sup>

**Splenektomija** je povijesno etablirani „zlatni standard“ liječenja ITP i potencijalno kurativna intervencija. Predstavlja najizvjesniju vjerojatnost postizanja relativno brzog odgovora (unutar 1-24 dana) kod više od 80% bolesnika te, daleko važnije, postizanja dugotrajne remisije bez potrebe za dalnjim liječenjem u otprilike 2/3 splenektomiranih bolesnika, neovisno o uspjehu prve terapijske linije.<sup>20-21</sup> Stoga je splenektomija preporučena međunarodnim smjernicama uz razinu dokaza 1B za bolesnike koji nisu odgovorili na kortikosteroide ( $\pm$ IVIg). Zbog sigurnosti zahvata i manje smrtnosti, laparoskopska

splenektomija je metoda izbora.<sup>21-22</sup> Splenektomiji prethodi obvezno cijepljenje protiv pneumokoka i Haemophilusa influenzae, a za neke skupine bolesnika i protiv meningokoka, najmanje dva tjedna prije zahvata.<sup>22</sup> Splenektomirani bolesnici bez znakova krvarenja i s kontinuirano održanim brojem trombocita iznad  $30 \times 10^9/L$  ne zahtijevaju daljnje liječenje.<sup>1,6</sup> Splenektomija se u odraslih u pravilu odgađa tijekom prve godine od postavljanja dijagnoze (faza akutne i perzistentne ITP), a najmanje 6 mjeseci od dijagnoze, s obzirom na moguću odgođenu spontanu remisiju bolesti, ili zadovoljavajući terapijski rezultat prve ili druge farmakoterapijske linije.<sup>16</sup> Činjenica da se uklanja zdrav organ s brojnim hematološkim i imunološkim funkcijama utječe na terapijsku odluku te se zahvat obično indicira kada je malo vjerojatna remisija bolesti (spontana ili terapijska). Splenektomijom se onemogućuje sekvestracija i destrukcija opsoniziranih trombocita u slezeni, no upitno je u kojoj mjeri se splenektomijom može utjecati na druge patofiziološke mehanizme u ITP (irregularne interakcije T- i B- limfocita, stimulacija poliklonalne B-stanične proliferacije i stvaranje antitrombocitnih antitijela, daljnja hepatična sekvestracija i destrukcija trombocita, smanjena produkcija trombocita). Osobiti problem pri savjetovanju bolesnika i indiciranju splenektomije predstavlja i nemogućnost prognoziranja uspjeha splenektomije kod individualnog bolesnika. Na prijedlog za splenektomiju i informirani pristanak odraslog bolesnika utječu:

- dob bolesnika - niža stopa održanih remisija u skupini starijih splenektomiranih bolesnika u odnosu na mlađe;<sup>23</sup>
- komorbiditeti, osobito kardiovaskularni kao relativna kontraindikacija za zahvat te postoperativna mogućnost pogoršanja komorbiditeta;
- nemogućnost postizanja sigurnog broja trombocita za splenektomiju;
- postoperativne komplikacije (uključujući krvarenja, subfrenički apses, infekciju rane, sepsu, trombozu i smrt) u 12,9% bolesnika nakon otvorene, odnosno 9,6% bolesnika nakon laparoskopske splenektomije;
- tromboembolijske komplikacije splenektomije najčešće su u grupi komorbiditetnih bolesnika (osobito bolesnika s aterosklerozom i dijabetesom);<sup>24</sup>
- u trudnoći se ne preporuča splenektomija u bolesnice s ITP;
- smrtnost splenektomije koja kod otvorenog

- zahvata iznosi 1% bolesnika, no u starijoj dobroj skupini je veća i može nadmašiti rizik smrtnosti od ITP; kod laparoskopske splenektomije smrtnost u ukupnoj populaciji splenektomiranih iznosi 0,2%;<sup>21</sup>
- rizik od infekcija ostaje i nakon obveznog preoperativnog cijepljenja protiv pneumokoka, meningokoka i Haemophilusa influenzae (kasnija uspješnost zaštite, izloženost infekcijama tijekom putovanja, profesionalna izloženost u medicinskog osoblja, djelatnika u prosvjeti i u javnim službama, te obveza procjene ozbiljnosti svake infekcije, odnosno febriliteta iznad 38°C).

U svijetu se bilježi kontinuiran trend sve rjeđe primjene splenektomije u liječenju ITP. Dostupnost relativno učinkovitih farmakoterapijskih opcija u drugoj liniji utječe na mogućnost izbora bolesnika i liječnika suočenog s operativnim zahvatom u relativno nepovoljnim i rizičnim uvjetima koje implicira trombocitopenija, eventualni drugi komorbiditeti te neizvjesnost učinka na liječenje ITP.

**Agonisti trombopoetinskih (TPO) receptora (eltrombopag i romiplostim)** učinkoviti su lijekovi u liječenju ITP koji se uglavnom koriste kao trajna terapija u drugoj ili kasnijoj liniji liječenja ITP.<sup>1,6</sup> Iako predstavljaju relativnu novost u liječenju hrvatskih bolesnika s ITP,<sup>25-27</sup> mehanizam djelovanja, sigurnosni profil te klinički rezultati ove terapijske skupine dobro su dokumentirani u kliničkim ispitivanjima, uključujući i dugoročna iskustva tijekom više od 5 godina praćenja.

**Eltrombopag** je peroralni, nepeptidni agonist TPO receptora. Primjenjuje se jednom dnevno, u početnoj dozi od 50 mg *per os*, neovisno o tjelesnoj masi bolesnika. Nakon prvih dva tjedna ili naknadno tijekom liječenja, sukladno terapijskom odgovoru dnevna doza se može povisiti na 75 mg ili smanjiti na 25 mg *per os* na dan.<sup>28-29</sup>

**Romiplostim** je peptidni agonist TPO receptora i primjenjuje se supkutanom injekcijom u tjednoj dozi između 1 i 10 mcg/kg tjelesne mase. Početna doza iznosi 1 mcg/kg tjelesne mase tjedno, uz kasnije titriranje prema postignutom odgovoru, dinamici i varijaciji razine trombocita.<sup>30-32</sup>

Rezultati registracijskih kliničkih ispitivanja faze III te otvorenih dugoročnih kliničkih praćenja eltrombopaga i romiplostima ukazuju na porast razine trombocita iznad  $50 \times 10^9/L$  u oko 80% bolesnika, dok dugotrajne odgovore uz liječenje postiže više od 60% bolesnika. Primjenom ovih lijekova stopa krvarjenja smanji se na polovicu, a veliki udio bolesni-

ka može smanjiti ili prekinuti istovremeno primanje druge terapije za ITP kao i primanje hitne interventne terapije za ITP.<sup>28-32</sup> Eltrombopag i romiplostim su dvije različite molekule, s različitim veznim mjestima na receptoru za trombopoetin, stoga se u slučaju terapijskog neuspjeha jednim od tih lijekova može pokušati liječiti drugim.<sup>33-35</sup> Smanjenje ili prekid kortikosteroidne terapije tijekom liječenja s agonistima TPO receptora također su izuzetno bitni terapijski rezultati u sigurnosnom smislu i u postizanju bolje kvalitete života bolesnika.<sup>1</sup> Prestanak liječenja agonistima TPO receptora najčešće rezultira povratkom trombocita na inicijalne bazalne vrijednosti ili s prolazno čak još izraženijom trombocitopenijom u otprilike 10% bolesnika. Noviji podaci, međutim, pokazuju da otprilike trećina bolesnika s postignutim i održanim kompletnim odgovorom na agoniste TPO receptora mogu održati odgovor dugoročno i nakon prekida liječenja, neovisno o broju prethodnih terapijskih linija.<sup>36-38</sup> Opisana je uporaba agonista TPO receptora kao terapijskog premoštanja do planirane splenektomije.<sup>39</sup> Sigurnosni profil agonista TPO receptora je povoljan te je većina nuspojava uglavnom blaga.<sup>28-32</sup> Inicijalno je postojala bojazan za rizik nastanka tromboza uz agoniste TPO receptora jer je poznato da općenito ITP predstavlja protrombotsko stanje neovisno o broju trombocita.<sup>40</sup> Međutim, za sada u kliničkim ispitivanjima nije utvrđena statistički značajna razlika u pojavnosti VTE između ITP skupina liječenih s agonistima TPO receptora u odnosu na placebo/standardnu terapiju.<sup>28-32</sup> S obzirom na povećano odlaganje retikulinskih vlakana u koštanoj srži ITP bolesnika te na funkciju TPO receptora, u tijeku su prospektivna ispitivanja odlaganja retikulinskih vlakana u koštanoj srži tijekom liječenja s agonistima TPO receptora, a dosadašnji rezultati višegodišnjeg praćenja ne ukazuju na rizik od razvoja klinički značajne fibroze koštane srži uz primanje TPO agonista.<sup>28-32</sup> Moguć je prolazan i blagi porast odlaganja retikulinskih vlakana u koštanoj srži za jedan stupanj, koji može biti reverzibilan uz nastavak liječenja agonistima TPO receptora.<sup>41</sup> Također, klinička iskustva u praćenju bolesnika liječenih agonistima TPO receptora do pet godina ne ukazuju na povećani rizik hematoloških maligniteta uslijed djelovanja na TPO receptor.<sup>28-32</sup>

### Rituksimab u drugoj ili kasnijoj terapijskoj liniji

S obzirom na nedostatak randomiziranih kliničkih ispitivanja rituksimaba, taj lijek nije registriran za liječenje bolesnika s ITP te nema odobrene stan-

dardne doze za liječenje ove bolesti. Međunarodne smjernice ne podržavaju primjenu rituksimaba u prvoj liniji liječenja bolesnika s ITP.<sup>1,6</sup> Međutim, međunarodne smjernice ostavljaju mogućnost primjene rituksimaba u drugoj ili kasnijoj terapijskoj liniji. Iskustva s rituksimabom prikazuju meta-analize niza manjih serija liječenih bolesnika od kojih nijedna referenca nije predstavljala kontrolirano ispitivanje, dok dio studija ne zadovoljava uvjete kvalitete ispitivanja. Opisane su stope odgovora u otprilike 60% bolesnika uz medijan trajanja odgovora oko 10 mjeseci, no odgovore na razini 5 godina održi tek 21% bolesnika. Zabilježene su značajne nuspojave i toksičnost te incidencija smrtnih ishoda u 2,9% bolesnika.<sup>42-44</sup> Kontraindikacije i poznata ograničenja primjene rituksimaba (rizik aktivacije hepatitisa B i ozbiljnih infekcija, smrtnosti, incidencija nuspojava trećeg i četvrtog stupnja te otežano pripremanje splenektomije kod bolesnika s B-staničnom deplecijom) donekle otežavaju izbor rituksimaba u liječenju bolesnika s ITP.

### Ostali lijekovi u drugoj i kasnijim terapijskim linijama

U praksi se nerijetko kortiste i drugi imunosupresivi u drugoj i kasnijim linijama terapije, čija je uloga, između ostalog, snižavanje doze i prekid primanja kortikosteroidne terapije (posebno azatioprin te mikofenolat mofetil, rjeđe ciklosporin, ciklofosfamid ili vinka alkaloidi u refraktornim slučajevima ITP).<sup>45-49</sup>

### Sumarno su preporuke liječenja odraslih bolesnika s ITP sljedeće:

**a) Liječenje treba započeti** u odraslog bolesnika s ITP koji ima znakove krvarenja i broj trombocita  $\leq 50 \times 10^9 / L$ , te u bolesnika s razinom trombocita  $\leq 30 \times 10^9 / L$  s ili bez krvarenja (zbog značajnog rizika životno ugrožavajućih krvarenja). Uvijek postoji mogućnost modifikacije odluke o početku liječenja sukladno životnom stilu i čimbenicima rizika ozljeda i krvarenja kod individualnog pacijenta.

**b) 1. linija terapije: kortikosteroidi s ili bez IVIg (1B)**

**c) 2. linija terapije:**

- **Splenektomija:** idealno nakon najmanje 6-12 mjeseci od dijagnoze ITP, zbog mogućnosti spontane ili terapijske trajne remisije bolesti (1B).
- **Agonisti trombopoetinskih receptora (eltrombopag, romiprostim):** u bolesnika koji nisu imali odgovor ili su izgubili odgovor na

prvu liniju terapije; kod razvoja kortikosteroidne ovisnosti; u bolesnika s kontraindikacijom za splenektomiju (1B).

- **Rituksimab:** u odabranih bolesnika, ukoliko ne odgovore na prvu liniju terapije (2C).
  - **Drugi imunosupresivi:** azatioprin, mikofenolat mofetil, rjeđe ciklosporin, ciklofosfamid, vinka alkaloidi (2C).
- d) 3. linija terapije:**
- **Agonisti trombopoetinskih receptora (eltrombopag, romiprostim)** u bolesnika s refraktornom bolešću/relapsom nakon splenektomije (1B).
  - **Rituksimab** u odabranih bolesnika, ukoliko ne odgovore na prethodno navedene terapijske opcije (2C).
  - **Drugi imunosupresivi i druge terapijske opcije** za koje postoji terapijska indikacija u kasnijem tijeku liječenja, unatoč ograničenoj razini kliničkih dokaza (2D).

### Zaključak

Mnoge europske države su razvile nacionalne smjernice za dijagnostiku i liječenje ITP-a (primjerice Njemačka, Norveška, Španjolska, Austrija, Švedska i Francuska) kako bi se postajeće znanje o toj rijetkoj bolesti prilagodilo praksi i financijskim mogućnostima pojedine zemlje.<sup>50</sup> Naravno, u realnom životu postoji razlika između objavljenih smjernica i dijagnostike i liječenja koje se doista provodi u praksi. Na primjer, jedna španjolska studija je pokazala da se unatoč objavljenim smjernicama u kliničkom radu analiza koštane srži pri dijagnozi ITP-a provodila u čak 50,5% bolesnika iako to nije pretraga koja se rutinski preporuča u niti jednoj smjernici dijagnostike ITP, te da su nepotrebno često koristili IVIg u liječenju ITP bez ikakvih krvarećih manifestacija u čak 54,8% bolesnika.<sup>50</sup>

Stoga su i ove Hrvatske smjernice okvir za pomoći kliničaru u potrebnoj dijagnostici i odabiru naj-optimalnijeg liječenja pojedinog bolesnika s ITP. Još jednom je nužno naglasiti da je potreban individualizirani pristup liječenju, prilagođen dobi, životnom stilu, komorbiditetima i očekivanjima pojedinog bolesnika.

## Literatura

1. Provan D, Stasi R, Newland AC, i sur. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood*. 2010;115:168-186.
2. Frederiksen H, Schmidt K. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood*. 1999;94:909-913.
3. Segal JB, Powe NR. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2377-83.
4. Neylon AJ, Saunders PW, Howard MR, Proctor SJ, Taylor PR; Northern Region Haematology Group. Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients. *Br J Haematol*. 2003;122(6):966-74.
5. Fogarty PF, Segal JB. The epidemiology of immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(5):515-9.
6. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L Jr, Crowther MA; American Society of Hematology. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*. 2011;117:4190-4207.
7. Atkins D, Briss PA, Eccles M, i sur. Systems for grading the quality of evidence and the strength of recommendations II: pilot study of a new system. *BMC Health Serv Res*. 2005;5(1):25.
8. Palau J, Jarque I, Sanz MA. Long-term management of chronic immune thrombocytopenic purpura in adults. *Int J Gen Med*. 2010;3:305-11.
9. Stasi R, Stipa E, Masi M, i sur. Long-term observation of 208 adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med*. 1995;98(5):436-442.
10. Bizzoni L, Mazzucconi MG, Gentile M, i sur. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) in the elderly: clinical course in 178 patients. *Eur J Haematol*. 2006;76(3):210-16.
11. Alpdogan O, Budak-Alpdogan T, Ratip S, i sur. Efficacy of high-dose methylprednisolone as a first-line therapy in adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1998;103(4):1061-3.
12. Mazzucconi MG, Fazi P, Bernasconi S, i sur. Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMAexperience. *Blood*. 2007;109(4):1401-7.
13. Godeau B, Chevret S, Varet B, i sur. Intravenous immunoglobulin or high-dose methylprednisolone, with or without oral prednisone, for adults with untreated severe autoimmune thrombocytopenic purpura: a randomised, multicentre trial. *Lancet*. 2002;359(9300):23-9.
14. Borst F, Keuning JJ, van Hulsteijn H, Sinnige H, Vreugdenhil G. High-dose dexamethasone as a first- and second-line treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults. *Ann Hematol*. 2004;83(12):764-8.
15. Cheng Y, Wong RS, Soo YO, i sur. Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high-dose dexamethasone. *N Engl J Med*. 2003;349(9):831-6.
16. Rodeghiero F, Besalduch J, Michel M. Treatment practices in adults with chronic immune thrombocytopenia - a European perspective. *Eur J Haematology*. 2009;84:160-8.
17. Godeau B, Caulier MT, Decuyper L, Rose C, Schaeffer A, Bierling P. Intravenous immunoglobulin for adults with autoimmune thrombocytopenic purpura: results of a randomized trial comparing 0.5 and 1 g/kg b.w. *Br J Haematol*. 1999;107(4):716-9.
18. Guidry JA, George JN, Vesely SK, Kennison SM, Terrell DR. Corticosteroid side-effects and risk for bleeding in immune thrombocytopenic purpura: patient and hematologist perspectives. *Eur J Haematol*. 2009;83:175-82.
19. Enger C, Bennett D, Forssen U, Fogarty PF, McAfee AT. Comorbidities in patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia. *Int J Hematol*. 2010;92(2):289-95.
20. Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood*. 2004;104:2623-34.
21. Mikhael J, Northridge K, Lindquist K, Kessler C, Deuson R, Danese M. Short-term and long-term failure of laparoscopic splenectomy in adult immune thrombocytopenic purpura patients: a systematic review. *Am J Hematol*. 2009;84(11):743-8.
22. Davies JM, Barnes R, Milligan D; British Committee for Standards in Haematology. Working Party of the Haematology/Oncology Task Force. Update of guidelines for the prevention and treatment of infection in patients with an absent or dysfunctional spleen. *Clin Med*. 2002;2:440-3.
23. Fabris F, Tassan T, Ramon R, i sur. Age as the major predictive factor of long-term response to splenectomy in immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2001;112:637-40.
24. Boyle S, White RH, Brunson A, Wun T. Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*. 2013;121(23):4782-90.
25. Ostojić Kolonić S, Bogeljić Patekar M, Milunović V. Dijagnostički pristup i liječenje imune trombocitopenije u odrasloj dobi. *Acta Med Croat*. 2013;61:3-11.
26. Zupančić Šalek S, Pulanić D, Aurer I, Boban A, Vodanović M, Nemet D. Eltrombopag u liječenju kronične imunotrombocitopenije – iskustva KBC Zagreb. *Liječ Vjesn*. 2014;136(Supl 1):83.
27. Mitrović Z i sur. Cijena i učinkovitost kasnijih linija liječenja imunotrombocitopenije (ITP) tijekom protekle dvije godine. *Liječ Vjesn*. 2014;136(Supl 1):41.
28. Cheng G, Saleh MN, Marcher C, i sur. Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase III study. *Lancet*. 2011;377:393-402.
29. Saleh MN, Bussel JB, Cheng G, i sur. Safety and efficacy of eltrombopag for treatment of chronic immune thrombocytopenia: results of the long-term, open-label EXTEND study. *Blood*. 2013;121:537-45.
30. Khellaf M, Michel M, Quittet P, i sur. Romiplostim safety and efficacy for immune thrombocytopenia in clinical practice: 2-year results of 72 adults in a romiplostim compassionate-use program. *Blood*. 2011;118(16):4338-45.
31. Kuter DJ, Bussel JB, Newland A, i sur. Long-term treatment with romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenia: safety and efficacy. *Br J Haematol*. 2013;161:411-23.
32. Bussel JB, Kuter DJ, Pullarkat V. Safety and efficacy of long-term treatment with romiplostim in thrombocytopenic patients with chronic ITP. *Blood*. 2009;113:2161-71.
33. Aoki T, Harada Y, Matsubara E, i sur. Thrombopoietin receptor agonists in refractory immune thrombocytopenia: differential responses to eltrombopag and romiplostim: a case report and possible explanations. *J Clin Pharm Ther*. 2012;37:729-32.
34. Polverelli N, Palandri F, Iacobucci I, Catani L, Martinelli G, Vianelli N. Absence of bi-directional cross-resistance

- of thrombopoietin receptor agonists in chronic refractory immune thrombocytopenia: possible role of MPL polymorphisms. *Br J Haemat.* 2013;161:142–4.
35. D'Arena G, Guariglia R, Mansueto G, i sur. No cross-resistance after sequential use of romiplostim and eltrombopag in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2013;121:1240-2.
36. Ghadaki B, Nazi I, Kelton JG, Arnold DM. Sustained remissions of immune thrombocytopenia associated with the use of thrombopoietin receptor agonists. *Transfusion.* 2013;53(11):2807–12.
37. Mahévas M, Fain O, Ebbo M, i sur. The temporary use of thrombopoietin-receptor agonists may induce a prolonged remission in adult chronic immune thrombocytopenia. Results of a French observational study. *Br J Haemat.* 2014;165(6):865-9.
38. González-López TJ, Sánchez-González B, Pascual C, i sur. Sustained response after discontinuation of short-and medium-term treatment with eltrombopag in patients with immune thrombocytopenia. *Platelets.* 2015;26(1):83-6.
39. Uwagawa T, Misawa T, Furukawa K, i sur. Usage of Eltrombopag for Chronic Immune Thrombocytopenia as a Pretreatment for Splenectomy. *Acta Haematol.* 2013;129:45-7.
40. Nørgaard M. Thrombosis in patients with primary chronic immune thrombocytopenia. *Thromb Res.* 2012;130(Suppl 1):S74-5.
41. Boiocchi L, Orazi A, Ghanima W, Arabadjief M, Bussel JB, Geyer JT. Thrombopoietin receptor agonist therapy in primary immune thrombocytopenia is associated with bone marrow hypercellularity and mild reticulin fibrosis but not other stromal abnormalities. *Mod Pathol.* 2012;25:65-74.
42. Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, i sur. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med.* 2007;146(1):25-33.
43. Auger S, Duny Y, Rossi JF, Quittet P. Rituximab before splenectomy in adults with primary idiopathic thrombocytopenic purpura: a meta-analysis. *Br J Haematol.* 2012;158(3):386-98.
44. Patel VL, Mahévas M, Lee SY, i sur. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood.* 2012;119(25):5989-95.
45. Quiquandon I, Fenaux P, Caulier MT, Pagniez D, Huart JJ, Bauters F. Reevaluation of the role of azathioprine in the treatment of adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: a report on 53 cases. *Br J Haematol.* 1990;74(2):223-8.
46. Emilia G, Morselli M, Luppi M, i sur. Long-term salvage therapy with cyclosporin A in refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2002;99(4):1482-5.
47. Reiner A, Gernsheimer T, Slichter SJ. Pulse cyclophosphamide therapy for refractory autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1995;85(2):351-8.
48. Provan D, Moss AJ, Newland AC, Bussel JB. Efficacy of mycophenolate mofetil as single-agent therapy for refractory immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 2006;81(1):19-25.
49. Szczepanik AB, Sikorska A, Slomkowski M, Konopka L. The use of vinca alkaloids in preparation for splenectomy of corticosteroid refractory chronic immune thrombocytopenic purpura patients. *Int J Lab Hematol.* 2007;29(5):347-51.
50. Lozano ML, Revilla N, Gonzalez-Lopez TJ, i sur. Real-life management of primary immune thrombocytopenia (ITP) in adult patients and adherence to practice guidelines. *Ann Hematol.* 2016;95(7):1089-98.

## Utjecaj direktnih oralnih antikoagulanata na rezultate koagulacijskih pretraga

**Prof. dr. sc. Renata Zadro**

*Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb i Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
E-pošta: rzadro@mef.hr*

Direktni oralni antikoagulanti su brzo reagirajući, ciljno specifični antikoagulanti koji inhibiraju slobodne i vezane aktivirane serinske proteaze (trombin, FXa), što ovu vrstu antikoagulanata čini robusnijima od varfarina ili heparina. Ova nova klasa antikoagulanata spominje se u literaturi kao non-vitamin K ili novi oralni antikoagulanti (engl. *New Oral AntiCoagulants*, NOAC), ciljno specifični oralni antikoagulanti (engl. *Target Specific Oral AntiCoagulants*, TSOAC) ili direkti oralni antikoagulanti (engl. *Direct Oral AntiCoagulants*, DOAC). Međunarodno društvo za trombozu i hemostazu (engl. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*) preporučuje naziv DOAC (Barnes GD, Ageno W, Ansell J, Kaatz S. Recommendation on the nomenclature for oral anticoagulants. On behalf of the Control of Anticoagulation Subcommittee of SSC of the ISTH. J Thromb Haemost 2015;13:2132-3).

Za razliku od oralnih antikoagulanata, svaki DOAC ima predvidivi farmakokinetički i farmakodinamički odgovor pa nema potrebe za laboratorijskim praćenjem. Ipak, postoje hitne situacije, ali i okolnosti koje nisu hitne, a koje zahtijevaju određivanje prisutnosti odnosno koncentracije DOAC-a (Kitchen S i sur. Measurement of non-coumarin anticoagulants and their effects on tests of haemostasis: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology. Brit J Haematol 2014;166:830-41):

- spontano ili traumatsko krvarenje
- prepostavljeni predoziranje
- interakcija drugih lijekova
- praćenje djelotvornosti terapije u bolesnika s novim trombotičnim događajem
- u bolesnika koji trebaju elektivni kirurški zahvat, a lijek je još uvijek prisutan
- u bolesnika koji primaju neuraksijalnu anesteziju zbog elektivnoga ili hitnog (kirurškog) zahvata
- hitni kirurški zahvat
- bubrežna insuficijencija
- prelazak na drugi antikoagulant
- prekomjerna tjelesna masa
- suradljivost u uzimanju lijeka

- prethodna kirurgija probavnog sustava koja može utjecati na apsorpciju lijeka
- određivanje koncentracije DOAC-a prije sljedeće doze (engl. *trough level*) zbog mogućeg nakupljanja lijeka kod starijih osoba.

Odabir optimalne laboratorijske metode ovisi o tome želi li se dokazati prisutnost/odsutnost ili izmjeriti koncentracija DOAC-a (Tablica 1.). Koncentracija DOAC-a može se pouzdano odrediti uporabom različitih laboratorijskih metoda. Referentna metoda („zlatni standard“) je masena spektrometrija (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) koja pokazuje dobru točnost i preciznost u širokome koncentracijskom području uz uvjet kalibracije antikoagulantom čija se koncentracija želi izmjeriti. Nedostatak je što ova metoda nije dostupna u svakom laboratoriju.

**Tablica 1. Preporučene metode za dokazivanje prisutnosti ili mjerjenje koncentracije pojedinih DOAC-a.**

Vrsta direktnoga oralnog antikoagulanta	Pretraga za dokazivanje prisutnosti lijeka	Pretraga za određivanje koncentracije lijeka
<b>Dabigatran</b>	Trombinsko vrijeme (TV)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• razrijedeno trombinsko vrijeme (dTV)</li> <li>• anti-IIa kromogena metoda (C-FIIa)</li> <li>• ekarinsko vrijeme zgrušavanja (ECT)</li> <li>• kromogena ekarinska metoda (ECA)</li> </ul>
<b>Rivaroxaban/ Apixaban/ Edoxaban</b>	Rutinska anti-Xa metoda	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anti-Xa kromogena metoda sa specifičnim kalibratorima</li> </ul>

Važno je naglasiti da rutinske globalne koagulacijske pretrage (PV, APTV) imaju ograničenu uporabu za određivanje prisutnosti DOAC-a zbog

velike varijabilnosti u sastavu pojedinih reagensa. Nadalje, rezultat pretrage trombinsko vrijeme (TV) samo isključuje prisutnost dabigatrana, a rutinska anti-Xa metoda kojom se laboratorij koristi za određivanje koncentracije heparina isključuje prisutnost rivaroxabana/apixabana/edoxabana. Stoga su izdane preporuke za metode probiranja na prisutnost DOACs-a (Gosselin RC, i sur. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. Thromb Haemost 2018 Feb 12. doi: 10.1055/s-0038-1627480. [Epub ahead of print]):

- PV i/ili APTV nisu pouzdane pretrage za dokazivanje prisutnosti terapijskih koncentracija svih DOAC-a
- PV i APTV nisu osjetljivi na terapijske razine apixabana
- PV i APTV ne smiju se rabiti za kvantifikaciju DOAC-a
- u bolesnika s poznatom terapijom DOAC-a, produženo PV ili APTV smatraju se sekundarnim utjecajem lijeka dok se ne dokaže suprotno, a u hitnim ili po život ugroženim situacijama potrebno je kvantificirati DOAC-e kao pomoć u skrbi za bolesnika
- trombinsko vrijeme unutar referentnog intervala isključuje prisutnost znatnije koncentracije dabigatrana
- dosad nema jasnih podataka za uporabu tromboelastografije ili rotacijske tromboelastografije u otkrivanju aktivnosti DOAC-a.
- nespecifične *Point-of-Care* metode nemaju dovoljnu osjetljivost u otkrivanju prisutnosti DOAC-a.
- pretrage probiranja u urinu mogu dati brzu procjenu (kvalitativnu ili polukvantitativnu) nedavnog izlaganja DOAC-ima, ali ne odražavaju prisutnost ili koncentraciju cirkulirajućeg lijeka.

Gosselin i sur. su u navedenom dokumentu ICSH-a dali dodatne preporuke:

- vrijeme prikupljanja uzorka prije sljedeće doze (engl. *trough level*)
- izdavanje rezultata koncentracije DOAC-a u ng/mL uz navedeni objavljeni raspon rezultata za najnižu koncentraciju prije sljedeće doze (engl. *trough concentration*).

Uz utjecaj na protrombinsko vrijeme i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme kao globalne koagulacijske pretrage, DOAC-i utječu na modifikacije PV-a i APTV-a (određivanje aktivnosti faktora zgrušavanja, inhibitora, koagulometrijske metode za određivanje aktivnosti proteina C i proteina S) te drugih koagulometrijskih (razrijeđeno Russell-viper-venomsko vrijeme) i kromogenih (aktivnost antitrombina) metoda. DOAC-i ne interferiraju s rezultatima molekularnih i enzimimunokemijskih metoda.

Interferencija direktnih inhibitora trombina (dabigatran) i anti-Xa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban) s rezultatima koagulacijskih pretraga prikazana je u Tablicama 2-4.

**Tablica 2. Utjecaj DOAC-a na rezultate globalnih pretraga**

Pretraga	DABIGATRAN	Anti-Xa DOAC
<b>PV</b> test miješanja	↑/N nepotpuna korekcija	↑↑/N nepotpuna korekcija
<b>APTV</b> test miješanja	↑↑/↑ nepotpuna korekcija	↑/N nepotpuna korekcija
<b>TV</b>	↑↑/↑	/
<b>Fibrinogen</b>	potencijalno lažno povišen derivirani fibrinogen	/

↑ - produljeno; N – unutar referentnog intervala; / - nema utjecaja

**Tablica 3. Utjecaj DOAC-a na rezultate specijalnih pretraga**

pretraga	DABIGATRAN	Anti-Xa DOAC
<b>Aktivnost FII, FV, FVII, FX</b>	lažno snižena	lažno snižena
<b>Aktivnost FVIII, FIX, XI, FXII</b>	lažno snižena	lažno snižena
<b>Inhibitori na faktore zgrušavanja</b>	lažno pozitivni	lažno pozitivni
<b>Aktivnost FVIII, FIX, XI, FXII – kromogena metoda</b>	/	lažno snižena

/ - nema utjecaja

**Tablica 4. Utjecaj DOACs-a na rezultate pretraga za stečenu i nasljednu trombofiliju**

Pretraga/ metodologija	DABIGATRAN	Anti-Xa DOAC
<b>Rezistencija na aktivirani protein C</b>	lažno negativna	lažno negativna
<b>Antitrombin - supstrat trombin</b>	lažno povišen /	lažno povišen
<b>- supstrat FXa</b>	/	
<b>Protein C</b>		
<b>- koagulometrijska</b>	lažno povišen /	lažno povišen /
<b>- kromogena</b>		
<b>Protein S aktivnost</b>		
<b>- koagulometrijska</b>	lažno povišen	lažno povišen
<b>Slobodni protein S:Ag</b>	/	/
<b>Lupus antokoagulant</b>	lažno pozitivan	lažno pozitivan

/ - nema utjecaja

Poznavanje utjecaja DOAC-a na rezultate koagulacijskih pretraga ključno je kako bi se izbjegla kriva interpretacija nalaza, što može dovesti do postavljanja krive dijagnoze i nepotrebnih terapijskih postupaka. Stoga je uvijek na zahtjevu za laboratorijske pretrage potrebno navesti podatak o vrsti antikoagulacijske terapije.

## Stariji bolesnici s agresivnim limfomom – je li dob najvažniji parametar?

Dr.sc. Zdravko Mitrović, dr. med.

Zavod za hematologiju  
KB Dubrava,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
E-pošta: zdravko.mitrovic@mef.hr



### Biti star ili stariji?

„Stariji“ je doslovni engleski prijevod riječi „elderly“ i zapravo nije gramatički korektan, jer je riječ o komparativu pridjeva „star“ koji se primjenjuje u bilo kojoj životnoj dobi kada se uspoređuju osobe s različitim datumom rođenja. S druge strane, „stariji“ zapravo predstavlja eufemizam – osoba nije „stara“ nego je obično malo „starija“, što nekako zvuči ljepše. Što god mislili o tome, takav naziv se uvriježio i u medicinskoj literaturi.

### Dobna granica

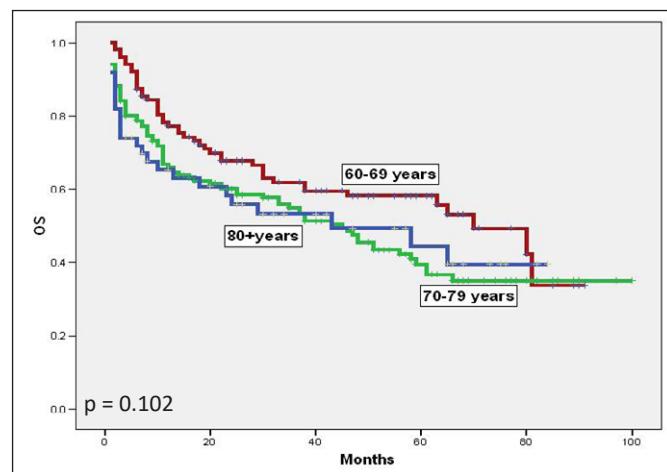
Dobna granica kojom se definira starost (i umirovljenje) vrlo je čest predmet rasprave u našem svakodnevnom životu, a vrlo recentan primjer je odlazak u mirovinu poznatog liječnika (1). Vrijeme kada čovjek po kriterijima mirovinskog osiguranja u Hrvatskoj prestaje biti radno sposoban se otprilike poklapa s medicinskim poimanjem starijeg bolesnika. To je u ovom trenutku otprilike dob između 65. i 70. godine, premda je to vrlo individualno i ponajprije ovisi o funkcionalnoj sposobnosti čovjeka. Ta granica je fluidna i ima tendenciju pomicanja kako životni vijek postaje sve dulji. Na primjer, u ne tako davnoj registracijskoj studiji za rituksimab u liječenju difuznog B-velikostaničnog limfoma (DLBCL) iz 2002. godine, stariji bolesnici su bili definirani kao oni između 60. i 80. godine života (2).

### Hrvatski rezultati

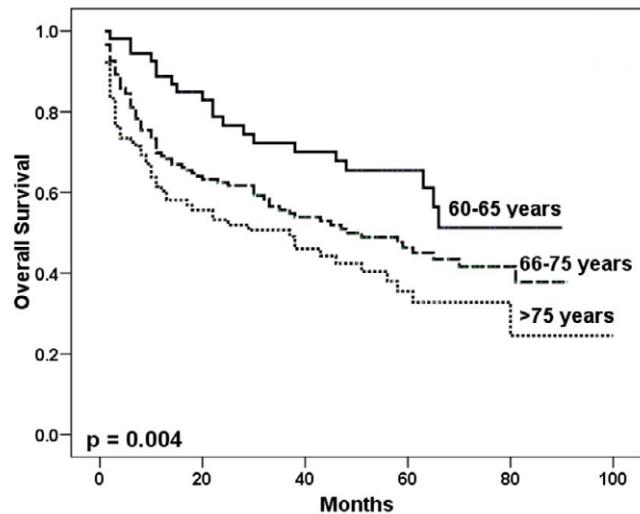
Vodeći se tom studijom, u Krohemovom istraživanju su analizirani rezultati liječenja limfoma starijih bolesnika s agresivnim limfoma u hrvatskim centrima, uvezši kao starije bolesnike sve one iznad 60 godina, uz granične vrijednosti između skupina na 70. i 80. godini (3). Međutim, takva podjela kod bolesnika s DLBCL-om nije bila statistički značajna (slika 1). Puno bolja diskriminacija se postigla kada su kao granične vrijednosti uzete 65. i 75. godina – tu je jasno vidljiv utjecaj dobi na ukupno preživ-

ljenje (slika 2). K tome, vidljivo je i da bolesnici do 65g. starosti imaju ishod jednak mlađim bolesnicima, s petogodišnjim preživljenjem oko 60%. Stoga, na osnovu vlastitih rezultata možemo zaključiti da naši bolesnici između 60 i 65 godina ne spadaju u skupinu starijih.

**Slika 1. Ukupno preživljenje starijih bolesnika s DLBCL-om iz Krohemove studije s graničnim vrijednostima na 70 i 80 godina**



**Slika 2. Ukupno preživljenje istih bolesnika s graničnim vrijednostima na 65 i 75 godina**



## Definicije starijih bolesnika u Americi i Europi

Američka literatura, točnije NCCN (National Comprehensive Cancer Network) smjernice, koje su vrlo popularne i u nas, definiraju bolesnike na sličan način (4). Mlađi stariji bolesnici (young old patients) su oni između 66. i 75. godine, stariji bolesnici (old patients) su između 76 i 85 godina, dok su najstariji stari bolesnici (oldest old patients) oni iznad 85 godina. S druge strane, europske hematološke i onkološke grupe (ELI, EHA-SWG; ESMO) definiraju starije bolesnike kao one iznad 70 godina (5,6). Međutim, u svim smjernicama naglašava se „besmislenost“ same kronološke dobi i naglašava potreba za multidimenzionalnom gerijatrijskom procjenom.

## Starenje populacije i pojavnost malignih bolesti/limfoma

Produljenje životnog vijeka i napredak medicine (ponajprije smanjenje smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti), dovelo je toga da zločudne bolesti postanu vodeći uzrok smrti u bolesnika između 60 i 79 godina u SAD-u (7). Također, više od 50% svih zločudnih bolesti i više od 70% svih smrti zbog zločudnih bolesti se pojavljuje kod bolesnika iznad 65 godina (8). Procjenjuje se da će 2030. godine 70% svih zločudnih tumora biti dijagnosticirano kod bolesnika iznad 65 godina (9). Kod limfoidnih tumora, također je zamjetan porast incidencije s rastućom dobi, ali se pojavnost pojedinih tipova limfoma uve-like razlikuje starenjem (10). Primjerice, pojavnost DLBCL najviše raste s dobi i to je uvjerljivo najčešći histološki tip limfoma kod ljudi iznad 70 godina s incidencijom blizu 50%. Zanimljivo, na drugom mjestu s incidencijom oko 20% je limfom marginalne zone koji je razmjerno rijedak u mlađoj populaciji. Sve veći broj starijih bolesnika s DLBCL predstavlja veliki terapijski izazov za hematologe, jer je toksičnost standardnih terapijskih protokola koji sadržavaju antracikline u toj dobi značajno viša.

## Što kažu gerijatri?

Starenje predstavlja progresivno smanjenje funkcije organa i organskih sustava, uz posljedično smanjenje funkcionalnih rezervi. Za razliku od hematologa kojemu je glavna dilema može li stariji pacijent s DLBCL-om primiti standardni R-CHOP, gerijatrica je glavno pitanje ima li pacijent odgovarajuće rezerve da bi se nosio sa stresom koje nosi kurativno liječenje. Isto tako, kriteriji odnosno testovi kojima se procjenjuje fragilnost/ranjivost pacijenta za gerijatra moraju biti precizni kako bi se predvidjeli neželjeni efekti liječenja, dok je hematologu važno da

budu što jednostavniji kako bi se uštedilo vrijeme. Prospektivna studija Tucci-a i suradnika pokazala je da gerijatri upotrebom sveobuhvatne gerijatrijske procjene (CGA – od engl. comprehensive geriatric assessment) mogu bolje od hematologa predvidjeti loš ishod bolesnika (11). Druga studija talijanskih autora pokazala je da izostavljanje antraciklina zbog visoke životne dobi kod „fit“ bolesnika (prema CGA) dovodi do lošijeg ishoda u odnosu na one koji su dobili antraciklin (12). S druge strane, bolesnici ocijenjeni kao „unfit“ prema CGA imaju nepovoljan ishod bez obzira koju terapiju primili.

## Sveobuhvatna gerijatrijska procjena (CGA) i G8 test

CGA je naziv za skupinu testova kojim se evaluiraju bolesnikova funkcionalnost i autonomija (instrumental daily activity – IADL, ADL), fiziološko stanje (komorbiditeti - npr. CIRS-G, uzimanje lijekova, nutritivni status), psihološko/kognitivna funkcija (MMS/MOCA, gerijatrijska depresijska skala - GDS), socioekonomsko stanje bolesnika (prihodi, prijevozni kapacitet, podrška obitelji). Ti testovi su ispitani u brojnim hematološkim/onkološkim studijama te je pokazano da imaju prognostičko značenje u pogledu ukupnog preživljjenja i očekivanog trajanja života, morbiditeta i kvalitete života, a mogu detektirati probleme povezane s liječenjem. To potencijalno omogućava ciljane intervencije kojima se može poboljšati kvaliteta života, ali i preživljjenje. Problem je što je potrebno dosta vremena za njihovo izvođenje – oko sat do sat i pol vremena, što nije prihvatljivo u rutinskoj kliničkoj praksi. Zbog toga se preporuča najprije učiniti test probira kojim će se detektirati rizična skupina bolesnika za koju je potreban CGA. Najpopularniji takav test je G8 (slika 3) koji se sastoji se od 8 pitanja/stavki i traje svega pet minuta. Bolesnici koji imaju nedovoljan broj bodova su rizični/ranjivi i treba im učiniti CGA prije odluke o liječenju.

## Zaključak

Dobnom granicom za starost smatra se dob od 65 ili 70 godina, međutim, kronološka dob je samo „vrh sante leda“. Veća ili manja ranjivost tih bolesnika utječe na izbor terapije i određuje prognozu. Kako bismo mogli razlikovati tko je od njih dovoljno „fit“ za kurativne terapijske protokole, potrebna je objektivna procjena njihovog stanja standardiziranim testovima. Iako CGA zahtijeva dosta vremena, svjetske smjernice za liječenje starijih bolesnika snažno

	<b>Items</b>	<b>Possible answers (score)</b>
<b>A</b>	Has food intake declined over the past 3 months due to loss of appetite, digestive problems, chewing or swallowing difficulties?	0 : severe decrease in food intake 1 : moderate decrease in food intake 2 : no decrease in food intake
		0 : weight loss > 3 kg 1 : does not know 2 : weight loss between 1 and 3 kgs 3 : no weight loss
		0 : bed or chair bound 1 : able to get out of bed/chair but does not go out 2 : goes out
<b>E</b>	Neuropsychological problems	0 : severe dementia or depression 1 : mild dementia or depression 2 : no psychological problems
		0 : BMI < 19 1 : BMI = 19 to BMI < 21 2 : BMI = 21 to BMI < 23 3 : BMI = 23 and > 23
		0 : yes 1 : no
		0 : not as good 0.5 : does not know 1 : as good 2 : better
<b>H</b>	Takes more than 3 medications per day	0 : >85 1 : 80-85 2 : <80
		<b>TOTAL SCORE</b>
		<b>0 - 17</b>

**Slika 3. G8 upitnik. Granična vrijednost je 14 bodova; ako je manje ili jednako – pacijent je ranjiv i ima lošije preživljjenje što ukazuje na potrebu za CGA (sveobuhvatna gerijatrijska procjena) prije odluke o terapiji.**

podupiru njegovu primjenu ne samo u kliničkim studijama, nego i u rutinskoj kliničkoj praksi. To posebno vrijedi za testove probira, kao što je G8, kojim se jednostavno i brzo mogu detektirati rizični bolesnici. Obzirom na rastući broj starijih bolesnika sa specifičnim problemima vezanim uz starenje, kao i sve raznolikije terapijske opcije na raspolaganju, liječenje tih bolesnika predstavlja sve veći izazov.

*Napomena:* ovaj članak je napisan na zamolbu glavnog urednika nakon održanog predavanja na temu liječenja agresivnih limfoma kod starijih bolesnika, 3. Roche hematološki forum, Zagreb, veljača 2018.

#### Literatura:

1. Jureško G. Odlazak Paladina s Rebra pokrenuo jednu od najužarenijih tema. Samo ove godine još 20 vrhunskih doktora iz KBC-a Zagreb ide u penziju. Jutarnji list. 28.03.2018.
2. Coiffier B, Lepage E, Briere J i sur. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002;346:235-42.
3. Mitrović Z, Dujmović D, Pejša V i sur. Outcome of older patients with B-large cell lymphoma (B-LCL) – an observational study of Krohem, the Croatian Cooperative Group for Hematological Diseases. Haematologica 2016;101(s1):702.
4. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Older Adult Oncology. Version 2.2017
5. Bron D, Auer I, André MPE i sur. Unmet needs in the scientific approach to older patients with lymphoma. European Lymphoma Institute (ELI) Group and the EHA SWG “Aging and Hematology”. Haematologica. 2017;102:972-5.
6. Buske C, Hutchings M, Ladetto M i sur. ESMO Consensus Conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for the clinical management of the elderly patient with malignant lymphoma. ESMO Lymphoma Consensus Conference Panel Members. Ann Oncol. 2017; doi: 10.1093/annonc/mdx413.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017;67:7-30.
8. Altekruse SF KC, Krapcho M, Neyman N i sur. Ur. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007: National Cancer Institute. <http://seer.cancer.gov/csr/1975-2007>.
9. Smith BD, Smith GL, Hurria A, Hortobagyi GN, Buchholz TA. Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. J Clin Oncol. 2009;27:2758-65.
10. Smith A, Crouch S, Lax S, et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004–2014: sub-type analyses from the UK’s Haematological Malignancy Research Network. British Journal of Cancer. 2015;112:1575-84.
11. Tucci A, Ferrari S, Bottelli C, Borlenghi E, Drera M, Rossi G. A comprehensive geriatric assessment is more effective than clinical judgment to identify elderly diffuse large cell lymphoma patients who benefit from aggressive therapy. Cancer. 2009;115:4547-53.
12. Marchesi F, Cenfra N, Altomare L i sur. A retrospective study on 73 elderly patients ( $\geq 75$  years) with aggressive B-cell non Hodgkin lymphoma: clinical significance of treatment intensity and comprehensive geriatric assessment. J Geriatr Oncol. 2013;4:242-8.

## Limfom plaštene zone

**Sabina Novaković Coha, dr.med, Goran Rinčić, dr.med**

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Sestre milosrdnice

E-pošta: snovakovic89@gmail.com

Limfom plaštene zone (MCL) predstavlja podvrstu non Hodgkinovog limfoma koja je karakteristična za stariju životnu dob ( $>50$  godina) s predominacijom muškog spola te čestom prezentacijom u uznapredovalom stadiju. 15-30% bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze ima simptomatologiju od strane gastrointestinalnog trakta. Radi se o rjeđem obliku non Hodgkinova limfoma (6-8% svih NHL) koji ima agresivni klinički tijek. Većina MCL-a ima kromosomsku translokaciju t(11;14)(q13;q32) koja zahvaća gen za teški lanac imunoglobulina na kromosomu 14 i BCL1 lokus na kromosomu 11. Posljedica ove translokacije je prekomjerna ekspresija proteina ciklin D1 koji ima ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa.<sup>1</sup> Postoji klasični oblik MCL agresivnog tijeka te indolentni oblik kod kojeg postoji mogućnost opserviranja bolesnika. Klasični oblik zahvaća limfne čvorove i ekstranodalna mesta, a u rijetkim slučajevima kod kojih nema prisutne t(11;14) i ciklina D1, često je moguće dokazati SOX11 ekspresiju. Leukemični, ne-nodalni oblik bolesti je podtip MCL-a koji često ima indolentni tijek, a vrlo često je SOX11 negativan te ciklin D1 pozitivan. Češće se javlja kod žena te obično zahvaća koštano srž i slezenu uz minimalno zahvaćanje limfnih čvorova te uz znatno niže vrijednosti Ki-67 indeksa. Kod bolesnika s takvim oblikom bolesti i niskim MIPI-jem moguća je samo opservacija.<sup>2</sup>

MIPI (MCL International Prognostic Index) služi za procjenu prognoze bolesti, a modificirani MIPI uz dob, LDH, leukocite, ECOG status uvrštava i Ki-67 indeks. Postoji i Pojednostavljeni MIPI koji podjednako govori o prognozi bolesti poput MIPIja, ali je jednostavniji za koristiti u svakodnevnoj kliničkoj praksi.<sup>3</sup>

Klasični MCL karakterizira slabiji terapijski odgovor na kemoterapiju baziranu na antraciklinima te je do uvođenja citarabina kao dio standardne terapije za MCL, OS za bolesnike iznosio 3-4 godine.<sup>4</sup> 2005. godine je prvi puta dokazan OS benefit za bolesnike  $<65$  godine ako se nakon kemoimunoterapije učini rana konsolidacija autolognom transplantacijom koštane srži (ATKS) u odnosu na održavanje interferonom te se pokazala učinkovitost induksijske tera-

pije temeljena na citarabinu.<sup>5</sup> Za bolesnike mlađe od 65 godina prema Trećem hrvatskom konsenzusu o dijagnostici i liječenju limfoma prva linija terapije je R-CHOP/R-DHAP kemoterapijski protokol nakon čega ako je postignuta najmanje PR, bez infiltracije koštane srži je indicirana ATKS.<sup>6,7</sup> Pokazalo se da postotak KR u studiji iz 2013. godine nakon ATKS-a iznosila 96% u odnosu na 57% bolesnika u KR nakon završenog R-CHOP/R-DHAP protokola. Medijan praćenja bolesnika u dobi ispod 66 godina koji su bili uključeni u studiju je iznosio 67 mjeseci, medijan event-free survival (EFS) je iznosio 83 mjeseca, a medijan OS nije dosegnut. Petogodišnje ukupno preživljjenje je iznosilo 75%. Ova studija je pokazala da terapija temeljena na citarabingu može dovesti do visokog stupnja odgovora te da veliki broj bolesnika u odnosu na terapiju R-CHOP prelazi iz PR u KR.<sup>7</sup> Procjenu učinka terapije potrebno je učiniti nakon trećeg ciklusa terapije, a drugu procjenu nakon šestog ciklusa terapije. Bolesnike koji su autotransplantirani, a i one koji su odgovorili na liječenje, ali nije bilo moguće učiniti transplantaciju potrebno je održavati rituksimabom svaka dva mjeseca kroz tri godine. Pokazalo se da je održavanje rituksimabom kroz tri godine znatno poboljšava EFS i PFS (dvogodišnji EFS iznosi 93.2% kod bolesnika održavanih rituksimabom nakon autotransplantacije te 81.5% u bolesnika koji nisu održavani nakon istovjetne terapije).<sup>8</sup>

Prva linija terapije za bolesnike koji su stariji od 65 godina je bendamustin u kombinaciji s rituksimabom ili za bolesnike s visokim Ki-67 indeksom i one s blastoidnom slikom R-BAC ili 8 ciklusa R-CHOP nakon čega je potrebna terapija održavanja rituksimabom kroz tri godine također svaka dva mjeseca.<sup>9</sup> Učinkovitost R-BAC protokola za starije bolesnike koji nisu podobni za transplantaciju kao i za RR pacijente se pokazala u studiji objavljenoj 2013. godine kada je postignut visok stupanj KR kod bolesnika koji prethodno nisu liječeni (95%) kao i kod RR bolesnika (75%) što su bolji rezultati nego oni postignuti uz R-CHOP. Također se pokazalo da su bolji odgovori kod RR bolesnika liječenih R-BAC u odnosu na one liječene RB. R-BAC predstavlja po-

voljnu terapijsku opciju kod bolesnika koji su stariji s obzirom na svoju učinkovitost, niskom incidencijom nuspojava no uz prolaznu mijelosupresiju. Dvogodišnji PFS za ranije nelječene iznosio je 95% te 70% za RR bolesnike.<sup>10</sup> Rituksimab u kombinaciji s bendamustinom je također povoljna terapijska opcija s duljim PFS-om u odnosu na onaj postignut s R-CHOP uz niži stupanj toksičnosti.<sup>9</sup>

Unatoč boljim metodama liječenja i odgovoru na liječenje, MCL karakterizira velika vjerojatnost relapsa bolesti što može predstavljati izazov u liječenju.<sup>11</sup> Kod mlađih bolesnika ili starijih bez komorbiditeta može se pokušati s R-bendamustinom, R-BAC ili ibrutinibom, a cilj je postizanje maksimalnog terapijskog odgovora radi provođenja alogene transplantacije koštane srži.<sup>10, 12</sup> Kod starijih bolesnika ili onih nepodobnih za alogeničnu transplantaciju, cilj je postizanje što dulje vrijeme trajanja remisije. BR je učinkovit kada se koristi kao prva linija liječenja, a kada se koristi kao druga ili viša linija liječenja, pokazao se također kao dobra terapijska opcija. BR značajno produljuje PFS i dovodi do značajno višeg ORR u usporedbi s kombinacijom fludarabina i rituksimaba.<sup>12</sup> Od novijih lijekova koji se mogu koristiti u liječenju RR MCL tu su ibrutinib, lenalidomid, temsirolimus i bortezomib. Bolesnici koji razviju relaps unutar 1 do 2 godine od završetka liječenja se smatraju visokorizičnim te se kod njih uglavnom u prvom relapsu koristi BR, R-BAC ili ibrutinib. Kod starijih bolesnika postoji i terapijska mogućnost liječenja visokim dozama Ara C u kombinaciji s rituksimabom.

U drugom relapsu (ako alogenična transplantacija nije moguća), cilj je također postići što dulje trajanje remisije s modalitetima liječenja koji nisu korišteni u prvoj ili drugoj liniji liječenja. Mogu se koristiti navedeni lijekovi (ibrutinib, lenalidomid, temsirolimus i bortezomib) u kombinaciji s rituksimabom. Kod starijih bolesnika se preferira monoterapija u odnosu na kombinaciju.<sup>13</sup>

Ibrutinib, inhibitor Brutonove tirozin kinaze koji se koristi u monoterapiji i kombiniranoj terapiji u brojnim hematološkim bolestima, pokazao je svoju učinkovitost i kod RR bolesnika s MCL-om gdje je postignut ORR od 68%, a medijan trajanja odgovora na terapiju je iznosio 17,5 mjeseci kod bolesnika koji su primili ranije više linija liječenja.<sup>14</sup> Ibrutinib u kombinaciji s rituksimabom prema studiji koja se provodi u MD Anderson Cancer Centre je također pokazao učinkovitost. Prema preliminarnim rezultatima 44% bolesnika s RR MCL je postiglo KR, a 44% PR te ORR iznosi 88% što bi ukazivalo na od-

ličan terapijski odgovor s obzirom na to da se radi o relapsnom refraktornom obliku MCL-a, no potrebno je daljnje praćenje.<sup>15</sup>

Randomizirana studija prezentirana 2015. godine u kojoj je uspoređivana učinkovitost ibrutiniba i temsirolimusa u RR bolesnika prethodno liječenih terapijom uz rituksimab, pokazala je da je dvogodišnji PFS kod bolesnika liječenih ibrutinibom iznosi 41%, a kod onih liječenih temsirolimusom 7%. ORR za ibrutinib je iznosio 72%, a za temsirolimus 40% te je ova studija potvrdila superiornost ibrutiniba kod RR bolesnika s MCL-om s nižim stupnjem nuspojava te rjeđim prekidom terapije radi toksičnosti u odnosu na temsirolimus.<sup>16</sup>

Lenalidomid je lijek s direktnim učinkom na maligne B limfocite i indirektnim učinkom preko aktivacije T limfocita, povećanja broja NK stanica i citotoksičnosti ovisne o protutijelima te protuupalnim učinkom temeljenim na učinku na citokine. Postoji nekoliko studija koje su ispitivale učinkovitost lenalidomida kao monoterapije te studije u kojima se kombinira uz druge modalitete liječenja. U studiji koju provode Goy i sur. se ispituje učinak kombinacije lenalidomida, rituksimaba i ibrutiniba kod RR MCL u dobi od 47 do 81 godine te su preliminarni podaci obećavajući budući da je postignuta KR od 60%, šestomjesečni PFS iznosi 91% te šestomjesečni OS 100%.<sup>17</sup>

Učinkovitost bortezomiba, inhibitora proteasoma, ispitivana je u PINNACLE studiji gdje je postignut ORR od 32%, a od toga je 8% bolesnika imalo KR. Nuspojave su većinom bile u vidu periferne neuropatije i limfopenije.<sup>18</sup> Kombinacija bortezomiba i rituksimaba je evaluirana u BRIL06 studiji kod bolesnika s RR MCL te je ORR iznosi 64% i petogodišnji PFS 17%.<sup>19</sup>

Na sreću, radi se o rjeđoj podvrsti non Hodgkinovog limfoma s velikom sklonošću relapsima kod kojeg postoji sve više terapijskih mogućnosti, a na temelju navedenog, kod mlađih bolesnika je potrebno učiniti autolognu transplantaciju koštane srži ako je postignuta najmanje PR bez infiltracije koštane srži uz održavanje rituksimabom, a kod starijih bolesnika je cilj postići što dublji terapijski odgovor i što dulje vrijeme trajanje remisije.

#### Literatura:

- Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle cell lymphoma. Semin Hematol. 1999; 36(2): 115-27
- Fernandez V, Salamero O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. Cancer Res. 2010; 70: 1408-1418

3. Lim S.Y., Horsman J.M., and Hancock B.W. The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index: Does it work in routine practice? *Oncol Lett.* 2010; 1(1): 187–188.
4. Hermann A, Hoster E, Zwingers T, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 511-518
5. Dreyling M, Lenz G, Hoster E, et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood.* 2005; 105(7): 2677-2684
6. Lefrere F, Delmer A, Suzan F, et al. Sequential chemotherapy by CHOP and DHAP regimens followed by high-dose therapy with stem cell transplantation induces a high rate of complete response and improves event-free survival in mantle cell lymphoma: a prospective study. *Leukemia.* 2002; 16(4): 587-593.
7. Delarue R, Haioun C, et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood.* 2013; 121(1)
8. Le Gouill S, Thieblemont C, et al. Rituximab Maintenance Versus Wait and Watch after Four Courses of R-DHAP Followed By Autologous Stem Cell transplantation in Previously Untreated Young Patients with Mantle Cell Lymphoma: First Interim Analysis of the Phase III Prospective Lyma Trial, a Lysa Study. *Blood.* 2014; 124:146
9. Rummel MJ, Niederle N et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet.* 2013; 381(9873): 1203-10
10. Visco C, Finotto S, et al. Combination of Rituximab, Bendamustine, and Cytarabine for Patients With Mantle-Cell Non-Hodgkin Lymphoma Ineligible for Intensive Regimens or Autologous Transplantation. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1442-1449
11. Goy A, Kahl B. Mantle cell lymphoma: the promise of new treatment options. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011; 80: 69–86.
12. Rummel M, Kaiser U, Balser C, et al. Bendamustine plus rituximab versus fludarabine plus rituximab for patients with relapsed indolent and mantle-cell lymphomas: a multicentre, randomised, open-label, noninferiority phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 57–66.
13. Dreyling M, Auer I, Cortelazzo S, et al. Treatment for patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma: European-based recommendations. *Leukemia & Lymphoma,* DOI: 10.1080/10428194.2017.1403602
14. Wang ML, Blum KA, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, Williams ME, et al. Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: updated safety and efficacy results. *Blood.* 2015; 126(6): 739–457
15. Wang ML, Lee H et al. Ibrutinib in combination with rituximab in relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a single-centre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jan; 17(1): 48-56
16. Rule S et al. ASH 2015; Abstract 469 (Oral Presentation)
17. Goy A, Feldman TA, Leslie LA, Panchal RP, Nyirenda T, Skarbnik AP, Yannotti K, Zenreich J, Bejot CM, Stives S, et al. Phase Ib-II study of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor ibrutinib, w/ lenalidomide and rituximab in relapsed/ refractory mantle cell lymphoma. *Blood.* 2017; 130(1): 2785
18. Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 4867–4874.
19. Chiappella A, Pregno P, Zinzani PL, et al. The combination of weekly infusion of rituximab and bortezomib is effective in relapsed or refractory indolent and mantle cell lymphoma: long-term results of phase II BRIL06 study of the Fondazione Italiana Linfomi (FIL). *Blood.* 2015; 126: 2735

## Tkuća biopsija i njezin značaj u hematologiji

Ita Hadžisejdjić<sup>1</sup>, Miljenko Katunarić<sup>2</sup>, Toni Valković<sup>3</sup>, Nives Jonjić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zavod za patologiju, KBC Rijeka

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

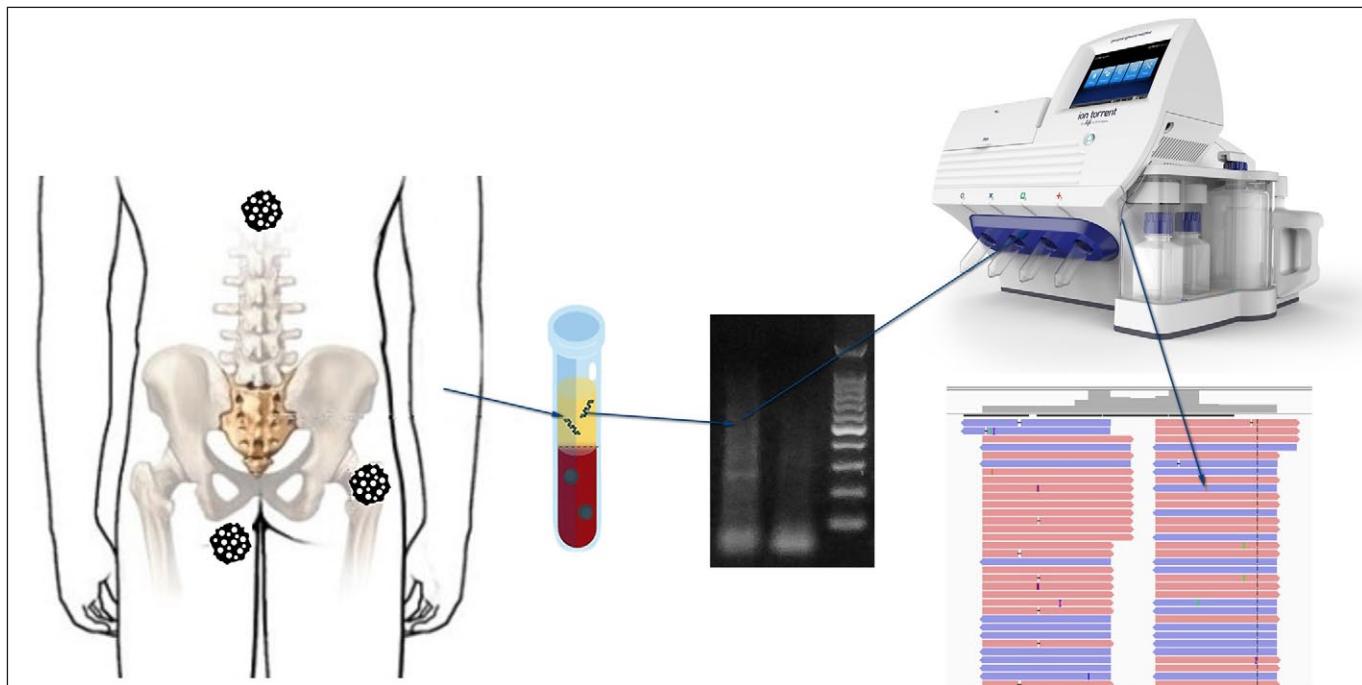
<sup>3</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za internu medicinu, KBC Rijeka

E-pošta: ita.hadzisejdic@medri.uniri.hr

Slobodne, cirkulirajuće molekule DNK, izvan stanica, u ljudskoj plazmi opisane su još 1948. godine no njihova klinička primjena po prvi puta je započela pola stoljeća kasnije, upotrebom u prenatalnom probiru (1,2). Udio slobodne cirkulirajuće DNK, kod pacijenata s hematološkim i solidnim tumorima, je znatno veći nego kod zdravih osoba upravo zbog većeg umnažanja i propadanja stanica. Udio slobodne cirkulirajuće DNK koji nosi tumor specifične promjene naziva se „cirkulirajućom tumorskom“ DNK (ctDNA), a ona se otpušta u cirkulaciju upravo zbog nekroze i apoptoze tumorskih stanica, a manjim dijelom putem aktivne sekrecije (3).

Za evaluaciju genetičkog materijala tumora potreban je bioptički uzorak tkiva tj. koštana biopsija ili biopsija zahvaćenog limfnog čvora odnosno me-

kog tkiva. Uzimanje bioptata je invazivan postupak s mogućim razvojem komplikacija, ali isto tako i limitirajući, jer dobivamo genetski materijal iz samo jednog dijela tumorskog tkiva uzimajući u obzir intratumoralnu heterogenost. S druge pak strane, ctDNA predstavlja mješavinu nukleinskih kiselina iz sveukupnog tumorskog tkiva, kako primarnog tako i metastatskih sijela, a samim time i reprezentativniji „genomski“, tumorski materijal. Venepunkcija i dobivanje uzorka slobodne DNK je minimalno invazivan postupak koji se može češće ponavljati te tako možemo sigurnije monitorirati tumorsku masu kao i odgovor na terapiju (4). Također treba imati na umu da količina cirkulirajuće DNA u organizmu ovisi i o njenom odstranjuvanju iz plazme, filtriranjem krvi u jetri, bubrežima i slezeni te o degradaci-



**Slika 1.** Cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) otpušta se u krv iz svih tumorskih sijela. Odvajanjem plazme iz periferne krvi izolira se ctDNA koja se u krv otpušta uslijed propadanja tumorskih stanica. ctDNA je vidljivo fragmentirana te je prisutna u malim količinama stoga su za analizu takvih uzoraka potrebne analitičke metode izrazito visoke osjetljivosti kao što je NGS (next generation sequencing). Sekvenciranje nove generacije vrši tisuće očitanja svakog umnoženog nukleotida te ima osjetljivost detekcije mutacija manju od 0,1% što je potrebno da se detektira i manji udio ctDNA u ukupnoj slobodnoj staničnoj DNA.

ji DNK, tako da se vrijeme poluraspada nukleinskih kiselina u krvi kreće od 15 min do 2 sata (5). Stoga se takav uzorak krvi mora što prije dopremiti u laboratorij na izolaciju nukleinskih kiselina. Budući da su količine slobodne, cirkulirajuće DNK niske, za analizu takvih uzoraka, potrebne su i analitičke metode izrazito visoke osjetljivosti kao što su digital PCR (ddPCR, BEAMing) i NGS (next generation sequencing) (Slika 1.).

Precizno monitoriranje ctDNA je značajno zbog ranog otkrivanja relapsa bolesti odnosno ciljnih mutacija što može značajno utjecati na ishod liječenja pacijenata oboljelih od hematoloških malignih bolesti. Prva studija koja je evaluirala mutacije na cirkulirajućoj slobodnoj DNK hematoloških pacijenata je bila provedena na oboljelima od akutne mijeloične leukemije (AML) i mijelodisplastičnog sindroma (MDS) (6). Istraživanje je pokazalo, između ostalog, mutacije u slobodnoj cirkulirajućoj DNK koje nisu bile pronađene u uparenim uzorcima DNK dobivenim iz blasta periferne krvi ili DNK dobivene iz bioptata koštane srži. Autori tog istraživanja su zaključili da plazma može poslužiti kao lako dostupan i koristan materijal za detekciju i praćenje mijeloidnih oboljenja. Također ctDNA može se koristiti i kod pacijenata oboljelih od limfoma pa tako i kod difuznog veliko staničnog B limfoma (DLBCL-a), a u svrhu otkivanja novih mutacija, klonalne evolucije te razvoja rezistencije na terapiju (7). Da bi se otkrile somatske intratumoralne mutacije, Rossi i sur su pokazali da genotipiziranje slobodne cirkulirajuće DNK oboljelih od DLBCL-a je jednako točno i precizno kao i genotipiziranje bioptata istog tumora (7). Mutacije je tako moguće otkriti u realnom vremenu javljanja što omogućava preciznije praćenje klonalne evolucije kao i otkrivanja liječenjem izazvanih rezistentnih mutacija. Značajna prednost takvog praćenja pacijenata, putem ctDNA, pred radiološkim metodama, je što se radiološkim metodama tumor može otkriti kada dosegne veličinu od  $1 \times 10^{12}$  stanica, a trenutačno dostupne metode detekcije ctDNA imaju prag osjetljivosti od  $1 \times 10^6$  stanica (8). Studije pokazuju da 15% pacijenata s DLBCL-om koji su PET (positron emission tomography) negativni, nakon standardne terapije, će razviti relaps bolesti što indirektno ukazuje na prisutnost „mikroskopske“ ostatne bolesti (9).

Studija Scherer i suradnika je pokazala da količina ctDNA kod DLBCL pacijenata prije same terapije ima prognostički značaj (10). Koncentracija ctDNA u plazmi je korelirala s kliničkim parametrima veličine tumorske mase npr serumskom razi-

nom laktat dehidrogenaze (LDH), stadijem bolesti i Internacionalm Prognostičkim Indeksom (IPI). Najvažnija spoznaja proizašla iz ove studije je činjenica da ctDNA omogućava pouzdanu genotipizaciju tumorske DNK bez potrebe za dobivanjem bioptičkog materijala. Schere i sur su pokazali, da ako je udio frakcije nekog alela 20%, moguće je identificirati gotovo sve pojedinačne nukleotidne varijante u genima pokretačima iz uzorka DNK dobivenih iz plazme. Autori su u ovoj studiji također pokazali da su pacijenati kod kojih je došlo do transformacije iz indolentnog u agresivni oblik limfoma imali veće koncentracije ctDNA i veći broj jedinstvenih mutacija u plazmi prije same kliničke pojave znakova za transformaciju što bi značilo da će „tekuća biopsija“ moći pomoći kod predikcije tj odabira pacijenata koji su u povećanom riziku od prelaska u agresivniji oblik limfoma.

U zaključku, ono što tkuća biopsija donosi je mogućnost procjene i praćenje maligne bolesti na molekularnom nivou, daje nam na uvid molekulare informacije iz sveukupnog tumorskog tkiva koje ne možemo dobiti iz samo jednog područja tkiva biopsijom. Biopsija jednog područja tumorskog tkiva donosi samo dio „molekularnih“ informacija tumora i ne obuhvaća „prostorno“ heterogenu populaciju stanica (sub-klonovi tumorskih stanica koji se nalaze na različitim područjima) odnosno njen genetski materijal. Tkuća biopsija je osjetljivija i preciznija metoda te daje znatno više informacija važnih za prognozu i liječenje pacijenata. Sve ovo ukazuje da su opravdani naporci da se uključi precizno ctDNA praćenje u liječenje oboljelih od malignih hematoloških oboljenja. Značaj tkuće biopsije u istraživanjima je davno prepoznat međutim da bi se ona upotrebljavala u kliničkoj praksi potrebno je još vremena. Da bi tkuća biopsija postala sastavni dio kliničke prakse potrebna je standardizacija pre-analitičkih (npr. prikupljanje krvi) i analitičkih metodologija (DNA izolacija i kvantifikacija, količina ctDNA), te osjetljive i klinički dostupne metode analize takvih uzoraka. Kod niskih koncentracija mutirane DNK mogući su lažno pozitivni rezultati, kada prisutna aberacija ne odražava tumorski klon ili lažno negativni kada je razina mutacije ispod razine osjetljivosti metoda. Stoga je kontinuirana analitička validacija ctDNA testiranja ključna za etabriranje ctDNA baziranih testova u standardnoj kliničkoj praksi pa tako i u hematologiji.

**Literatura**

1. Mandel P, Metais P. The nucleic acids in blood plasma in humans. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142:241-3.
2. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350:485-7.
3. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61:1659-65.
4. Patel KM, Tsui DW. The translational potential of circulating tumour DNA in oncology. *Clin Biochem.* 2015;48:957-61.
5. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9236-41.
6. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994;86:774-9.
7. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, Monti S, Zanni M, Rasi S, Deambrogi C, Spina V, Bruscaggin A, Favini C, Serra R, Ramponi A, Boldorini R, Foà R, Gaidano G. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood.* 2017;129:1947-1957.
8. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, Pui CH, Campana D. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012;120:5173-80.
9. Adams HJ, Nievelstein RA, Kwee TC. Prognostic value of complete remission status at end-of-treatment FDG-PET in R-CHOP-treated diffuse large B-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol.* 2015;170:185-91.
10. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AF, Esfahani MS, Lovejoy AF, Chabon JJ, Klass DM, Liu CL, Zhou L, Glover C, Visser BC, Poultides GA, Advani RH, Maeda LS, Gupta NK, Levy R, Ohgami RS, Kunder CA, Diehn M, Alizadeh AA. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 2016;8:364ra155

## Prolazni mijeloproliferativni poremećaj u djece s Downovim sindromom

**Barbara Tomić, dr. med.**  
**Prof. dr. sc. Ernest Bilić, dr. med.**

Zavod za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i  
Kliničkog bolničkog centra Zagreb,  
Kišpatičeva 12, 10 000 Zagreb  
E-pošta: ernest.bilic@zg.t-com.hr

Downov sindrom je najčešća kromosomopatija u ljudi - posrijedi je „višak“ 21. kromosoma, tj. trisomija 21. kromosoma. Učestalost mu je oko 1/700 do 1/1000 novorođenčadi, iako je, gledano od samog začeća, učestalost dvostruko veća. Razlika proizlazi iz činjenice da većina takvih trudnoća završava spontanim pobačajem. U čak 18 % spontanih pobačaja riječ o fetusima s trisomijom 21.

U najvećem broju slučajeva (i do 95%) riječ je tzv. fenomenu nerazdvajanja, tj. poremećaju na razini mejotičke diobe. Ako prilikom gametogeneze ne dođe do pravilnog razdvajanja kromosoma, dolazi do stvaranja gamete s dva kromosoma 21. Oplodnjom, tj. spajanjem s „normalnom“ gametom drugog roditelja koja u zigotu donosi svoju kopiju 21. kromosoma, nastaje stanica s ukupno tri kromosoma 21. Budući da je dakle riječ o poremećaju na razini gametogeneze, tj. nastanka spolnih stanica, djeца s Downovim sindromom najčešće su djeца „zdravih“ roditelja normalnog kariotipa u somatskim stanicama. Dodatna kopija kromosoma 21 najčešće je majčinog podrijetla i to posljedično poremećaju u prvoj mejotičkoj diobi (u 90 % slučajeva). Prepostavlja se kako je upravo dob majke jedan od mogućih uzroka te pojave. Epidemiološkim studijama utvrđene su 60 puta veće prevalencije trisomije 21 u novorođenčadi majki u dobi od 45 godina, u odnosu na one u dobi od 25 godina.

Djeça s Downovim sindromom imaju znatno povećan rizik za razvoj leukemija u dječjoj dobi, osobito akutne megakarioblastične leukemije te akutne limfoblastične leukemije. Rizik za obolijevanje od drugih malignih bolesti ne pokazuje takvu specifičnost. Smatra se kako tzv. efekt genske doze, povezan s genima smještenima na 21. kromosomu, uzrokuje hiperproliferaciju hematopoetskih progenitora u fetalnoj jetri. Prepostavlja se kako to izraženo umnjanje nediferenciranih hematopoetskih stanica u konačnici dovodi do nastanka specifičnih mutacija

u staničnim linijama koje nazivamo premaligni klonovi. Te sekundarne genetske promjene, prije svega mutacija GATA1 gena, rezultiraju nastankom hematološkog poremećaja poznatijim kao preleukemija, tj. prolazni mijeloproliferativni poremećaj (engl. transient myeloproliferative disorder, TMD).

Prolazni mijeloproliferativni poremećaj – TMD, poznat je i pod nazivom prolazna poremećena mijelopoeza (engl. transient abnormal myelopoesis, TAM), a definiran je pojavom, odnosno detekcijom megakarioblasta u uzorku krvi dojenčadi s Downovim sindromom tijekom prva 3 mjeseca života. U većini simptomatskih slučajeva TMD se razriješi spontano. Ovaj poremećaj se ponekad naziva i prolazna leukemija (engl. transient leukaemia).

### Epidemiologija

TMD se javlja u 5 do 10 % dojenčadi s Downovim sindromom, a dijagnoza se najčešće postavlja tijekom prvog tjedna po rođenju (medijan 3. do 7. dana po rođenju). Trenutno još uvijek ne postoje precizno definirani jedinstveni kriteriji za postavljanje te dijagnoze, pa procjene incidencije TMD-a vrlo vjerojatno odstupaju od stvarne učestalosti jer se još uvijek ne provode rutinske pretrage periferne krvi, kao ni testiranja na prisutnost GATA1 mutacija u sve novorođenčadi s Downovim sindromom. Iz tog razloga postoji realna mogućnost da mnogi slučajevi subkliničkog TMD-a bivaju previđeni.

TMD se pojavljuje u djece sa stečenom somatskom trisomijom kromosoma 21, kao i u mozaika za trisomiju 21; što je dodatna potvrda ispravnosti ranije navedenih hipoteza, odnosno trisomije 21 kao zajedničke sklonosti razvoju hematoloških poremećaja u djece s Downovim sindromom. Međutim, ne smije se isključiti ni doprinos drugih, zasad nepoznatih, faktora koji dovode do leukemogeneze. Naime, 2015. godine objavljen je prikaz slučaja novorođenčeta bez Downovog sindroma s kliničkom slikom te

hematološkim nalazima sukladnima s TMD-om (tj. AMKL-om, uzmemu li u obzir preklapanje njihovih obilježja), u kojeg nije ustanovljena trisomija 21, ni mutacija GATA1 gena.

Bit „previđenih“, prije svega subkliničkih, slučaja TMD-a nije u nepouzdanosti/nepreciznosti epidemioloških podataka koji iz toga proizlaze, nego u činjenici da se radi o djeci koja nisu pravovremeno identificirana kao djeca sa znatno povećanim rizikom za razvoj AML-DS-a. To za posljedicu, među ostalim, ima i kasnije postavljanje dijagnoze AML-DS-a, što onemogućuje pravovremenu intervenciju liječnika.

### Klinička prezentacija i postavljanje dijagnoze

Definicija prolaznog mijeloproliferativnog poremećaja (TMD) i kriteriji za postavljanje dijagnoze još uvijek nisu uniformni.

Prema trenutnim saznanjima, mutacija GATA1 gena smatra se ključnim događajem koji prethodi nastanku tog poremećaja. Ishod GATA1 mutacije u načelu je dvostran; ona može dovesti do promjena bez ikakvog kliničkog očitovanja (engl. clinically silent mutation) ili do preleukemičnog poremećaja. U 10 – 15 % novorođenčadi s Downovim sindromom dolazi do subkliničkog stanja poznatijeg kao tzv. tihi mijeloproliferativni poremećaj (engl. silent TMD). Kod te djece izostaje bilo kakvo očitovanje TMD-a u smislu pojave simptoma ili znakova te je zapravo riječ o „slučajnom“ nalazu blasta prilikom pregleda krvnog razmaza u djeteta koje se, barem s hematološkog gledišta, čini potpuno zdravo.

Primjećeno je kako udio blasta u perifernoj krvi dobro korelira s ozbiljnošću kliničkog očitovanja (veći udio blasta obično je povezan s težom kliničkom slikom) te su provedene studije kako bi se odredila referentna vrijednost, tj. prag indikativan za TMD. Pritom je naglasak bio na otkrivanju vrijednosti kojom bi bila obuhvaćena sva novorođenčad s TMD-om čije bi kliničko očitovanje moglo biti potencijalno vitalno ugrožavajuće. To je od iznimne važnosti jer u praksi predstavlja jedini oblik sekundarne prevencije vezane uz TMD. Na taj bi se način mogla na vrijeme identificirati ona djeca kod kojih bi kontrolni pregledi te, u slučaju potrebe, i primjena kemoterapije, imali ključan utjecaj na konačan ishod s obzirom na to da smrtnost od TMD-a praćenog uobičajenim kliničkim obilježjima iznosi i do 20%. Time se pokušalo na praktičnoj razini pristupiti problemu definicije TMD-a s obzirom na to da je pojava blasta u razmazu periferne krvi iznimno čest nalaz kod novorođenčadi s Downovim sindromom,

prisutan čak u do 98 % slučajeva. Važnost ispravne dijagnoze TMD-a jest prije svega u pravovremenoj intervenciji u slučaju kliničkih oblika. Moguće je kako će se s vremenom potvrditi i važnost distinkcije tih forme TMD-a od potpuno nesignifikantnog nalaza blasta, ako se ispostavi kako i tih forma tog poremećaja predstavlja značajan čimbenik rizika za razvoj AML-DS-a. Imajući na umu njegovu molekularnu, tj. biološku podlogu te činjenicu kako primjerice gotovo 1/3 djece sa simptomatskim oblikom TMD-a još tijekom najranijeg djetinjstva razvija AML-DS, ta se mogućnost čini sasvim racionalno utemeljena.

Udio blasta u perifernoj krvi koji se smatra pouzdanim u kliničkoj praksi, iznosi > 10 % cirkulirajućih leukocita iako su neki autori kao dijagnostički kriterij predlagali nalaz više od 20 % blasta u perifernoj krvi. Kod udjela blasta manjeg od 20 %, važnost nalaza bila bi potvrđena tek pronalaskom GATA1 mutacije. Treba uočiti kako takav pristup nužno ne isključuje mogućnost da su u tim blastnim stanicama, čak i u slučaju izostanka GATA1 mutacije, prisutne druge genetske pa čak i epigenetske promjene koje bi mogle imati kasniji utjecaj na nastanak hematoloških poremećaja.

Dodatni problem predstavlja nespecifična morfologija megakarioblastnih stanica, koje unatoč nekim poznatim obilježjima poput bazofilnosti te tzv. *blebbinga citoplazme* (vidljivog kao izbočenja, tj. protruzije stanične membrane), pokazuju značajnu raznolikost morfologije; što znatno otežava njihovo prepoznavanje. Važnost tog problema leži u činjenici kako su nalazi udjela blasta dobiveni strojnom analizom uzorka često manji od stvarnog iznosa te se stoga preporučuje upravo analiza krvnog razmaza, po mogućnosti provedena od strane iskusnog citologa. Imunofenotipizacija je vrlo korisna jer megakarioblasti u cirkulaciji nose specifične imunofenotske biljege (npr. CD33/38/117/34/7/56/36/71/42b). Međutim, i imunofenotip tih stanica je iznimno varijabilan, odnosno spomenuti biljezi dolaze u raznim kombinacijama. Tako je moguća raznolika (ko)ekspresija markera poput CD molekula karakterističnih za matične stanice (npr. CD34, CD117), mijeloidnu lozu (CD33/CD13), glikoproteina trombocita (CD36, CD42 i CD61) itd.

Mogući, i danas najčešće primjenjivani „dodatni kriterij“ pri postavljanju, tj. potvrđi dijagnoze TMD-a je dokaz prisutnosti GATA1 mutacije. Pritom treba naglasiti kako je rezultat tog nalaza ponajprije ovisan o pouzdanosti primjenjivane dijagnostičke metode. Među mnogim dostupnim metodama

kao što su izravna Sangerova metoda sekvenciranja te denaturirajuća tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. dHPLC, denaturing high performance liquid chromatography), danas se kao osobito vrijedno ističe tzv. sekvenciranje nove generacije (engl. NGS, next generation sequencing), jer jedino taj pristup omogućuje detekciju GATA1 mutacija u slučaju malobrojnih klonova (tj. malog udjela stanica s mutacijom) u uzorku. Treba napomenuti kako se u gotovo četvrtine novorođenčadi sa značajnim udjelom blasta prema navedenom pragu ( $> 10\%$ ) ne nalazi GATA1 mutacija, čak ni korištenjem sekvenciranja nove generacije. Iz toga se može zaključiti kako čak ni kombinacija tih dvaju dijagnostičkih kriterija u konačnici ne daje jednoznačan odgovor na pitanje treba li u pojedinog djeteta postaviti dijagnozu prolaznog mijeloproliferativnog poremećaja. Jedan od čimbenika koji nedvojbeno usmjerava postupanje liječnika jest klinička slika.

TMD se prezentira vrlo rano tijekom dojenačkog razdoblja (u većine djece do 2 mjeseca starosti). Klinička slika vrlo je varijabilna te obuhvaća promjene u krvnoj slici (trombocitopeniju, anemiju, leukocitozu), hepatomegaliju te splenomegaliju, serozne izljeve (pleuralni i perikardijalni izljev te ascites), a ponekad i promjene na koži. Leukocitoza se javlja u trećine do polovine slučajeva i obično uključuje mijelocite te monocite, neutrofile i bazofile. Broj trombocita varira, može biti i u granicama normalne. Sukladno patofiziologiji samog poremećaja, tj. porastu broja megakariocita u fetalnoj jetri, može se javiti i trombocitoza, ali i trombocitopenija, kao odraz aberantne diferencijacije megakariocita. Nižak broj trombocita ustanovljen je i u krvi fetusa, također zbog dismegakariopoeze koja naposljetku onemogućava normalno formiranje trombocita. U slučaju pridružene narušene jetrene funkcije javljaju se i poremećaji koagulacije. Diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK) relativno je rijetka te se javlja samo u teškim slučajevima jetrenog zatajenja.

Hepatomegalija kao i disfunkcija jetre, koja se očituje kao konjugirana hiperbilirubinemija s posljedičnom žuticom te poremećajima koagulacije, javljaju se zbog infiltracije blastnim stanicama te fibroze. Kod žutice, fibroza kao patofiziološki mehanizam očito nadvladava samu infiltraciju te je riječ o konjugiranoj (direktnoj) hiperbilirubinemiji. Ponekad je moguće i nalaz povišenih transaminaza. Povod nastanku fibroze još uvejk nije u potpunosti poznat. Pretpostavlja se kako je riječ o utjecaju trombocitnog faktora rasta (engl. platelet-derived growth factor, PDGF) te transformirajućem faktoru rasta  $\beta 1$

(engl. transforming growth factor-[beta]1, TGF- $\beta 1$ ). Zanimljivo je kako prijelaz te potom i samu AML-DS karakterizira fibroza koštane srži, podsjećajući na promjene u jetri posljedično razvijenom TMD-u. Budući da je kod leukemije glavno mjesto patoloških zbivanja upravo koštana srž, za razliku od TMD-a kod kojeg je centar zbivanja jetra, moguće je da se ne radi o slučajnoj analogiji.

Izljevi su približno dvostruko češći u pleuralnoj i/ili perikardijalnoj šupljini u odnosu na pojavu ascitesa. Moguće je da se jednostavno radi o povezanih simptomatologije i dijagnostike jer je očekivano da se perikardijalni ili pleuralni izljev ranije očituju kliničkom simptomatologijom, dok u abdominalnoj šupljini (početna) manja količina slobodne tekućine može proći nezapaženo.

Od promjena na koži ključne su dvije moguće prezentacije: petehije i kožni perivaskularni infiltrati stanica u okviru samog TMD-a koji se stoga nazivaju i kožni TMD ili TAM – cutis. Riječ je o generaliziranom papuloznom osipu.

Nijedan od navedenih kliničkih nalaza nije specifičan za TMD, riječ je o simptomima koji se u svakodnevnoj kliničkoj praksi susreću čak i češće u okviru drugih stanja i poremećaja, učestalijih u općoj pedijatrijskoj populaciji. Iz tog je razloga važno da liječnici kod djece koja ujedno imaju i Downov sindrom, posumnjuju na mogućnost pojave TMD-a. Primjerice, u slučaju novorođenačke žutice kasnog nastupa, ili pak icterusa prolongatusa, kod novorođenčeta s Downovim sindromom može se raditi o TMD-u i s njim povezanoj progresivnoj fibrozi jetre. Ona može biti i fulminantnog tijeka te na koncu imati fatalan ishod. Kod benignijih oblika, važnost dijagnoze nije (toliko) u prepoznavanju samog TMD-a, koji možda neće ni zahtijevati terapijske mjere, nego u identifikaciji rizičnog čimbenika za kasniji razvoj leukemije u tog pacijenta. Iako pouzdani prediktor tog prijelaza još uvejk nisu poznati, zanimljivo je kako su analize pokazale da je, od glavnih kliničkih očitovanja TMD-a, jedini potencijalni pokazatelj njegove buduće transformacije u AML-DS, pojava pleuralnog izljeva u novorođenačkom razdoblju. U prenatalnoj kliničkoj slici osobito se izdvajaju slučajevi teškog fetalnog hidropsa te bi pri nalazu hepatosplenomegalije i fetalnog hidropsa prilikom ultrazvučnog pregleda u obzir svakako trebalo uzeti i TMD. Kod težih je slučajeva mogući ishod i intrauterina smrt. Kao dodatna pomoć pri postavljanju dijagnoze TMD-a, može poslužiti protočna citometrija uzorka periferne krvi, tj. imunofenotipizacija megakarioblasta. GATA1 esej, s obzirom na to da je

riječ o mutaciji specifičnoj za taj poremećaj, bio bi također od velike koristi pri postavljanju dijagnoze TMD-a, kao i samog AML-DS-a.

## Terapija

Budući da je karakteristika TMD-a česta spontana rezolucija unutar prva tri mjeseca života, postavlja se pitanje smislenosti provođenja terapijskih postupaka u tih pacijenata, s obzirom na to da oni sami po sebi podrazumijevaju određene rizike. Uvođenje terapije razmatra se kako radi prevencije težih kliničkih slika te mogućih loših ishoda samog TMD-a, tako i u svrhu eventualne prevencije njegove progresije u AML-DS. Pod terminom terapije ovdje se primarno podrazumijeva uvođenje citostatika, dok se primjerice privremene transfuzije u svrhu korekcije deficitu u krvnoj slici smatraju više dijelom supertivnog pristupa.

Opravdanim povodom za započinjanje terapije svakako se smatra pojava vitalno ugrožavajućih komplikacija poput pogoršanja respiracijske ili jetrene funkcije. Poremećaj respiracijske funkcije može biti uzrokovani hepato(spleno)megalijom te posljedičnim pritiskom na osit kojim je onemogućeno njegovo pomicanje prilikom inspiracija. Stanja poput koagulopatije i zatajenja bubrega odražavaju teško stanje pacijenta. Prematuritet, hiperleukocitoza (više od  $100 \times 10^9/L$ ), kao i teški poremećaj funkcije jetre, također su povezani s ranim smrtnim ishodom, kao i lošijim prezivljenjem. U skladu s navedenim čimbenicima rizika za nepovoljan ishod, sastavljene su i smjernice, tj. popis indikacija za započinjanje terapije.

U terapiji TMD-a najčešće se primjenjuju niske doze citozin arabinozida (citarabin, ara-C) u vidu kratkotrajne primjene. Preporučena je doza od 1 miligrama po kilogramu tjelesne mase na dan tijekom 7 dana. Odabir trajanja primjene lijeka u skladu je sa zamijećenim brzim odgovorom na terapiju i nestankom perifernih blasta unutar prvog tjedna primjene. Uvođenje terapije se preporučuje i kod djece s karakteristikama koje se povezuju s visokim rizikom nastanka komplikacija. Naime, utvrđeno je kako rano uvođenje te terapije za posljedicu ima smanjenje stopa mortaliteta, osobito u djece koja nisu razvila zatajenje, tj. fibrozu jetre. Kod onih kod kojih je već došlo do teške jetrene bolesti, učinkovitost, tj. odgovor na terapiju je vrlo slab; stoga je ključ terapije u njezinoj pravovremenoj primjeni.

Kada se slučajevima spontane rezolucije bez terapijskih intervencija pridruže djeca koja su primila terapiju, uz naglasak na pažljiv odabir kandidata za

njeno provođenje, pozitivan ishod rezolucije postiže se u do čak 90 % pacijenata.

Napretkom dijagnostičkih metoda, prije svega molekularnih, broj djece s utvrđenim GATA1 mutacijama nastavlja se povećavati. Među zadnjim pomacima u molekularnoj dijagnostici treba ponovno istaknuti detektiranje mutacija metodom sekvenciranja nove generacije (engl. next generation sequencing, NGS). Iako je podatak o prelasku subkliničkog TMD-a u AML-DS zasad nepoznat zbog nedostatnosti dijagnosticiranja tog asimptomatskog stanja, poznato je kako i do 30 % novorođenčadi s anamnezom TMD-a kasnije razvija AML-DS. Stoga se istražuju potencijalne metode prevencije te progresije u znatno ozbiljniju hematološku bolest. Djecu sa Downovim sindromom i TMD-om treba kontrolirati najmanje do navršene pete godine života.

## LITERATURA:

1. Bilić E. Bolesti krvi, krvotornih organa i solidni tumori dječje dobi. U Mardešić D ur. Pedijatrija VIII izd. Zagreb: Školska knjiga. 2016: 647-693.
2. Bhatnagar N, Nizery L, Tunstall O, Vyas P, Roberts I. Transient Abnormal Myelopoiesis and AML in Down Syndrome: an Update. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016.;11(5):333–41.
3. Greaves M. Childhood leukemia. *Bmj.* 2002.;324:283–7.
4. Gruber TA, Downing JR. Blood Spotlight The biology of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Blood.* 2015.;126(8):943–50.
5. Kaneko H, Kobayashis E, Yamamotos M, Shimizu R. N- and C-terminal transactivation domains of GATA1 protein coordinate hematopoietic program. *J Biol Chem.* 2012.;287(25):21439–49.
6. Maloney KW, Taub JW, Ravindranath Y, Roberts I, Vyas P. Down syndrome preleukemia and leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 2015.;62(1):121–37.
7. Mateos MK, Barbaric D, Byatt S-A, Sutton R, Marshall GM. Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. *Transl Pediatr.* 2015.;4(2):76–92.
8. Roy A, Roberts I, Vyas P. Biology and management of transient abnormal myelopoiesis (TAM) in children with Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012.;17(4):196–201.
9. Smith OP. Haematological disorders in Down syndrome. *Paediatr Child Health (Oxford).* 2013.;23(11):497–500.
10. Tomić B. Leukemije u djece s Downovim sindromom (diplomski rad). Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;2017:14-23.
11. Zwaan CM, Reinhardt D, Hitzler J, Vyas P. Acute Leukemias in Children with Down Syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010.;24(1):19–34.

## Akutna eritroidna leukemija: stari/novi entitet-morfološka reklassifikacija slučajeva u KBC-u Zagreb od 2008. do 2016. godine

**Sunčica Ries, Koraljka Gjadrov Kuveždić**

Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb, Zagreb

Adresa autora za kontaktiranje:

Dr. sc. Sunčica Ries, dr.med.

Klinički zavod za patologiju i citologiju

Klinički bolnički centar Zagreb

E-pošta: sun77ries@yahoo.com

### Uvod

Postavljanje citomorfološke dijagnoze akutne eritroidne leukemije nije jednostavno. Povećan broj eritroidnih prekursora može se naći u različitim mijeloidnim neoplazmama: mijelodisplaziji (MDS), akutnoj mijeloičnoj leukemiji sa znacima mijelodisplazije (engl. AML-MRC) te u mijeloidnim neoplazmama povezanim s terapijom (engl. t-MN). Također

postoje reaktivna stanja sa značajnom eritroidnom hiperplazijom i skretanjem ulijevo koja morfološki mogu nalikovati mijeloidnim neoplazmama s povećanim brojem eritroidnih prekursora.<sup>1</sup> Unatrag četrdeset godina mijenjale su se klasifikacije i dijagnostički kriteriji koji su zahtijevali izračunavanje broja blasta na ne crvenu lozu kao i na sve stanice u koštanoj srži (Tablica 1).<sup>2</sup>

			Morfološki nalaz u KS	Diseritrocitopoeza	Napomena
Klasifikacija	Godina	Podtip	Eritroidni prekursori	% blasta na ne crvenu lozu	
FAB	1976	AML-M6	≥30%	% blasta na sve stanice KS (≥30%)	≥10%
	1985	AML-M6	≥50%	≥30%	izražena
SZO	2001	eritro/mijelo	≥50%	≥20%	izražena
		čista	≥80%		izražena
SZO	2008	eritro/mijelo	≥50%	≥20%	izražena
		čista	≥80%		izražena
SZO	2016	čista	≥80% ≥30% proobl	≤20% blasta na sve stanice KS	izražena

**Tablica 1. Akutna eritroidna leukemija-klasifikacije i promjene dijagnostičkih kriterija.**

FAB-French-American-British; SZO-Svjetska zdravstvena organizacija; AML/MRC- acute myeloid leukemia with myelodysplasia related changes; t-MN-therapy-related myeloid neoplasms

Tablica preuzeta od Mihova D. Acute Erythroid leukemia: A review. N A J Med.Sci. 2012;5(2):110-118.

Broj blasta potreban za postavljanje dijagnoze akutne eritroidne leukemije u novoj revidiranoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) izračunava se na sve stanice u koštanoj srži, tako se gubi entitet eritroidne/mijeloične leukemije i ostaje samo čista akutna eritroidna leukemija (engl. PEL).<sup>3</sup> Dosadašnje klasifikacije pokazuju nam da se

pomoću malo matematike jedan te isti mijelogram može različito tumačiti i promijeniti citomorfološku dijagnozu.<sup>3,4,5,6</sup>

Pacijent koji u mijelogramu ima 60% eritroidnih prekursora, 18% mijeloblasta i 22% ostalih stanica, ovisno o postotku broja blasta na sve stanice ili na ne crvenu lozu imao bi prema kriterijima iz 1976.

godine refraktornu anemiju s ekscesom blasta (*engl. RAEB*), 1985. godine akutnu mijeloičnu leukemiju-M6, 2001. i 2008. godine akutnu eritroleukemiju (*engl. AEL*) i 2017. godine mijelodisplaziju s ekscesom blasta (eng.MDS-EB).

Usporedba klasifikacija ponukala nas je da reklasificiramo postavljene dijagnoze bolesnika s akutnom eritroidnom leukemijom u periodu od 2008. do 2016. godine prema preporučenim kriterijima SZO-a iz 2016. godine.<sup>3</sup>

## Bolesnici i metode

U istraživanje su uključeni bolesnici kojima je dijagnosticirana akutna eritroidna leukemija na Odjelu za hematološku citologiju, citologiju dojke, urološku citologiju, ORL citologiju, citologiju štitnjače Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC-a Zagreb, u periodu 2008. do 2016. godine.

Svim bolesnicima rađena je punkcija koštane srži iglom za punkciju koštane srži 16Gx30mm (tip Perfectus, Medax, Italija), a uzorak je raspoređen na predmetna stakalca. Učinjeno je standardno bojenje (May-Gruenwald Giemsa, MGG), sedam citokemijskih reakcija (mijeloperoksidaza, Sudan black B, alfa-naftil acetat esteraza s inhibicijom dodatkom natrijevog fluorida, klor acetat estreaza, *Periodic acid shiff*, dokazivanje ekstrahemoglobinskog željeza) i imunocitokemijska analiza (dokazivanje *glycophorina*). Uz svaki uzorak učinjene su kontrolne reakcije na uzorcima pozitivnim za ispitivane analize.

Dijagnoze su postavljene prema preporučenim kriterijima SZO-a 2008. godine, prema kojoj je akutna eritroidna/mijeloična leukemija dijagnosticirana ako je u uzorku nađeno preko 50% eritroidnih prekursora, a broj blasta izbrojen u populaciji ne-eritroidnih stanica iznosi preko 20% stanica; čista eritroidna leukemija dijagnosticirana je pri nalazu više od 80% eritroidnih prekursora. U uzorku mora biti prisutna diseritrocitopoeza, te displazija na manje od 50% stanica unutar jedne ili dvije loze stanica. Iz ovih dijagnostičkih kategorija isključene su AML s multilinijskom displazijom, kao i terapijski uzrokovana AML.

Dijagnoze bolesnika su potom reklasificirane prema preporučenim kriterijima SZO-a 2016. godine: dijagnoza akutne leukemije postavlja se ovisno o postotku blasta unutar populacije svih stanica u koštanoj srži (bez obzira na broj eritroidnih prekursora), a dijagnoza čiste eritroidne leukemije uz nalaz više od 80% eritroidnih prekursora, unutar kojih mora biti više od 30% proeritroblasta; u uzor-

ku mora biti prisutna i diseritrocitopoeza. Iz ovih dijagnostičkih kategorija isključene su AML s multilinijskom displazijom, terapijski uzrokovana AML i AMLnos.

Dvije skupine dijagnoza uspoređene su metoda poredbene statistike.

## Rezultati

U navedenom periodu dijagnosticirana je akutna eritroidna leukemija u 15 bolesnika (12 de novo slučajeva, te 3 iz prethodnog MDS-a). Kod 13 bolesnika ispunjeni su kriteriji za dijagnozu akutne eritroidne/mijeloične leukemije; kod dva bolesnika dijagnosticirana je čista eritroidna leukemija (Tablica 2.). Rezultati su interpretirani uz očekivane nalaže citokemijskih, imunocitokemijskih i kontrolnih reakcija.

Reklasifikacijom prema kriterijima SZO-a 2016. godine kod 9/13 bolesnika s dijagnosticiranom akutnom eritroidnom/mijeloičnom leukemijom dijagnoza je promijenjena u MDS s viškom blasta i multilinijskom displazijom (MDS-EB-MLD); kod bolesnika s dijagnosticiranom čistom eritroidnom leukemijom dijagnoza je ostala nepromijenjena (Tablica 3.).

**Tablica 2. Dijagnoza akutne eritroidne leukemije prema kriterijima SZO-a 2008.**

bolesnik(n)	% blasta	% EP	% blasta/ NEC	citološka dg
1	9	56	20	eritro/mijelo
2	34	51	69	eritro/mijelo
3	10	52	21	eritro/mijelo
4	22	53	47	eritro/mijelo
5	19	67	58	eritro/mijelo
6	12	58	29	eritro/mijelo
7	19	50	38	eritro/mijelo
8	12	51	24	eritro/mijelo
9	32	56	72	eritro/mijelo
10	15	61	38	eritro/mijelo
11	10	66	30	eritro/mijelo
12	10	51	20	eritro/mijelo
13	29	51	59	eritro/mijelo
14	15	81		čista eritroid
15	6	83		čista eritroid

SZO-Svjetska zdravstvena organizacija; Fe-citokemijska analiza ekstrahemoglobinskog željeza; EP-eritroidni prekursori; NEC-non-erytroid cells; dg-dijagnoza; eritro/mijelo-eritroidna-mijeloična leukemija

**Tablica 3. Dijagnoza akutne eritroidne leukemije prema kriterijima SZO-a 2016.**

bolesnik(n)	% blasta	% EP	citoloska dg
1	9	56	MDS-EB-MLD
2	34	51	AML/MRC
3	10	52	MDS-EB-MLD
4	22	53	AMLnos
5	19	67	MDS-EB-MLD
6	12	58	MDS-EB-MLD
7	19	50	MDS-EB-MLD
8	12	51	MDS-EB-MLD
9	32	56	AML/MRC
10	15	61	MDS-EB-MLD
11	10	66	MDS-EB-MLD
12	10	51	MDS-EB-MLD
13	29	51	AML/MRC
14	15	81	čista eritroid
15	6	83	čista eritroid

SZO-Svjetska zdravstvena organizacija; Fe-citokemijska analiza ekstrahemoglobinskog željeza; EP-eritroidni prekursori; NEC-non-erytroid cells; dg-dijagnoza; MDS-mijelodisplastični sindrom; EB-excess blast; MLD-multi lineage dysplasia; AML/MRC- acute myeloid leukemia with myelodysplasia related changes

## Zaključak

Akutna eritroidna leukemija je rijetka bolest. U razdoblju od osam godina u petnaest bolesnika postavili smo dijagnozu akutne eritroidne leukemije tj. najčešće eritroidne/mijeloične leukemije koja se prema kriterijima SZO-a iz 2016.godine u 9/13 bolesnika promjenila u dijagnozu mijelodisplastičnog sindroma s ekscesom blasta. Prikazani rezultati pokazuju sve manjkavosti postavljanja dijagnoze određivanjem postotka blasta na ne crvenu lozu. Pojedine ekspertne grupe pokazale su u radovima da je akutna eritroidna/mijeloična leukemija klinički i biološki slična MDS-EB.<sup>7</sup> Nova klasifikacija SZO-a ponovo je uvela kriterij određivanja postotka blasta na sve stanice u koštanoj srži, što će morfolozima olakšati postavljanje dijagnoze, ukinut je entitet akutne eritroidne/mijeloične leukemije i postavljeni su jasniji kriteriji za dijagnozu „čiste“ akutne eritroidne leukemije.

## Literatura:

- Wang SA, Hasserjian RP. Erythroid proliferations in myeloid neoplasms. Human Pathology 2012;43:153-164.
- Mihova D, Zhang L. Acute Erythroid Leukemia: A Review. N A J of Med Sci 2012;5(2):110-118.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM i sur. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016;127:2395-99.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR i sur. Proposals for the classification of the acute leukaemias: French-American-British (FAB) cooperative group. Br J Haematol 1976;33:451-8.
- Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR i sur. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia: a report of the French-American-British cooperative group. Ann Inter Med 1985;103:620-5.
- Arber DA, Brunning RD, Orazi A, Porwit A, Peterson L, Thiele J, Le Beau MM. Acute myeloid leukaemia not otherwise specified. 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. 130- 39.
- Wang SA, Patel KP, Pozdnyakova O, Peng J, Zuo Z, Dal Cin P. Acute erythroid leukemia with <20% bone marrow blasts is clinically and biologically similar to myelodysplastic syndrome with excess blasts. Modern Pathology 2016;29:1221-1231.

## Chimeric antigen receptor T-cells – od ideje do komercijalno dostupnog proizvoda

Ana Zelić Kerep, dr. med.

Zavod za hematologiju

Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb

E-pošta: azelic987@gmail.com

Još davne 1891. godine kirurg William Coley prepoznao je ulogu imunosnog sustava u liječenju malignih bolesti, kada je uštrcao streptokok u inoperabilni osteosarkom i opazio smanjenje veličine tumora.<sup>1</sup> Nešto kasnije, 1993. godine, izraelski znanstvenik Zelig Eshhar proizveo je prve CAR-T stanice i od tada se bitka znanosti i malignih bolesti vodi na sasvim nov način.<sup>2</sup> Međutim, bila je potrebna ustrajnost mnogih vizionara koji su probijali put novim saznanjima i ustrajali na tom putu, da bismo danas bolesnicima koji inače ne bi imali priliku za život pružili novu nadu i vratili vjeru u znanost. 2001. godine, Barbara i David Netter, nakon što su u obitelji doživjeli tragediju smrti od maligne bolesti, pokrenuli su ACGT – *Alliance for Cancer Gene Therapy*. ACGT je 2008. godine financirao liječenje prva 3 bolesnika s relapsom kronične limfocitne leukemije s CART-19; 2 od 3 bolesnika su postigla kompletну remisiju.<sup>3</sup> Ovaj početni, anegdotični uspjeh doveo je do podrške od strane *National Cancer Institute*, te do slučaja petogodišnje Emily Whitehead, čije je uspješno liječenje ALL postalo simbolom uspjeha CAR-T terapije.

### Mehanizam

*Chimeric antigen receptor T-cell* terapija temelji se na principu adoptivne celularne terapije, koja uključuje ex-vivo genetsku manipulaciju autolognim T limfocitima, bilo lentivirusnim, retrovirusnim ili ne-virusnim mehanizmima transfera gena. Tako se postiže ekspresija rekombinantnog CAR receptora na autolognim T limfocitima, koji su specifični za tumorske antigene, neovisno o HLA. CAR je rekombinantni receptor koji se sastoji od ekstracelularnog jednolančanog varijabilnog fragmenta antitijela (*single-chain variable fragment, scFv*), povezanog s intracelularnim signalizirajućim domenama.<sup>4</sup> Prva generacija CAR sastojala se od ekstracelularnog scFv, CD8 transmembranske domene i intracellularne CD3ζ domene sa slabijim proliferativnim potencijalom. Druga generacija CAR ima dodatni citoplazmatski ko-stimulatorni signal (npr. CD28),

te pri kontaktu s antigenom pruža bolji proliferativni stimulus. Treća generacija ima multiple ko-stimulativne intracelularne signale (CD28, 4-1BB), čime se poboljšao anti-tumorski efekt, proliferacija i vijek modificiranih T-limfocita. Četvrta generacija CAR-T terapije kombinira CAR druge generacije s cito-kinima, ko-stimulatornim faktorima, te enzimima koji razgrađuju ekstracelularni matriks solidnih tumora u svrhu poboljšanja proliferativnog potencijala T-limfocita.<sup>5</sup> Nove verzije tzv. *pametnih* CAR-T su u fazi istraživanja, koje imaju *suicide switch*, sa svrhom smanjenja *off-tumor* toksičnih efekata. FcγCR receptori su također nova strategija liječenja genetski modificiranim stanicama. Naime, za razliku od klasičnog CAR receptora FcγRIIIA ekstracelularna domena (CD16) konstruirana je tako da veže Fc dio egzogeno apliciranih tumor-specifičnih antitijela, što otvara mogućnost za deaktivaciju protutijela ovisno o toksičnosti u svakom trenutku liječenja.<sup>6</sup> Nakon formiranja imunosne sinapse CAR i tumor-skog antigena antitumorska aktivnost posredovana je oslobođanjem perforina, granzima, ekspresijom pro-apoptotičkih liganada, te sekrecijom pro-upalnih citokina (IFNγ, IL2).

### Klinička primjena i toksičnost CAR-T terapije

Osnovni proces liječenja CAR-T terapije započinje leukaferozom bolesnika. Nakon toga se provodi transdukcija T-limfocita CAR transgenom, bilo virusnim ili ne-virusnim vektorom. T-limfociti se aktiviraju, stimulira se proliferacija, i nakon ciklusa kemoterapije leukodepletivnim protokolom infundiraju se autologni genetski modificirani T-limfociti. Ti T-limfociti su tumor-specifični i imaju sposobnost proliferacije. Razni CAR-T produkti imaju različite procese proizvodnje i kondicioniranja bolesnika, no osnovni princip je održan.<sup>7,8</sup> Međutim, toksičnost liječenja CAR-T stanicama je značajna. Sindrom oslobođanja citokina (cytokine release syndrom, CRS) je najučestalija nuspojava terapije.<sup>9</sup> Rezultat je snažne aktivacije imunosnog sustava i masivne sekrecije citokina, pogotovo interferona gama, interleukina 6 i

10, te solubilnog receptora interleukina 2α.<sup>10</sup> Bolesnici s većom tumorskom masom imaju teži CRS. Simptomi mogu biti od blagih do životno ugrožavajućih stanja: vrućica, malaksalost, mučnina, hipotenzija, tahikardija, respiratorni distres, neurološki simptomi i *capillary leak*. U većini slučajeva CRS je samolimitirajućeg tijeka, no diferencijalnodijagnostički predstavlja značajan izazov. Nažalost, u nekim slučajevima može nastupiti i smrt, te je potrebna bliska i koordinirana suradnja s jedinicom intenzivnog liječenja i multidisciplinaran pristup bolesniku, te intenzivno monitoriranje. Prema Lee i suradnicima<sup>10</sup> toksičnost 3. i 4. stupnja zahtijeva liječenje kortikosteroidom i antagonistom receptora IL6 (tocilizumab). Smatra se da pojava CRS-a signalizira terapijski efekt CAR-T, stoga se profilaksa CRS-a ne provodi.

Neurološka toksičnost manifestira se širokim spektrom simptoma: konfuzija, promjene stanja svijesti, afazija, delirij i konvulzije. Mehanizam još uvijek nije u potpunosti jasan, radi li se o manifestaciji CRS-a ili prodiranju CAR-T stanica u središnjem živčanom sustavu. Neurološke nuspojave su u većini slučajeva reverzibilne, no u teškim slučajevima deksametazon se čini od veće koristi nego tocilizumab, koji ne prodire u CNS, a uostalom, ne eliminira IL6, nego samo sprječava vezanje na receptor.

Što se tiče *off-target* toksičnih učinaka, najčešće se radi o aplaziji B-limfocita nakon liječenja CART19, a životno ugrožavajuća stanja mogu se pojaviti u slučajevima kada je ciljni tumorski antigen izražen i u respiratornom sustavu, što je opisano u metastatskom karcinomu kolona.

CARTOX smjernice pružaju okvir za kliničare koji liječe bolesnike ovom terapijom i susreću se s izazovom toksičnih efekata CAR-T.<sup>11</sup>

## Prva odobrenja u Sjedinjenim Američkim Državama

Prvo odobrenje od strane FDA (*Food and Drug Administration*) za CAR-T terapiju 2017. godine bilo je za tisagenlecleucel (CAR specifičan za antigen CD19), za bolesnike mlađe od 25 godina oboljele od relapsne/refraktorne ALL. U kliničkoj studiji na kojoj se temelji odobrenje čak 83% pedijatrijskih bolesnika (ukupno 63 pacijenta) imalo je potpunu eliminaciju malignih stanica 3 mjeseca nakon liječenja CAR-T stanicama.<sup>12</sup> Tisagenlecleucel koristi samoinaktivirajući lentiviralni vektor, a CAR se sastoji od murinog scFv koji prepoznaje CD19, vezan je na CD8α domenu i transmembransku regiju, uz intracellularne kostimulatorne molekule 4-1BB i CD3ζ.

Posebnost ovih CAR-T stanica je u ko-stimulatornoj domeni 4-1BB, jer za razliku od CD28 rezultira preferencijalnom ekspanzijom memorijskih T stanica i duljim vijekom opstanka CAR-T stanica.<sup>13</sup>

Axicabtagene ciloleucel je druga po redu odobrena terapija od strane FDA. Ovaj CAR-T indiciran je u liječenju odraslih bolesnika s relapsnim/refraktornim Non-Hodgkin limfomom (difuzni B-velikostanični, primarni mediastinalni, transformirani folikularni limfom)<sup>14</sup> Ovaj CAR ima CD28 ko-stimulatornu domenu, usmjeren je također na CD19, a u procesu transdukcije koristi se gammaretrovirusni vektor.

Za sada nema odobrenih CAR-T terapija u Europi, a regulatorna tijela i proces imaju svoje posebnosti i izazove. CAR-T stanična terapija u Europi u nadležnosti je *European Medicines Agency's Committee for Advanced Therapies*.<sup>15</sup> CAR-T stanice su genetski modificirane stanice i smatraju se u Europi genetski modificiranim organizmima, te tako moraju biti u skladu s regulativom broj 1394/2007 prema EMA, direktivom 2001/83/EC, 2001/18/EC, te mnogim drugim regulativama, koje se još uvijek moraju uskladiti među državama koje su članice Europske Unije.<sup>8</sup>

## Razvoj komercijalno dostupnih sustava za *point of care* proizvodnju CAR-T i pogled u budućnost

Jedna od zapreka široj primjeni CAR-T liječenja je komplikiran i skup proces proizvodnje samih CAR-T stanica, jer kao što je već opisano, zahtijeva koordinaciju s udaljenim centrima koji imaju tehnološke mogućnosti, ali i standarde prema zahtjevima regulatornih tijela. Taj proces je skup, npr. liječenje tisagenlecleucelom košta 475 000 američkih dolara, što ionako kompleksnu terapijsku opciju čini još većim izazovom. Jedan od načina kojim se pokušava premostiti ovaj problem jest razvoj sustava koji bi omogućili semiautomatiziran proces proizvodnje CAR-T na mjestu liječenja bolesnika, a radi se o CliniMACS Prodigy® sustavu tvrtke Milteny.<sup>16,17,18</sup>

Razvoj liječenja genetski modificiranim stanicama je u punom zamahu<sup>19</sup>, te se nazire i mogućnost korištenja ovog principa liječenja i u poboljšanju učinka grafta protiv leukemije nakon transplantacije hematopoetskim matičnim stanicama.<sup>20</sup>

Liječenje CAR-T stanicama polučilo je ohrabrujuće rezultate. Međutim, za kliničare i sustave pružanja zdravstvene skrbi postavljeni su mnogi izazovi koji zahtijevaju brzu prilagodbu ovom konceptu liječenja, na razini regulatornih tijela, organizacije medicinske skrbi i svakodnevног kliničkog rada.

**Literatura:**

1. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006;26:154-158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789469>. Accessed April 6, 2018.
2. Yang Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest.* 2015;125(9):3335-3337. doi:10.1172/JCI83871.
3. Rosenbaum L. Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy. *N Engl J Med.* 2017;377(14):1313-1315. doi:10.1056/NEJMp1711886.
4. Park JH, Brentjens RJ. Adoptive immunotherapy for B-cell malignancies with autologous chimeric antigen receptor modified tumor targeted T cells. *Discov Med.* 2010;9(47):277-288. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423671>. Accessed April 6, 2018.
5. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol Med.* 2017;9(9):1183-1197. doi:10.1525/ emmm.201607485.
6. Caratelli S, Sconocchia T, Arriga R, et al. FC $\gamma$  Chimeric Receptor-Engineered T Cells: Methodology, Advantages, Limitations, and Clinical Relevance. *Front Immunol.* 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00457.
7. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;53:164-181. doi:10.1016/j.copbio.2018.01.025.
8. Buechner J, Kersten MJ, Fuchs M, Salmon F, Jäger U. Chimeric Antigen Receptor-T Cell Therapy. *HemaSphere.* 2018;2(1):e18. doi:10.1097/HSS.0000000000000018.
9. Badieyan ZS, Hoseini SS. Adverse Effects Associated with Clinical Applications of CAR Engineered T Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* February 2018. doi:10.1007/s00005-018-0507-9.
10. Lee DW, Gardner R, Porter DL, et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood.* 2014;124(2):188-195. doi:10.1182/blood-2014-05-552729.
11. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;15(1):47-62. doi:10.1038/nrclinonc.2017.148.
12. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439-448. doi:10.1056/NEJMoa1709866.
13. Zhang H, Snyder KM, Suhoski MM, et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8+ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. *J Immunol.* 2007;179(7):4910-4918. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878391>. Accessed April 8, 2018.
14. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-2544. doi:10.1056/NEJMoa1707447.
15. Medicines Agency E. Procedural advice on the evaluation of advanced therapy medicinal product in accordance with Article 8 of Regulation (EC) No 1394/2007. 2018. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Regulatory\\_and\\_procedural\\_guideline/2018/02/WC500242957.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2018/02/WC500242957.pdf). Accessed April 8, 2018.
16. Dropulić B. Integration of work flows for the generation of gene-modified cell products. <https://www.asgct.org/ASGCT/media/about/Dropulic.pdf>. Accessed April 8, 2018.
17. CliniMACS Prodigy® System Mastering the complexity of cell processing The art of cellular product manufacturing. <http://www.miltenyi-biotec.com/~/media/Files/Navigation/Clinical%20applications/Clinimacs%20system/CliniMACS-Prodigy-System-Brochure.ashx>. Accessed April 8, 2018.
18. CAR T-Cell Therapy: Where are We Today? - MedCision. <https://www.medcision.com/car-t-cell-therapy-today/>. Accessed April 8, 2018.
19. Yip A, Webster RM. The market for chimeric antigen receptor T cell therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(3):161-162. doi:10.1038/nrd.2017.266.
20. Smith M, Zakrzewski J, James S, Sadelain M. Posttransplant chimeric antigen receptor therapy. *Blood.* 2018;131(10):1045-1052. doi:10.1182/blood-2017-08-752121.

## Kvaliteta života hematoloških bolesnika

**Duška Petranović, Ana Terezija Jerbić Radetić, Antonela Trobentar, Antica Duletić Načinović, Ivan Host, Dragana Grohovac, Neven Franjić, Marija Stanić, Ivana Budisavljević, Aron Grubešić, Toni Valković**

Zavod za Hematologiju, kliničku imunologiju i reumatologiju, KBC Rijeka, Hrvatska

Adresa autora za kontaktiranje:

doc. dr. sc. Duška Petranović, dr. med.

KBC Rijeka, Krešimirova 42, 51000 Rijeka

E-pošta: duskapetranovic@yahoo.com

*“Glede preporuke i savjeta liječnika, jedini način da sačuvam svoje zdravlje jest da jedem ono što ne volim, pijem ono što mi se ne sviđa i da napisljetku radim ono što nikad ne bih radio”.*

*Mark Twain*

Pojam kvaliteta života (engl. *quality of life, QoL*) počeo se koristiti oko 1920. godine u domeni političke ekonomije kako bi se definiralo stupanj blagostanja pojedine osobe ili grupe ljudi te uključuje fizičko blagostanje, obrazovanje, mogućnost zapošljavanja, socijalni status, zdravlje itd. Od 1970-tih počinje se sve više koristiti i u medicini kako bi se procijenila kvaliteta života u odnosu na zdravlje (engl. *health related quality of life, HRQoL*).

Posljednjih desetljeća bilježi se značajan napredak u liječenju zločudnih bolesti. Koriste se novi lijekovi, a izlječenje i preživljivanje sve je duže. Istovremeno je vrlo teško procijeniti da li se osobni ishod kako ga bolesnik percipira (engl. *patient reported outcome, PRO*) razlikuje od procjene povoljnog ishoda na način kako ga definiraju liječnici. Stoga je sve jasnija potreba o prikupljanju podataka o osobnom psihičkom i fizičkom osjećanju bolesnika od samog bolesnika standardiziranim upitnicima.

HRQoL je višedimenzionalni konstrukt koji predstavlja subjektivnu percepciju pozitivnih i negativnih aspekata u vezi sa zločudnom bolešću i njenim liječenje, a uključuje fizičko, emocionalno, socijalno te kognitivno funkcioniranje, simptome bolesti i nuspojave terapije. Ocjena kvalitete života podložna je vrlo subjektivnim kriterijima, a u kočnicici i individualnim razlikama (spol, dob, radna aktivnost, kronične bolesti). Brojni pokušaji definicije kvalitete života mogu se svesti pod zajednički nazivnik koji istu opisuje kao stanje dobrog osjećanja koje se sastoji iz dvije komponente: sposobnosti

izvršavanja svakodnevnih aktivnosti te bolesnikovog subjektivnog zadovoljstva razinom funkciranja i kontrolom bolesti.

Do pred 20 godina vrlo se rijetko govorilo o kvaliteti života, no danas 10% svih randomiziranih kliničkih studija uključuju HRQoL kao glavni cilj (ne više sekundarni). Čak je i FDA (engl. *Food and Drug Administration*) prepoznala važnost HRQoL-a te će u budućnosti dopuštenja za mnoge protutumorске lijekove uključivati i analizu njihovog utjecaja na kvalitetu života. Međutim, uvođenje mjerjenja HRQoL-a još uvijek se teško prihvata u svakodnevnoj praksi. Danas postoji preko 500 upitnika, skala i bodovnih ljestvica za procjenu općeg tjelesnog stanja bolesnika, a najčešće rabljene su Karnofskyjeva ljestvica i Zubrodova ljestvica (ECOG). Zamjerka kliničara i svojevrsni otpor prema prikupljanju ovih podataka su: subjektivnost procjene, znanje kako interpretirati upitnike, pitanje korisnosti u kliničkoj praksi i najveća zapreka: nedostatak vremena za prikupljanje upitnika.

Istraživanja su pokazala da kliničari značajno podcjenjuju razinu fizičkog funkcioniranja bolesnika, a simptome koje bolesnik smatra izrazitim, liječnici ne referiraju. Dokazano je čak, da što su gori bolesnikovi simptomi, manja je vjerojatnost da će ih kliničar prepoznati i procijeniti kao teške. Fish i suradnici su kod 163 onkološka bolesnika usporedili isti upitnik koji su ispunili bolesnici i liječnici u isto vrijeme, no samo 54% procjene od strane liječnika bilo je u skladu s bolesnikovom procjenom<sup>1</sup>. Upravo iz tog razloga, danas je standardna praksa procjena od strane bolesnika (PRO, engl. *patient reported outcome, PRO*). Takva multidimenzionalna procjena kvalitete života je subjektivna i promjenjiva te uključuje tri komponente zdravlja: tjelesnu (umor, bol, pokretljivost i svakodnevna aktivnost), psihološku (raspoloženje, depresija, pril-

godba na bolest) te socijalnu (ekonomski, socijalne poteškoće i obiteljski odnosi).

Izbor instrumentarija kojim bi se kvantificirala kvaliteta života vrlo je važan radi osjetljivosti i preciznosti mjerjenja. Jedan od često korištenih standardiziranih, evaluiranih i osjetljivih instrumenata (upitnika) je opći upitnik za onkološke/hematološke bolesnike - EORTC QLQ-C30. Zaštićen je autorskim pravima, preveden i ovjeren na preko 80 jezika, a koristi se trenutno u više od 3000 studija širom svijeta. Novija verzija (QLQ - C30 3.0) dopunjena je modulima specifičnim za odredene bolesti a u tijeku je 4. faza validacije upitnika na hrvatskom jeziku za zločudne tumore limfocita (Hodgkinov limfom-EORTC QLQ-HL27, ne Hodgkinov limfom visokog i niskog stupnja malignosti, EORTC QLQ-NHL-HG29, EORTC QLQ-NHL-LG20 te kroničnu limfocitnu leukemiju, EORTC QLQ-CLL17). Od ranije su u upotrebi upitnici za multipli mijelom (EORTC QLQ- My20) koji su se pokazali izuzetno osjetljivi u kliničkim ispitivanjima novih efikasnih lijekova za liječenje ove bolesti. Osim specifičnih modula za pojedine zločudne bolesti, postoje i specifični upitnici za pojedine aspekte kvalitete života kao što su npr. kognitivne funkcije-Functional Assessment of Cancer Therapy Cognitive function (FACT-COG), anemiju (FACT-An), anksioznost i depresiju – HADS (Hospital and Anxiety Depression Scale), informiranost bolesnika (EORTC QLQ-Info25) i sl.

Relativno je malo QoL studija u bolesnika s hematološkim zločudnim bolestima (u odnosu na solidne tumore). Prema Morrisu, 80% onkologa smatra da HRQoL upitnici trebaju biti prikupljeni od bolesnika, dok samo oko 50% misli da je to provedivo u praksi. Kao glavni problem navode limitirano vrijeme i financiranje<sup>2</sup>. Bezjak i suradnici ispitali su 357 kliničara te došli do zaključka da 84% misli da je njihovo znanje o HRQoL-u ograničeno iako 82% smatra podatke HRQoL-a adekvatnim i prikladnim za liječenje bolesnika. Iz svega autori zaključuju da bi uz više specifičnih saznanja kliničari češće koristili HRQoL upitnike<sup>3</sup>.

S obzirom na to da liječenje hematoloških zločudnih bolesti postaje sve uspješnije, cilj liječenja neće više biti usmjeren samo na kontrolu bolesti i produženje života već i na maksimalno poboljšanje kvalitete života u svim njegovim aspektima, u čemu će osim liječnika sudjelovati i interdisciplinarni tim posebno educiranih stručnjaka (pravnik, ekonomista, psiholog, statističar, nutricionist, sportski trener i brojni drugi). Ako pacijent tako dobije podršku u segmentu života koji je za njega osobno najvažniji

imat će dobru kvalitetu života i bolji ishod ukupnog liječenja<sup>4</sup>.

#### Literatura:

1. Fisch MJ, Titzer ML, Kristeller JL, Shen J, Loehrer PJ, Jung SH, Passik SD, Einhorn LH.: *Assessment of quality of life in outpatients with advanced cancer: the accuracy of clinician estimations and the relevance of spiritual well-being--a Hoosier Oncology Group Study.*; J Clin Oncol. 2003 Jul 15;21(14)
2. Morris J, Perez D, McNoe B: *The use of quality of life data in clinical practice*; Quality of Life Research, January 1997, Volume 7, Issue 1, pp 85–91
3. Bezjak A, Ng P, Skeel R et al.: *Oncologists' use of quality of life information: Results of a survey of Eastern Cooperative Oncology Group physicians*; Quality of Life Research, January 2001, Volume 10, Issue 1, pp 1–14
4. Effiece F, Gaidano G, Lo-Coco F: *Patient-reported outcomes in hematology: is it time to focus more on them in clinical trials and hematology practice?*; Blood. 2017 Aug 17;130(7)

## Pet godina Multidisciplinarnog tima za kroničnu bolest presatka protiv primatelja KBC Zagreb

**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 Čeović<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 Kelečić<sup>9</sup>, Tamara Vukić<sup>10</sup>, Tajana Klepac Pulanić<sup>11</sup>, Branimir Ivan Šepet<sup>4</sup>, Marko Barešić<sup>12</sup>, Irena Karas<sup>9</sup>, Ljubica Rajić<sup>6</sup>, Toni Matić<sup>6</sup>, Davorka Dušek<sup>13</sup>, Nina Šaban<sup>14</sup>, Ema Prenc<sup>14</sup>, Lejla Kurić<sup>15</sup>, Antonija Babić<sup>15</sup>, Ivana Ilić<sup>16</sup>, Violeta Rezo Vranješ<sup>17</sup>, Zlatko Giljević<sup>18</sup>, Milan Milošević<sup>19</sup>, Maja Pučić Baković<sup>20</sup>, Magdalena Grce<sup>21</sup>, Gordan Lauc<sup>20</sup>, Renata Zadro<sup>15</sup>, Drago Batinić<sup>15</sup>, Radovan Vrhovac<sup>2</sup>, Steven Živko Pavletić<sup>22</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 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>Odjel za kliničku prehranu Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>10</sup>Klinički zavod za rehabilitaciju i ortopedска 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>Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <sup>15</sup>Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>16</sup>Klinički zavod za patologiju i citologiju KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>17</sup>Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb, <sup>18</sup>Zavod za endokrinologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, <sup>19</sup>Škola narodnog zdravlja Andrija Štampar i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagreb, <sup>20</sup>Genos, <sup>21</sup>Institut Ruđer Bošković, <sup>22</sup>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

E-pošta: dpulanic@yahoo.com

Prepoznavši sve izraženiji problem kronične bolesti presatka protiv primatelja (eng. *Chronic Graft versus Host Disease - cGVHD*), najvažnije kasne komplikacije nakon transplantacije alogeničnih krvtovnih matičnih stanica (aloTKMS), 2013. godine je u KBC Zagreb formiran Multidisciplinarni tim za liječenje cGVHD-a i dugotrajnih komplikacija nakon aloTKMS-a pod vodstvom prof. dr. Nemeti i u suradnji s prof. dr. Pavletićem iz National Cancer Institute (NCI), NIH, SAD, uz projektnu potporu fonda „Jedinstvo uz pomoć znanja“ (eng. *Unity Through Knowledge Fund, UKF*). Taj UKF-ov međunarodni projekt pod nazivom “*Clinical and biological factors determining severity and activity*

of chronic Graft-versus-Host Disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“ trajao je dvije godine (2013.-2015. g.) a vodili su ga prof. dr. Pavletić i prof. dr. Nemet. Projekt je završio sa znanstvenim i stručnim uspjesima a uspostavljeni Multidisciplinarni tim nastavio je dalje vrlo aktivno s radom, u suradnji niza kliničara i laboratorijskih istraživača različitih specijalnosti. Nakon odlaska prof. Nemeti u mirovinu, od listopada 2016. Multidisciplinarni tim za liječenje cGVHD-a i dugotrajnih komplikacija nakon aloTKMS-a nastavlja voditi doc. dr. Pulanić (Slika 1.).



**Slika 1. Multidisciplinarni tim za liječenje cGVHD-a i dugotrajnih komplikacija nakon aloTKMS-a KBC Zagreb (9. listopada 2017.).**

Formiranjem Multidisciplinarnog tima postigao se ujednačen i standardiziran pristup bolesnicima s cGVHD-om nakon aloTKMS korištenjem najsuvremenijih NIH kriterija uz detaljne kliničke i laboratorijske evaluacije, uz međunarodnu aktivnost i suradnju, te znanstvenu produkciju koja se očitovala brojnim kongresnim priopćenjima i publikacijama. Između ostalog, članovi tima su aktivno sudjelovali na najznačajnijim međunarodnim (EBMT, ASH, ASBMT BMT Tandem Meetings, EHA) i domaćim znanstvenim hematološkim kongresima i sastancima s 35 kongresnih priopćenja (poster i oralne prezentacije). Znanstvena aktivnost članova tima rezultirala je i s devet radova o cGVHD-u u časopisima indeksiranim u CC/SCI, a još nekoliko je u pripremi. Također je tiskan posebni tematski broj časopisa *Croatian Medical Journal* posvećen cGVHD-u, u kojem je sudjelovalo više inozemnih kolega sa svojim radovima, uz domaće stručnjake. Više članova Multidisciplinarnog tima KBC Zagreb tijekom ovih pet godina postalo je međunarodno prepoznato u dijelu cGVHD-a kojim se uže bave (publikacijama i aktivnim sudjelovanjem na međunarodnim sastancima), poput primjerice prof. dr. Mravak-Stipetić (oralni cGVHD), prof. dr. Ervine Bilić (neuropatijska cGVHD), prof. dr. Čeović (kožni cGVHD), dr. sc. Perić (kvaliteta života u cGVHD), dr. sc. Bojanić i dr. Mazić (trombocitni gel), dr. sc. Vukić (lokomo-torne smetnje u cGVHD), te doc. dr. Petričeka (očni cGVHD).

Kronični GVHD postaje atraktivna tema za izradu doktorske disertacije, kao i diplomskih radova. Tako trenutno tri studenta Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu rade na doktorskoj disertaciji iz područja cGVHD-a (Ema Prenc, dipl. ing. biol., mentor doc. Pulanić/komentor prof. Pavletić, Branimir Ivan Šepc, dr. med., spec. neurologije, mentor prof. dr. Ervina Bilić/komentor doc. Pulanić, te mr. sc. Tajana Klepac Pulanić, dr. med., spec. ginekologije i opstetricije, mentor prof. dr. Orešković/komentor prof. Pavletić), a nekoliko dodiplomskih studenata izrađuju diplomske radove iz područja cGVHD-a. Na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu doktorsku disertaciju iz područja cGVHD-a radi Dina Ljubas Kelečić, dipl. farmaceut (mentor prof. Krznarić/komentor prof. Vitali Čepo).



Od ožujka 2017. započeo je novi četverogodišnji znanstveni projekt Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) "Novi biomarkeri kronične bolesti presatka protiv primatelja" čiji je voditelj doc. dr. Dražen Pulanić. U tom novom projektu HRZZ-a važnu ulogu

imaju laboratorijski pod vodstvom prof. dr. Drage Batinica, prof. dr. Renate Zadro i prof. dr. Gordana Laca. Naime, u sklopu tog projekta HRZZ-a istražuju se potencijalni laboratorijski biomarkeri cGVHD-a (stanične populacije (B limfociti, monociti), koagulačni faktori (FVIII, von Willebrandov faktor), pokazatelji inflamacije, glikozilacija imunoglobulina G), uz nastavak multidisciplinarnog sveobuhvatne kliničke evaluacije bolesnika s cGVHD-om, kako bi se osigurala najpreciznija usporedba kliničkog stava bolesti s laboratorijskim nalazima.

Za istaknuti je da je ove godine po prvi puta održan predmet o kroničnom GVHD-u (voditelji prof. Pavletić i doc. Pulanić) na Poslijediplomskom studiju iz hematologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, što je vjerojatno jedinstvena pojava u svijetu. Time se nove generacije hematologa Hrvatske sustavno educiraju u području cGVHD-a (Slika 2.), a predmet je podijelio prvo mjesto najbolje ocijenjenih predmeta Poslijediplomskog studija iz hematologije (zajedno s još tri predmeta) prema ocjenama studenata, budućih hematologa.



*Slika 2. Studenti i predavači predmeta o kroničnom GVHD-u na Poslijediplomskom studiju iz hematologije u Zagrebu zajedno s članovima Multidisciplinarnog tima (15. ožujka 2018.).*

Međunarodna znanstvena i edukativna aktivnost u području kroničnog GVHD-a rezultirala je i orga-

nizacijom tri vrlo uspješna Međunarodna simpozija o kroničnom GVHD-u održana u Zagrebu u stude-



*Slika 3. Fotografije s tri međunarodna simpozija o cGVHD-u u Zagrebu, 2013.-2016.*

nom 2013., svibnju 2015. i rujnu 2016. godine (organizatori prof. Nemet i prof. Pavletić) gdje je sudjelovalo mnogo vrhunskih međunarodnih i domaćih stručnjaka iz područja kroničnog GVHD-a (Slika 3.). Ove godine organiziramo novi, četvrti Međunarodni simpozij o cGVHD u studenome 2018., ovaj put kao

zajednički sastanak s Radnom skupinom za komplikacije transplantacije EBMT-a (4th International Chronic GvHD Symposium and EBMT Transplant Complications Working Party Educational Course Joint Meeting) (Slika 4.).



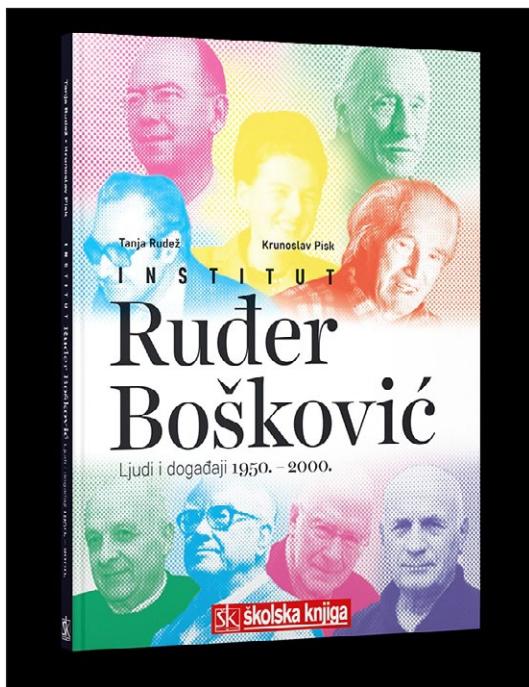
*Slika 4. Najava novog simpozija u Zagrebu (4th International Chronic GvHD Symposium and EBMT Transplant Complications Working Party Educational Course Joint Meeting), 8.-10.11.2018.*

U zaključku, već pet godina postojanja i djelovanja Multidisciplinarnog tima za liječenje cGVHD-a i dugotrajnih komplikacija nakon aloTKMS-a KBC Zagreb osiguralo je detaljni i ekstenzivni pristup tim diferentnim bolesnicima koristeći najsuvremenije svjetske NIH cGVHD standarde. Ovakav pristup omogućio je ne samo napredak u njihovom liječenju, već i suradnju zagrebačkog centra s drugim europskim i američkim institucijama i skupinama

koje se bave cGVHD-om, s aktivnim utjecajem na znanost i struku te pozicioniranje KBC Zagreb na jedno od vodećih mjeseta u Europi u ovom važnom biomedicinskom području. Za očekivati je da će novi projekt HRZZ-a od 2017. godine doprinijeti daljnjem razvoju Multidisciplinarnog tima, okupljujući naše najvrsnije kliničare i laboratorijske stručnjake u području cGVHD-a.

## Kako su znanstvena postignuća na Institutu Ruđer Bošković dovela do prvog presađivanja koštane srži u Hrvatskoj (sjećanja Milivoja Boranića)

(Uz odobrenje izdavača preuzeto iz knjige T. Rudež, K. Pisk, „Institut Ruđer Bošković - Ljudi i događaji 1950. - 2000.“, Školska knjiga, Zagreb, 2017.)



Milivoj Boranić prisjeća se kako je pred kraj studija medicine, kao stipendist Instituta Ruđer Bošković počeo povremeno dolaziti u Institut kako bi se upoznao s poslovima koji su ga očekivali kad završi studij i odsluži vojsku. Ruđerov je stipendist postao na poticaj Nikše Allegrettija, jednoga od utemeljitelja Biološkog odjela Instituta, a zatim i njegova predstojnika. Iako je očekivao da će raditi s Allegrettijem, svojim profesorom i mentorom na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, Boranić je »prekomandiran« jednom od stalnih suradnika IRB-a, Veljku Stankoviću koji je po struci bio veterinar te je do dolaska u Institut radio kao docent u Zavodu za patofiziologiju na Veterinarskom fakultetu. – Stanković je bio fin i obrazovan gospodin, estet i ljubitelj književnosti koji je uz znanost imao i literarne težnje. Kao pretpostavljeni bio je ugodan i demokratičan. Prema tome, nisam trebao biti nezadovoljan prekomandom, ali ipak sam bio razočaran, pa i povrijeđen, tim prije što je moj dotadašnji mentor uzeo za asistente dvojicu kolega s kojima dotada nije surađivao – prisjetio se Milivoj Boranić svojega dolaska na Institut Ruđer Bošković na kojem je

proveo cijeli radni vijek. Na području eksperimentalnog presađivanja koštane srži Boranić je postigao velik međunarodni ugled, pokazavši besprijekorno izvedenim eksperimentima da kontrolirana reakcija presađenih stanica koštane srži protiv primatelja uništava stanice leukemije. To je načelo poslije potvrđeno i primjenjuje se u kliničkoj praksi.

– Biološki odjel Instituta Ruđer Bošković bio je u to doba, 1960. godine, smješten na trima lokacijama: u barakama na južnom kraju institutskog kompleksa na Horvatovcu (ondje su i danas neki biomedicinski laboratoriji), u suterenskoj zgradbi blizu ciklotronskog uređaja (ondje su danas laboratorijski za istraživanje okoliša) te dijelom u paviljonima za fiziku i kemiju. Barake u kojima je počela moja znanstvena karijera i u kojima sam proveo glavni dio svojega radnog vijeka bile su izgrađene potkraj Drugoga svjetskog rata (oko 1944. godine) i služile su kao stacionar za oporavak njemačkih ranjenika. Kad je desetak godina poslije na Horvatovcu počela gradnja 'atomskog' instituta za istraživanje fizičkih, kemijskih i bioloških oblika proizvodnje i iskorištanja nuklearne energije i radioaktivnog materijala, barake su trebale poslužiti za smještaj pokusnih životinja na kojima će se proučavati biološki učinci zračenja i mogućnosti zaštite – rekao je Boranić.

Budući da paviljon biološkoga odjela nije izgrađen, laboratorijski za biološka i biomedicinska istraživanja na pokusnim životinjama smješteni su u barake, zajedno s pokusnim životinjama, a laboratorijski za istraživanja na bakterijama i staničnim kulturama porazmješteni su po drugim paviljonima. – U barakama je postojao mali zoološki vrt – štakori, miševi, zamorčad, kunići, kokoši, žabe. Kako su istraživački laboratorijski, pa i kabineti za studijski rad bili pod istim krovom s nastambama za životinje, atmosfera u njima nije bila nimalo 'znanstvena' niti 'elitna'. Laboratorijski su bili mračni, neugledni, nagrđeni velikim zidanim koritima duž zidova jer su smješteni u prostorije koje su isprva bile namijenjene pranju životinjskih kaveza. To je, dakle, bio 'elitni znanstveni institut' u kojem će se posvetiti 'eksperimentalnoj medicini'. Nimalo ohrabrujuća nisu bila ni prva poznanstva s budućim kolegama. Nijednog medicinara, samo biolozi, kemičari, farmaceuti, veterinari... A opći ugodaj sumoran i tjeskoban – prisjetio se Boranić.

Njegov mentor Veljko Stanković nedavno se vratio iz Nizozemske gdje je proveo nekoliko mjeseci u jednom od najuglednijih radiobioloških laboratorija i upoznao se s presađivanjem koštane srži u pokušnih životinja. Presađivanje koštane srži bilo je u to doba »hit« jer se tim postupkom pokušavalo obnoviti krvotvorno tkivo uništeno nuklearnim zračenjem.

– Ugledni francuski hematolog Georges Mathé pre-sadio je koštanu srž zdravih davatelja petorici znanstvenika iz nuklearnog instituta u Vinči koji su se ozračili zbog tehničke pogreške u radu. Pokušao je i liječiti bolesnike od leukemije ozračivanjem cijelog tijela (kako bi se uništile leukemijske stanice) i presađivanjem koštane srži zdravih davatelja – kazao je Boranić.

Istaknuo je kako su Mathéova pionirska nastojanja bila bez većeg uspjeha jer se u to doba još nije raspolagalo postupcima za utvrđivanje podudarosti primatelja i davatelja, pa su presadci bivali odbačeni zbog imunoreakcije primatelja na tuđe antigene, ili su pak svojom imunoreakcijom oštećivali tkiva primatelja. – U stručnom su žargonu te komplikacije nazvane reakcijama ‘primatelja protiv presatka’ (engl. *host-versus-graft*) odnosno ‘presatka protiv primatelja’ (engl. *graft-versus-host*). Istraživanja su bila usmjereni na uklanjanje tih preprjeka, ponajprije reakcije presatka protiv primatelja koju je Mathé slikovito opisao kao ‘kamen spoticanja’ (engl. *stumbling block*) – objasnio je Boranić.

Iz Nizozemske je Veljko Stanković donio otiske znanstvenih radova i laboratorijskih priručnika tamošnjih istraživača u kojima je bio opisan postupak presađivanja koštane srži u miševa – od prikupljanja srži iz bedrenih kostiju davatelja do injiciranja dobivenih stanica u repnu venu ozračenih primatelja. – Dao mi je osnovnu literaturu, nekoliko svojih bilježaka i postavio zadatak da tehniku presađivanja koštane srži miševima uvedem u laboratorijsku praksu. Područje presađivanja koštane srži bilo je tema mojega magistarskog rada i disertacije koje sam obranio na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 1963., odnosno 1965. godine. Rezultati su objavljeni u nekoliko skromnih znanstvenih radova u domaćim časopisima. Slabo u usporedbi s vršnjacima koji su, zahvaljujući svojim mentorima, doktorirali godinu-dvije prije mene (bez pohađanja poslijediplomskog studija i bez izrade magistarskog rada) i koji su objavljivali prve znanstvene radove u inozemnim časopisima – rekao je Boranić.

Kako su mogućnosti daljnog rada na području presađivanja koštane srži u Institutu bile ograničene, ponajprije zbog nedostatka miševa s leukemi-

jom, trebalo se ogledati za mogućnošću odlaska u inozemstvo. – Početkom i sredinom šezdesetih godina bilo je ‘in’ odlaziti na usavršavanje u SAD, a ne u europske zemlje jer su američke znanstvene institucije uživale veći ugled od europskih, a i plaća je tamo bila bolja. Stipendije za postdoktorsko usavršavanje pribavljali su u pravilu mentori, pa se i ja obratih svojem mentoru Veljku Stankoviću. Kako je on bio na studijskom boravku u Radiobiološkom institutu u Rijswijku u Nizozemskoj i ondje stekao prijatelje, predložio je da se natječem za stipendiju Međunarodne agencije za atomsku energiju (International Atomic Energy Agency, IAEA) koja bi mi omogućila odlazak u Rijswijk. Iako je institut u Rijswijku u to doba bio jedan od vodećih europskih, pa i svjetskih znanstvenih instituta za istraživanja u području radiobiologije i presađivanja (uključujući i eksperimentalno presađivanje koštane srži u miševa, štakora i majmuna), taj me prijedlog nije baš oduševio jer se usavršavanje u europskim ustanovama držalo drugorazrednim – ispričao je Boranić.

Rijswijski institut bio je sastavnica velike mreže nizozemskih državnih ustanova za fundamentalna i primijenjena istraživanja u području prirodnih znanosti, sredinom 1960-ih na njemu je radilo tridesetak znanstvenika i stotinjak tehničara i pomoćnog osoblja, a glavna je zadaća bila istraživanje bioloških učinaka ionizirajućeg zračenja te zaštite od njega, uključujući i presađivanje koštane srži. – U Institutu sam ‘dodijeljen’ Marcu de Vriesu, po struci patologu koji je znatno pridonio poznavanju patologije reakcije presatka protiv miševa u pokušnih životinja. Povremeno su mi pomogli savjetom ili upućivanjem na relevantne znanstvene članke ravnatelj Instituta prof. Dirk Van Bekkum i drugi, a de Vries i interpretacijom histoloških nalaza. Inače sam opet bio ‘sam svoj majstor’. Domaćini su, dakle, bili vrlo koraktni, nisu me iskoristili kao radnu snagu za svoje projekte što je i razumljivo jer nisam bio zaposlenik Instituta već stipendist IAEA, štoviše, stipendija je uključivala i sredstva za pokriće troškova rada koja su se plaćala ustanovi domaćina – kazao je Boranić.

Glavni cilj njegova odlaska na znanstveno usavršavanje u Nizozemsku bio je provjeriti (i po mogućnosti dokazati) pretpostavku da se reakcijom presatka protiv primatelja mogu uništiti stanice leukemije. Nakon presađivanja nepodudarne koštane srži u ozračene primatelje razvija se reakcija presatka protiv primatelja jer imunoreaktivne stanice koje se nalaze u presatku koštane srži prepoznaju tkiva primatelja kao sebi strana i reagiraju na njih. – Već sam u Zagrebu počeo istraživati postupke kojima

bi se spriječila ili ublažila reakcija presatka protiv primatelja. Stoga sam primijenio aktivnu ili pasivnu imunizaciju primatelja protiv presađivačkih antigena davatelja. Aktivna se imunizacija provodila tako da su budući primatelji *prije ozračivanja i presađivanja* u trbušnu šupljinu ili pod kožu primali stanicu budućih davatelja, a za pasivnu se imunizaciju upotrebljavao serum tako cijepljenih miševa koji se injicirao primateljima *nakon ozračivanja i presađivanja* – rekao je Boranić.

Rijswijski je institut raspolagao dvama mišjim sojevima koji su mogli poslužiti kao odgovarajući pokusni modeli jer su obolijevali od leukemije kad bi im se ucijepile leukemijske stanice miševa koji su već imali leukemiju. Bili su to bijeli miševi visoko-srođenih sojeva RF i A. – Posebno svojstvo miševa RF i A bilo je da su imali leukemiju. Miševi soja RF obolijevali su od mijeloidne, a miševi soja A od limfoidne leukemije. Životinje ne obolijevaju od leukemije spontano nego se bolest prenosi, točnije presađuje, s oboljelih životinja na zdrave ubrizgavanjem leukemijskih stanica prikupljenih iz povećane slezene ili limfnih čvorova u repnu venu. Može se prenosi i s pomoću virusa. Sve uginule miševe savjesno sam obducirao, uzimao uzorke krvi za bakteriološku pretragu i djeliće različitih tkiva za histološke preparate. Temeljito sam upoznao makroskopske i mikroskopske značajke leukemije, reakcije presatka protiv primatelja, aplazije krvotvornog tkiva. Nalaze sam upisivao u dnevниke rada i u odgovarajuće formulare te dokumentirao fotografijama makroskopskih i mikroskopskih promjena – prisjetio se Boranić koji je nakon gotovo dvije godine mukotrpnog rada i brojnih razočaranja ostvario željeni cilj: uništiti leukemiju s pomoću kontrolirane reakcije presatka protiv primatelja.

– Preostalo je dobivene rezultate uobličiti u znanstveni rad i objaviti. Uz preporuke Van Bekkuma i de Vriesa rad je poslan u ugledan američki znanstveni časopis *Journal of the National Cancer Institute* a ja sam ‘spakirao kofere’ i vratio se u Zagreb, nestrpljivo očekujući odgovor uredništva. Nakon otprilike mjesec dana stiže pozitivan odgovor – rad je prihvaćen uz minimalne izmjene. Moram napomenuti da su moji nizozemski domaćini, Van Bekkum i de Vries, postupili iznimno korektno jer se nisu ‘supotpisali’ na rad, iako je ostvaren u njihovoj ustanovi i s pomoću njihovih savjeta. Tako su odlučili jer sam doista posve samostalno obavio sve pokuse i pisanje rada, a osim toga nisam bio zaposlenik njihova instituta nego stipendist Međunarodne agencije za atomsku energiju – ispričao je Boranić.

Njegov je rad pobudio veliku pozornost znanstvenih krugova. – Dobio sam brojne potražnice za posebnim otiscima (separatima) članka i pozive da održim predavanja na znanstvenim skupovima i u znanstvenim ustanovama. Posebno je velika čast bila poziv Georges Mathéa da ubrzo nakon povratka iz Rijswijka u Parizu održim plenarno predavanje na međunarodnom skupu posvećenu presađivanju koštane srži. Taj me poziv toliko uzbudio da sam u Pariz oputovao ne ponijevši dijapozitive s prikazom rezultata! Nasreću, moje predavanje nije bilo predviđeno za prvi dan, pa mi iz Zagreba žurnom dostavom poslaše zaboravljene dijapozitive. Stigli su sat-dva prije predavanja! – prisjetio se Boranić.

Još i prije nego što je njegov rad objavljen, informacija o mogućnosti liječenja leukemije reakcijom presatka protiv primatelja koja se kontrolira s pomoću ciklofosfamida i zatim prekida transfuzijom krvi i koštane srži sukladne s primateljem dospjela je u stručne krugove u Nizozemskoj. – Na preporuku ravnatelja Rijswijskog instituta Van Bekkuma zatraže razgovor sa mnom dvojica braće blizanaca od kojih je jedan bolovao od uznapredovalog stadija mijeloidne leukemije. Željeli su da svoj eksperimentalni postupak primijenim na liječenje oboljelog bližanca. To jest, bolesniku bi se presadila koštana srž nesrodne osobe, a reakcija presatka protiv primatelja kontrolirala bi se ciklofosfamidom i završila transfuzijom krvi i presađivanjem koštane srži zdravoga blizanca. Braća su bila uporna, uvjeravala me da preuzimaju na sebe svu odgovornost glede primjene eksperimentalnog i dotada klinički neprovjerenog postupka, ali ja sam jednako uporno odbijao to učiniti. Bilo je to zato što je postupak još bio u strogo eksperimentalnoj fazi i nije bio provjeren odgovarajućim pretkliničkim pokusima na većim životinjama. Osim toga, bio sam u stranoj zemlji i nisam imao kliničko iskustvo s presađivanjem koštane srži. Etička načela nisu dopuštala poduzimanje tako rizična pothvata i u tim okolnostima – ispričao je Boranić.

Poslije je načelo liječenja koje je dokazao svojim eksperimentima provjereno u uglednim znanstvenim ustanovama u pokusima na psima i majmunima, a zatim je primijenjeno i u preliminarnim kliničkim pokušajima. Ali veća je primjena izostala zbog dva razloga. Prvo, pouzdana kontrola reakcije presatka protiv primatelja s pomoću imunosupresivnih lijekova nije se mogla postići u ljudi. Drugo, postupak je primijenjen u bolesnika čija je bolest bila u uznapredovalu stadiju tako da nisu mogli podnijeti zahtjevnije zahvate. S druge strane, klinička primje-

na transplantacije koštane srži u bolesnika od leuke mije pošla je upravo suprotnim smjerom, to jest u smjeru što potpunijeg izbjegavanja reakcije presatka protiv primatelja.

– U to se doba, sredinom šezdesetih godina, zahvaljujući radu Jeana Dausseta, Jana Van Rooda i drugih uglednih istraživača, uvelike razvilo poznavanje transplantacijskih antigena, pa se u presađivanju organa i tkiva počelo težiti postizanju maksimalne tkivne podudarnosti primatelja i davatelja. Razvijeni su paneli dijagnostičkih seruma s pomoću kojih se (i danas) prepoznaju transplantacijski antigeni na uzorcima leukocita iz periferne krvi. Načelo maksimalne podudarnosti primatelja i davatelja počelo se najprije primjenjivati pri presađivanju ‘solidnih’ organa (bubrega, jetre) kako bi se spriječilo njihovo odbacivanje (tj. reakcija primatelja *protiv presatka*), a ubrzo je uključilo i presađivanje koštane srži (dakle stanica) kako bi se spriječila reakcija presatka *protiv primatelja*. Na nekoliko međunarodnih skupova pokušao sam polemizirati s ‘velikim’ Janom Van Roodom, tvrdeći da ublažavanje reakcije presađenih stanica koštane srži protiv primatelja podrazumijeva gubitak antileukemijskog učinka, ali moje je mišljenje bilo usamljeno. U kliničkom presađivanju koštane srži težilo se maksimalnom izbjegavanju nepodudarnosti primatelja i davatelja kako bi se reakcija presatka protiv primatelja spriječila već u začetku – objasnio je Boranić.

Nakon povratka u Zagreb on je nastavio s istraživanjima na području presađivanja koštane srži i reakcije presatka protiv primatelja, nastojeći razjasniti vremenske i kvantitativne oblike te reakcije. – Zahvaljujući ugledu koji sam stekao svojim eksperimentalnim radom te stručnim i prijateljskim veza ma s inozemnim kolegama koje su se uspostavljale na znanstvenim skupovima, mogao sam se, između ostalog, upoznati s mnogim istraživačkim centrima u SAD-u – od Baltimorea na istoku do Seattlea na zapadu i Houstona na jugu. Moj eksperimentalni rad nije, međutim, više pobuđivao onoliko zanimanje znanstvene zajednice kao prethodno ‘bestselsko’ otkriće mogućnosti kontrole reakcije presatka protiv primatelja. Interes znanstvenog establišmenta bio je pretežno usmjeren k izbjegavanju reakcije presatka protiv primatelja biranjem što podudarnijeg davatelja i ‘pročišćivanjem’ presatka. S tim se nisam slagao – istaknuo je Boranić koji je tijekom cijele svoje karijere pokušavao povezati znanstveni rad i kliničku praksu.

– Nakon višegodišnjeg iskustva s presađivanjem koštane srži u pokusnih životinja osjećao sam potre-

bu da svoj rad proširim i na kliničku primjenu tog postupka. Toj su želji pridonijeli mnogi kontakti s inozemnim kolegama kliničarima na znanstvenim i stručnim skupovima. Ali u domovini to još nije bilo moguće jer nisu postojali potrebni uvjeti stručnjaka i infrastrukture – to jest, nije bilo kliničara hematologa koji bi htjeli svoje znanje i ugled uložiti u opasan pothvat o kojemu nisu dovoljno znali, niti su u kliničkim ustanovama postojali uvjeti za nje gu bolesnika u sterilnim uvjetima u poslijepresađivačkom razdoblju. Osobno, pak, nisam raspolagao potrebnim kliničkim znanjem i iskustvom, niti sam radio u kliničkoj ustanovi i tako imao pristup bolesnicima – rekao je Boranić.

Njegova želja da se u inozemstvu upozna s kliničkim gledanjima na presađivanje koštane srži te da stečeno znanje primijeni u domovini odvela ga je na stručno usavršavanje u najugledniju američku, a i svjetsku ustanovu za presađivanje koštane srži – *The Fred Hutchinson Cancer Research Institute* u Seattleu, u saveznoj državi Washington na sjeverozapadu SAD-a.

– To sam uspio jer sam s kolegama iz te ustanove uspostavio prijateljske odnose, a osim toga, na institucionalnoj razini je, zahvaljujući stečenu ugledu, sklopljen ugovor o znanstvenom istraživanju na području presađivanja koštane srži. Ugovor se financirao iz tzv. Žitnog fonda kojim se financirala bilateralna znanstvenoistraživačka suradnja između tadašnje države Jugoslavije i SAD-a. Odredbe ugovora predviđale su studijske boravke do tri mjeseca, ali kad sam već stigao u Seattle, ravnatelj Klinike za presađivanje E. Donnall Thomas velikodušno mi je osigurao finansijska sredstva da produžim boravak u SAD-u na osam mjeseci – rekao je Boranić. On je u Seattleu radio djelomično u neposrednom kontaktu s bolesnicima na kliničkom odjelu, a djelomično u laboratoriju, pokušavajući na psima ponovno izvesti dio prijašnjih pokusa u kojima sam na miševima pokazao mogućnost zamjene nepodudarnog presatka podudarnim. – Omogućeno mi je sudjelovanje u uzimanju i pripremanju koštane srži za presađivanje, njezinoj primjeni te u poslijepresađivačkom nadzoru bolesnika. Tako sam stekao osnovna klinička znanja na tom području – naglasio je Boranić.

Dojmove i iskustva iz Seattlea opisao je u informativnom članku za *Lječnički vjesnik*. – No bilo je jasno kako pisana riječ ne može biti dovoljna. Trebalo je izravnim zalaganjem pridobiti i pokrenuti kolege kliničare u ključnim zagrebačkim ustanovama! Jedan od starijih kolega s ‘diplomatskim’ iskustvom savjetovao mi je da svoju djelatnost pokušam ostva-

riti uz pomoć Hematološke sekcije Zbora liječnika Hrvatske, kao nezavisna tijela izvan i iznad pojedinačnih ustanova. Obratih se tadašnjem predsjedniku Sekcije prof. Nedjeljku Miliću, razumnoj i staloženoj osobi koja je dobro poznavala hrvatski liječnički establišment – i prema stručnosti, i kad je riječ o osobnim taštinama i suparništvima. Taj je krupan, miran čovjek na nemetljiv ali uporan način spremno učinio umjerenijima rasprave o potrebi i mogućnostima pokretanja presađivanja koštane srži u Hrvatskoj, vodeći računa o doraslosti kliničkih i laboratorijskih kapaciteta. Te su rasprave na kraju dovele do konsensusa o izboru najprikladnije ustanove za liječenje presađivanjem – prisjetio se Boranić.

Na temelju procjene i savjeta profesora Milića odlučeno je sastavljanje interdisciplinarne skupine, sastavljene od stručnjaka za djelatnosti potrebne za kliničko presađivanje koštane srži.

– Odlučeno je da će u njoj, osim kliničara hematologa biti i infektolog (radi njege bolesnika u aseptičnim uvjetima), radioterapeut (radi ozračivanja cijelog tijela u pripremi za presađivanje), imunolog (radi tkivne tipizacije primatelja i davalatelja), transfuziolog, citolog, patolog i drugi. Vlastito pak iskustvo u upravljanju i rukovođenju uputilo me da za rad ekspertne skupine pribavim pokroviteljstvo Zbora liječnika i Akademije medicinskih znanosti Hrvatske te odgovarajuću suglasnost svoje matične ustanove radi logističke potpore – objasnio je Boranić. Od Ministarstva znanosti priskrbljena su finansijska sredstva za administrativne poslove i drugu djelatnost ekspertne skupine. Održana su dva plenarna sastanka ekspertne skupine (1977. i 1978. godine), a između njih mnogi osobni kontakti i dopisivanje. Konačan je zaključak bio da u Zagrebu treba pokrenuti presađivanje koštane srži i organizirati ga u sklopu Zavoda za hematologiju Kliničke bolnice Rebro jer ondje postoje odgovarajući uvjeti kad je riječ o kliničkim kompetencijama i pridruženim djelatnostima.

– Najviše je dvojbe bilo u pitanju treba li centar osnovati u Klinici Dr. Ozren Novosel (danasm KB Merkur) ili u Kliničkom bolničkom centru Rebro. Prevagnuli su dokazi da Rebro raspolaže odgovarajućim izvorom zračenja za pretpresađivačku pripremu (kobaltnim uređajem za radioterapiju), ali i većim krugom stručnjaka različitih profila potrebnih za stvaranje interdisciplinarne ekipe. Rad i zaključci ekspertne skupine opisani su u dvjema publikacijama u *Liječničkom vjesniku* – kazao je Boranić.

Djelatnost ekspertne skupine podudarala se s pripremom, a zatim i izgradnjom Nuklearne elektrane

Krško za čije je potrebe u sklopu sigurnosnih mjera trebalo predvidjeti i kapacitete za zbrinjavanje osoblja koje bi moglo biti ozračeno u slučaju akcidenta (tehničkih propusta ili havarija). Za tu su svrhu bila predviđena odgovarajuća investicijska sredstva i tako se stvorila materijalna osnovica za izgradnju jedinica za njegu u sterilnim uvjetima u Zavodu za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Rebro. – Taj je zahvat ostvaren zalaganjem tadašnjeg voditelja Zavoda, doc. dr. sc. Zvonimira Grgića koji je nažalost uskoro iznenada umro. Naslijedio ga je prof. Boris Labar, sposoban kliničar i organizator koji je okupio presađivački tim i zajedno s dr. Vinkom Bogdanićem obavio prvo presađivanje koštane srži početkom 1983. godine. Pacijent je bio mladić iz Bosne s aplastičnom anemijom. Borisu Labaru, Vinku Bogdaniću i drugim članovima presađivačkog tima bila je omogućena ciljana izobrazba u obliku studijskih boravaka u presađivačkim centrima u Parizu i Seattleu, zahvaljujući znanstvenim i kolegijalnim vezama s tim ustanovama. Pomogle su i veze prof. Andrije Kaštelana s centrom za tipizaciju tkiva u Parizu – prisjetio se Boranić prvih presađivanja koštane srži u Hrvatskoj.

– Osobno nisam sudjelovao u kliničkoj djelatnosti jer sam držao da je moja zadaća ispunjena te sam se povukao. Dodijeljena mi je počasna uloga predsjednika Etičkog povjerenstva koje je odobravalo upućivanja za presađivanje i listu čekanja. S članovima presađivačkog tima uspostavio sam srdačne stručne i kolegijalne odnose. Od mene se očekivalo da kliničkoj djelatnosti dodam i odgovarajuću eksperimentalnu dimenziju, nastavljajući istraživanja reakcije presatka protiv primatelja, ali moj je znanstveni interes otišao u drugom smjeru – zaključio je Milivoj Boranić.

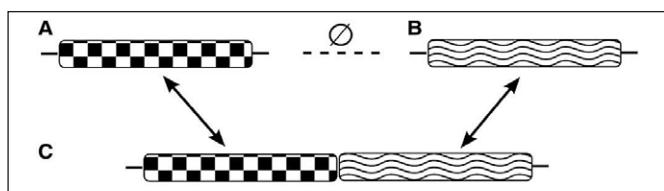
## Pola stoljeća fuzijskih gena

**Ružica Lasan-Trčić**

Odjel za citogenetiku, Klinički bolnički centar Zagreb  
E-pošta: lasan\_ruzica@hotmail.com

Strukturne kromosomske preuređbe mogu rezultirati razmjenom sekvenci između gena za kodiranje ili regulaciju DNA (Slika1.).

**Slika 1. Fuzijski gen C i njegove dvije komponente A i B.**



Mnoge takve genske fuzije su snažni poticaji mutacija u razvoju neoplazme i daju temeljne uvide u mehanizme bolesti koji su uključeni u tumorogenezu. Bliska povezanost između vrste genske fuzije i fenotipa tumora čini fuziju gena idealnim u dijagnostici, što omogućava potklasifikaciju inače naizgled istih bolesti. Osim toga, mnoge genske fuzije dodaju važne informacije za stupnjevanje rizika, a sve veći broj kimernih proteina koji se kodiraju genskim fuzijama postaju specifični ciljevi liječenja, što rezultira dramatičnim poboljšanjem ishoda bolesti. Molekularno rasvjetljavanje patogenih mehanizama tumor-specifičnih kromosomskih aberacija raka izazvali su ogroman interes za citogenetiku raka kao snažan alat za pronalaženje i prepoznavanje gena važnih za tumorogenezu. Buduća tehnička poboljšanja tijekom 1980-ih, posebice razvoj fluorescentne in situ hibridizacije (FISH), FISH s više boja i široko prihvaćanje lančane reakcije polimeraze (PCR), dodatno su pridonijela analizi i radikalno precizirala prepoznavanje novih genskih fuzija. Ovakav pristup karakterizacije mesta loma u citogenetički izbalansiranim aberacijama bio je put bez premca tijekom četvrt stoljeća i doveo je do otkrivanja gotovo 800 fuzijskih gena nastalih stečenim translokacijama, inverzijama i insercijama koje su karakteristike različitih vrsta tumora te je podarila preciznost u prepoznavanju novih genskih fuzija. Molekularno genetske analize tumorskih kromosomskih aberacija utrle su put otkrivanju prih fuzijskih gena početkom 1980. godine (1).

Priča započinje otkrićem Nowella i Hungerforda 1960. godine karakterističnog marker kromosoma

prisutnog u leukocitima pacijenata s kroničnom mijeločnom leukemijom (CML) nazvanim Philadelphia kromosom (Ph). Iako je broj prethodnih studija upućivao na kromosomske abnormalnosti u raka kod ljudi, Philadelphia kromosom *bona fide* bio je prva dokumentacija genetskog potpisa malignosti. Sve do 1973. godine kada Janet Rowley otkriva da je Philadelphia kromosom u stvari rezultat translokacije između kromosoma 9 i 22. Hipoteza leukemogenog mehanizma CML-a potvrđena je 20 godina kasnije kada je otkriveno da translokacija t(9;22)(q34;q11) proizvodi fuzijski gen koji uključuje BCR gen kromosoma 22 na mjestu loma q11 i ABL1 protoonkogena kromosoma 9 s mjestom loma q34 koji kodira P210BCR-ABL fosfoprotein s aktivnošću tirozin kinaze koji je uključen u patogenezu CML-a. Osamdesetih godina isto tako i karakterizacija Burkittova limfoma (BL) s translokacijom (8;14)(q24;q32), t(2;8) (p11;q24) i t(8;22)(q24;q11) pokazala je da je točka loma u 8q24 bila unutar MYC gena: druga točka loma bila je unutar imunoglobulinskog gena, koji kodira ili teški lanac (IGH u 14q32) ili kappa (IGK u 2p11) ili lambda (GL u 22q11) lakih lanaca. Kao posljedica translokacije, kodirajuće sekvence MYC gena nalaze se podjednako na jednom od imunoglobulinskih lokusa, što rezultira deregulacijom MYC-a, jer je gen sada pod regulatornom kontrolom konstitutivno aktivnog imunoglobulinskog gena (2). Slične genomske posljedice specifičnih balansiranih promjena kromosoma ubrzo su identificirane u sve većem broju različitih tipova raka, uključujući hematološke maligne bolesti kao i mezenhimalne i epitelne solidne tumore. Prva potvrda scenarija BL-a u nekoj drugoj B-staničnoj neoplazmi pokazala je 1984. da t(14; 18)(q32;q21) u folikularnom limfomu rezultira prekomjernom ekspresijom BCL2 zbog svoje juxta pozicije na IGH lokusu, a 1986. godine analogna situacija je uspostavljena u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji T-stanica u kojoj su regulatorni elementi gena T-stanica receptorskog alfa (TRA) morali deregulirati ekspresiju MYC-a; drugi 3 ‘ partnerski geni, npr. LYL1, TAL1, LMO1 i LMO2 koji su uključeni u translokacije koji utječu na TRB i TRD lokuse, uskoro su identificirani u leukemijama/limfomima

T-stanica koje nose različite translokacije. CML scenarioj, tj. stvaranje kimernog fuzijskog gena, čvrsto je uspostavljen u hematološkim malignitetima i solidnim tumorima početkom 1990-ih s dokazom fuzijskog gena PML/RARA u akutnoj promijelocitnoj leukemiji s t(15;17)(q22;q21), DEK / NUP214 u akutnoj mijeloidnoj leukemiji (AML) s t (6; 9)(p22;q34), RUNX1/ RUNX1T1 u AML s t (8;21)(q22;q22) i EWSR1/ FLI1 u Ewingovom sarkom s t(11; 22)(q24; q12) (1). Kod pedijatrijske B-stanične akutne limfatične leukemije (ALL) najčešća translokacija t(12;21) (p12;q22) fuzionira dva gena TEL i AML1 (3). Balansirani kromosomski rearanžmani tumora karakterizirani na molekularnoj razini djeluju jednim od alternativnih mehanizama ili putem deregulacije, što obično rezultira prekomjernom ekspresijom naizgled normalnog gena u jednoj od točki loma ili stvaranjem novog kimeričnog gena kroz fuziju dijelova dva gena, po jedan u svakoj točki loma (4). Proboj u potrazi za fuzijskim genima alternativnim metodama opruganim kromosomima slijedi varijantna metoda PCR s reverznom transkripcijom (engl. Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) i Sangerova metoda, tehnologija prve generacije sekvenciranja. Chinnaiyan i suradnici utiru put bioinformatičkom pristupu traženja hibridnih gena u karcinomu prostate koji su pokazali vrlo visoku ekspreziju RNA u mikroarray eksperimentima i pokazali su da su dva gena ERG i ETV1 često spojena na 5 ‘dio prostata specifičnog androgen-reguliranog gena TMPRSS2. Zatim su otkriveni drugi ETS geni koji su fuzionirani s TMPRSS2, a isto tako i neki drugi 5 ‘partnerski geni koji aktiviraju ETS gene. Ubrzo nakon toga, fuzija gena EML4/ALK pronađena je u podskupini karcinoma pluća ne-malih stanica, pretraživanjem knjižnice retrovirusne ekspresijske cDNA iz uzorka raka (5). Rezultati ovih pionirskih studija pokazali su po prvi put da citogenetski nedetektibilne genske fuzije mogu biti uzročni faktor u znatnoj frakciji uobičajenih ljudskih karcinoma, a nalaz je naglasio potrebu da se metode visoke rezolucije koriste paralelno s opruganim kromosomima za karakterizaciju genoma karcinoma (1). Za kromosomske rearanžmane koji ne uključuju genomske nejednakosti, poput balansirane translokacije ili inverzije, uporaba komparativne hibridizacije genoma (engl. Comparative genomic hybridization, CGH) je ograničena, ne daje informacije o kromosomskom segmentu uključenom u translokaciju.

Napredak masivnog paralelnog sekvenciranja (engl. Massive parallel sequencing, MPS), koji se naziva i sljedeća generacija sekvencioniranja ili se-

kvenciranje druge generacije (engl. Next generation sequencing, NGS) u ovom je trenutku revolucionizirao potragu za novim fuzijskim genima, omogućujući nenadmašne mogućnosti obrade tumora, otkrivanjući sustavne mutacije i fuzijske gene bez ikakvog poznavanja genetske konstitucije. Prvo izvješće koje je koristilo novu tehnologiju sekvenciranja za pronađenje fuzijskih gena u raku predstavio je Stratton sa suradnicima 2008. (6). Ubrzo su slijedile brojne studije o uobičajenim vrstama raka, poput karcinoma dojke, pluća i prostate a rezultati su dramatično promijenili dosadašnja saznanja o fuzijskim genima (4). Uz pomoć analiza temeljenih na metodama MPS-a u hematološkim malignitetima i solidnim tumorima od 2010. godine otkriveno je mnoštvo novih fuzijskih gena, više od 10.000, a velika većina uključuje do sada neočekivane gene (1) (Tablica 1).

**Tablica 1. Broj fuzijskih gena i gena uključenih u glavne podtipove tumora, prema Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (Mitelman et al 2018).**

Vrsta tumora	Broj fuzijskih gena	Broj gena uključenih u fuziju
Hematološki maligniteti	1.231	1.232
Solidni tumori	9.644	8.508
<b>Ukupno</b>	<b>11.077*</b>	<b>9.009*</b>

\* Ukupan broj genskih fuzija i gena koji su uključeni ne zbrajaju se jer se svaka genska fuzija računa samo jednom, ali se može naći u različitim tumorskim entitetima.

Genska fuzija je važan evolucijski proces i njihova molekularna analiza daje vrijedne informacije o interakciji i funkciji proteina. Gledajući brzinu identifikacije fuzijskih gena, za otkriće pet fuzijskih gena u osamdesetim godinama trebalo je proći 4-5 godina. U samo dvije godine (2015.-2017.) otkriveno je 8.914 fuzijskih gena u genomu tumora (Tablica 2.).

**Tablica 2. Fuzijski geni neoplazmi otkriveni od 1980.-2017., prema Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (Mitelman et al 2018).**

Godina	Broj otkrivenih fuzijskih gena
1980.-1984.	5
1985.-1989.	18
1990.-1994.	69
1995.-1999.	140
2000.-2004.	216
2005.-2009.	442
2010.-2014.	2.778
2015.-2017.	8.914

Do danas je identificiran 1.231 fuzijski gen s 1.232 gena uključena u fuziju u hematološkim malignitetima (Tablica 3.).

**Tablica 3. Broj fuzijskih gena i gena uključenih u glavne podtipove hematoloških maligniteta, prema Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (Mitelman et al 2018).**

Hematološki malignitet	Broj fuzijskih gena	Broj gena uključenih u fuziju
Nediferencirana i bifenotipska leukemija	27	35
Akutna mijeloična leukemija	360	423
Mijelodisplastični sindrom	60	69
Kronična mijeloproliferativna bolest	77	93
Akutna limfoblastična leukemija	639	692
Plazma stanične neoplazme	22	27
Zrele B-stanične neoplazme	201	228
Zrele T- i NK- stanične neoplazme	29	38
Hodgkinov limfom	13	19
<b>Ukupno</b>	<b>1.231*</b>	<b>1.232*</b>

\* Ukupan broj genskih fuzija i gena koji se uključeni ne zbrajaju se jer se svaka genska fuzija računa samo jednom, ali se može naći u različitim tumorskim entitetima.

Najviše identificiranih fuzijskih gena 360 nađeno je u AML s 423 gena uključena u fuziju i u ALL 639 fuzijskih gena s 692 uključena gena (7). Mitelman 2018. godine ističe dvije značajne razlike između fuzijskih gena otkrivenih identifikacijom citogenetskih aberacija i onih do sada identificiranih od strane MPS-a. Prvo, otkriveno je da se više MPS detektiranih genskih fuzija ponavlja, a drugo, sve se više pretpostavlja da velika većina tih fuzija vjerojatno predstavlja slučajne događaje male ili nemale patogenetske važnosti. Glavni izazov su velike funkcionalne studije koje izdvajaju genske fuzije koje su primarne, patogenetski važne i koje nisu posljedične abnormalnosti "buke". Oduvijek, a pogotovo danas dijagnostiku usmjerava novac, specifičnost i brzina prilagodbe novim tehnologijama, drugim riječima klinički laboratorijski genetičari moraju pružiti brzi, pouzdani i uz nisku cijenu najopsežniji rezultat za pojedinog bolesnika. Istodobno postoji trend brzog pristupa novim tehnologijama kao bi se odmah zamjenile tradicionalne tehnike, međutim dobro je poznato da ni jedna tehnika ne može cijelovito odgovoriti na sva pitanja (8). Jedino mudrom kombinacijom postojećih mogu se zadovoljiti traženi upiti.

#### Literatura:

1. Mitelman F. Cancer Gene fusions detected by massive parallel sequencing. ECA newsletter . 2018;41:11-4.
2. Heim S. Boveri at 100: Boveri, chromosomes and cancer. J Pathol. 2014;234(2):138-41.
3. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffé M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1995;86(11):4263-9.
4. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F The emerging complexity of gene fusions in cancer. Nat Rev Cancer. 2015;15(6):371-81.
5. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. Nature. 2007;448(7153):561.
6. Rovigatti U. Cancer modelling in the NGS era - Part I: Emerging technology and initial modelling. Crit Rev Oncol Hematol. 2015;96(2):274-307.
7. Mitelman F, Johansson B, Mertens, F. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. National Cancer Institute [on line (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>)](2018).
8. Liehr T. Expert knowledge on human genetic counselling and chromosomal are necessary for sound genetic laboratory diagnostics. Molecular and Experimental Biology in Medicine 2017;1:1-3.

## *In memoriam*



**Zlatka Nemet – Lojan, dr. med.**  
(27.09.1953. - 15.01.2018.)

Nakon duge i teške bolesti, hladnog i tmurnog 15. siječnja 2018. zauvijek nas je napustila dr. Zlatka Nemet - Lojan, izuzetna liječnica, internist-hemato- log, humanist i čovjek. Njezina je patnja prestala i ona je našla svoj mir.

Rođena je u Ludbregu 1953. godine gdje provodi djetinjstvo i pohađa osnovnu školu. Gimnaziju završava u Varaždinu nakon koje upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu i diplomira 1978. godine. Od tada počinje njezin stručni i požrtvovni radni vijek u Općoj Bolnici „Tomislav Bardek“ u Koprivnici, isprva kao liječnik sekundarac na Internom odjelu, a nakon završene specijalizacije iz interne medicine 1988. godine kao voditelj Hematološkog odjela bolnice. Tijekom specijalizacije završava poslijediplomski studij iz hematologije, a 2008. godine subspecijalizaciju. Onkološko - hematološku dnevnu bolnicu osniva 1993. godine i vodi je predano i s puno entuzijazma do umirovljenja krajem 2015. godine.

Kao liječnica i članica Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog onkološkog društva, Hrvatskog društva za hematologiju i transfuzijsku medicinu te Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM neprestano se stručno potvrđivala, aktivno sudjelujući na hematološkim kongresima, radnim grupama i sastancima, a kao autor i koautor objavljivala je sručne rade u domaćim i stranim časopisima.

Svojim požrtvovnim radom ostavila je neizbrisivi trag u koprivničkom zdravstvu. Bila je prva predsjednica županijske Lige protiv raka koju je uspješno vodila u dva mandata. Svojom humanosću i altruizmom dala je maksimalni doprinos radu Lige, organizirajući brojna predavanja, edukacije te humanitarne akcije kojima su prikupljana značajna sredstava za nabavu medicinske opreme. Bila je aktivna i u strukovnim udruženjima i društvenom radu bolnice, bila je predsjednica podružnice Hrvatskog liječničkog sindikata u dva mandata i dugogodišnji predavač u Srednjoj medicinskoj školi. Svoje znanje i iskustvo nesebično je prenosila kolegama i specijalizantima nastojeći im usaditi ljubav prema hematologiji i predanost pacijentu. Za svoj društveni i stručni rad primila je brojna priznanja.

Unatoč profesionalnoj angažiranosti i posvećenosti volonterskom radu našla je vremena za sina Juricu, obitelj i prijatelje, a njena se umjetnička duša pronašla u pisanju pjesama i fotografiraju.

I na kraju našoj Zlatki želimo reći: Tvoja predanost liječničkom pozivu, briga za pacijente, nastojanje da pomažeš ljudima u svakoj prigodi i na sve načine, Tvoja upornost, požrtvovnost, plemenitost, neposrednost i prijateljstvo ostat će zauvijek u našem sjećanju. Draga Zlatka, neka Ti je vječna slava i hvala!

Andreja Lukić Suknaić, dr. med.

## *In memoriam*



**Prim. mr. sc. Vinko Bogdanić, dr. med.**  
(12.2.1938.-26.3.2018.)

Prim. mr. sc. Vinko Bogdanić, dr. med., specijalist interne medicine, doajen hrvatske hematologije i citolog preminuo je nakon duge i teške bolesti 26.ožujka 2018. godine u Zagrebu. Umro je u svojem domu, okružen najdražima: suprugom Alkom Mihelić-Bogdanić i sinom Brankom. Njegovim odlaskom izgubili smo dragog kolegu, dugogodišnjeg suradnika, humanista i erudita. Bio je omiljen među kolegama svojom duhovitošću, vredinom, optimizmom i širokim enciklopedijskim znanjem. Bio je poštovan od svojih kolega, suradnika, studenata, kao i od svojih bolesnika.

Rođen je 1938. godine u Starom Gradu na Hvaru. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1963. Od 1965. pa do 1970. godine radi kao liječnik opće medicine u Zdravstvenoj stanici Hvar. Specijalizaciju iz interne medicine završio je 1975. godine. Od 1976. g. radi u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Rebro u Zagrebu. 1982. g. obranio je magistarski rad pod mentorstvom doc. dr. sc. Zvonimira Grgića s naslovom „Citološka slika malignih limfoma klasificiranih po Rappaportovoj podjeli u histiocitnu skupinu“. Primarius je od 1988. godine. Od 1985. g. bio je voditelj Centra za transplantaciju koštane srži do umirovljenja. Njegov medicinski interes bili su maligna hematologija i transplantacija koštane srži.

Radi usavršavanja iz hematologije i područja transplantacije koštane srži boravio je 1982. u Pa-

rizu, Francusku, u bolnici Hopital Saint Louis kod prof. Eliane Gluckmann, voditeljice hemato/onkologije. Ona je uspješno izvršila prvu transplantaciju iz umbilikalne krvi u svijetu. 1986. godine bio je na seminaru British Council u Londonu, Velika Britanija, a 1990. godine u Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, SAD. Taj je centar obavio prvu transplantaciju koštane srži pod vodstvom prof. E. Donnall Thomasa koji je za to dobio Nobelovu nagradu.

Dana 8. veljače 1983. godine zajedno s prof. Borisom Labarom izveo je prvu alogeničnu transplantaciju koštane srži u Zagrebu i ovom dijelu Europe (prije njihovih kolega u Beču, Budimpešti i drugim centrima u Europi). Učinio je 1991. g. prvu transplantaciju umbilikalne krvi u Republici Hrvatskoj i to ubrzo nakon prve u svijetu. Bio je su-učesnik u stvaranju nesrodne alogenične transplantacije i mini-transplantacije koštane srži.

Aktivno je sudjelovao na brojnim domaćim i međunarodnim sastancima i kongresima. Bio je redovit i aktivan sudionik godišnjih sastanaka Europske grupe za transplantaciju krvotvornih stanica, Europske udruge hematologa i Američkog društva za hematologiju. Suorganizator je i aktivni sudionik međunarodnog seminara „New Trends in the Treatment of Acute Leukemia“ koji se od 1987. g. periodično organizira u Hrvatskoj. Objavio je stotinjak djela iz područja transplantacije koštane srži, pisao

je nastavne tekstove iz područja hematologije: u „Priručniku interne medicine“ 1985. i 1989. godine; u „Hematologija i transfuziologija“, 1989. g.; „Transplantacija koštane srži“; „Medicina starije dobi“. Bio je aktivan član Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog katoličkog liječničkog društva, Hrvatskog društva za hematologiju i transfuziologiju, International Bone Marrow Transplantation (IBMTR) i European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Unatoč profesionalnoj angažiranosti i posvećenosti svom radu našao je vremena za filateliju i klasičnu glazbu.

Prim. Vinko Bogdanić obogatio je našu hrvatsku hematologiju i bio je jedan od „tri“ hematologa koji su vrlo rano uspostavili hrvatsku transplantaciju koštane srži i time svrstali hematologiju KBC Rebro, Zagreb, u sam vrh svjetske medicine. Duboko smo zahvalni za sve što je učinio za hrvatsku hematologiju, Centar za transplantaciju koštane srži Zavoda za hematologiju, KBC Zagreb i za dobrobit bolesnika. Zauvijek ćemo ga zadržati u trajnoj uspomeni! Neka je vječna hvala i slava velikom čovjeku i liječniku prim. Vinku Bogdaniću.

Prof. dr. Silva Zupančić Šalek

## Kalendar predstojećih hematoloških skupova

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

- **Clinical Updates on Acute Leukemias** od 04.05 do 06.05.2018. u Budimpešti (Mađarska)
- **Proljetni sastanak KROHEMA** od 10.5 do 12.5.2018. u Vukovaru (Hrvatska)
- **XXXI<sup>st</sup> International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** od 10.05 do 12.05.2018. u Briselu (Belgija)
- **EHA-SHRC Hematology Tutorial on Thalassemia** od 10.05 do 11.05.2018. u Shirazu (Iran)
- **MSK Symposium on Lymphoma** od 11.05 do 12.05.2018. u New Yorku (SAD)
- **20th Annual John Goldman Conference on Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Therapy** od 13.05 do 16.05.2018. u Miamiju (SAD)
- **NHLBI State of the Science Workshop on Factor VIII Inhibitors** od 15.05 do 16.05.2018. u Bethesdi (SAD)
- **Joint Meeting on Vascular Biology, Inflammation and Thrombosis** od 15.05 do 16.05.2018. u Beču (Austrija)
- **8<sup>th</sup> International Conference on Myeloproliferative Neoplasms** od 15.05 do 17.05.2018. u Dublincu (Irsko)
- **IPFA/PEI 25<sup>th</sup> International Workshop on “Surveillance and Screening of Blood-borne Pathogens”** od 16.05 do 17.05.2018. u Ateni (Grčka)
- **All Wales National thrombosis conference 2018 (CARDIFF)** 18.05.2018. Cardiffu (UK)
- **WFH 2018 World Congress** od 20.05 do 24.05.2018. u Glasgowu (Škotska)
- **25<sup>th</sup> Biennial International Congress on Thrombosis** od 23.05 do 26.05.2018. u Veneciji (Italija)
- **Clinical and Laboratory Haemostasis 2018** od 13.06 do 14.06.2018. u Sheffieldu (UK)
- **23<sup>rd</sup> of EHA** od 14.06 do 17.06.2018. u Stockholmu (Švedska)
- **15<sup>th</sup> International Conference on Leukemia and Hematologic Oncology** od 20.06 do 21.06.2018. u Parizu (Francuska)
- **Advances in Malignant Lymphoma: Maximizing the Basic-Translational Interface for Clinical Application** od 22.06 do 26.06.2018. u Bostonu (SAD)
- **Musculoskeletal Ultrasound in Hemophilia Training Course** od 27.06 do 29.06.2018. u San Diegu (SAD)
- **The 10<sup>th</sup> Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis (APSTH)** od 28.06 do 30.06.2018. u Sapporo (Japan)

- **ASH Summit on Emerging Immunotherapies for Hematologic Diseases**  
od 12.07 do 13.07.2018. Washington, D.C. (SAD)
- **ISTH SSC 2018 Meeting** od 18.07 do 21.07.2018. u Dublinu (Irska)
- **ASH Meeting on Lymphoma Biology** od 02.08 do 05.08.2018. u Chantilly, Va. (SAD)
- **2<sup>nd</sup> Joint Conference of the International Society of Fibrinolysis and Proteolysis and PA Workshop** od 03.09 do 07.09.2018. u Edinburghu (Škotska)
- **Society of Hematologic Oncology 2018 Annual Meeting** od 12.09 do 15.09.2018. u Houstonu (SAD)
- **37<sup>th</sup> World Congress of Hematology** od 13.09 do 16.09.2018. u Vancouveru (Kanada)
- **EHA-SAH Hematology Tutorial on Lymphoid Malignancies and Plasma Cell Dyscrasias**  
od 14.09 do 15.09.2018. u Buenos Aires (Argentina)
- **NCCN Annual Congress: Hematologic Malignancies** od 21.09 do 22.09.2018. u New Yorku (SAD)
- **EHA-PHTiT Hematology Tutorial on Leukemias** od 21.09 do 22.09.2018. u Varšavi (Poljska)
- **Highlights of past EHA-HOPE Cairo 2018** od 27.09 do 29.09.2018. u Kairu (Egipat)
- **4<sup>th</sup> Annual International Conference on New Concepts in Lymphoid Malignancies: Focus on Aggressive Lymphoma** od 28.09 do 30.09.2018. u Dublinu (Irska)
- **The Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis – 2018**  
od 04.10 do 06.10.2018. u St. Petersburgu (Rusija)
- **4<sup>th</sup> International Conference on Multiple Myeloma** od 05.10 do 07.10.2018. u Mandelieu (Francuska)
- **EHA-Baltic Hematology Tutorial- Lymphoid malignancies including Waldenstroms Macroglobulinemia and Multiple Myeloma** od 18.10 do 19.10.2018. u Talinu (Estonija)
- **Lymphoma & Myeloma 2018: An International Congress on Hematologic Malignancies**  
od 18.10 do 20.10.2018. u New Yorku (SAD)
- **Haemophilia Academy 2018** od 29.10 do 02.11.2018. u Edinburghu (Škotska)
- **4<sup>th</sup> International Chronic GvHD Symposium and EBMT Transplant Complications Working Party Educational Course Joint Meeting** od 08.11. do 10.11.2018. u Zagrebu (Hrvatska)
- **Jesenski sastanak KROHEM-a** 11. mj. 2018.
- **American Society of Hematology (ASH) 2018 Meeting** od 01.12 do 04.12.2018. u San Diegu (SAD).

## Deset godina časopisa „Bilten Krohema“

**Dražen Pulanić**

Časopis „Bilten Krohema – glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM“ pokrenut je 2009. godine, potaknut željama članova KROHEM-a za publikacijom koja bi pratila sastanke KROHEM-a i pisanim putem obavještavala članove o aktivnostima i smjernicama Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM donesenim na pojedinim sastancima.

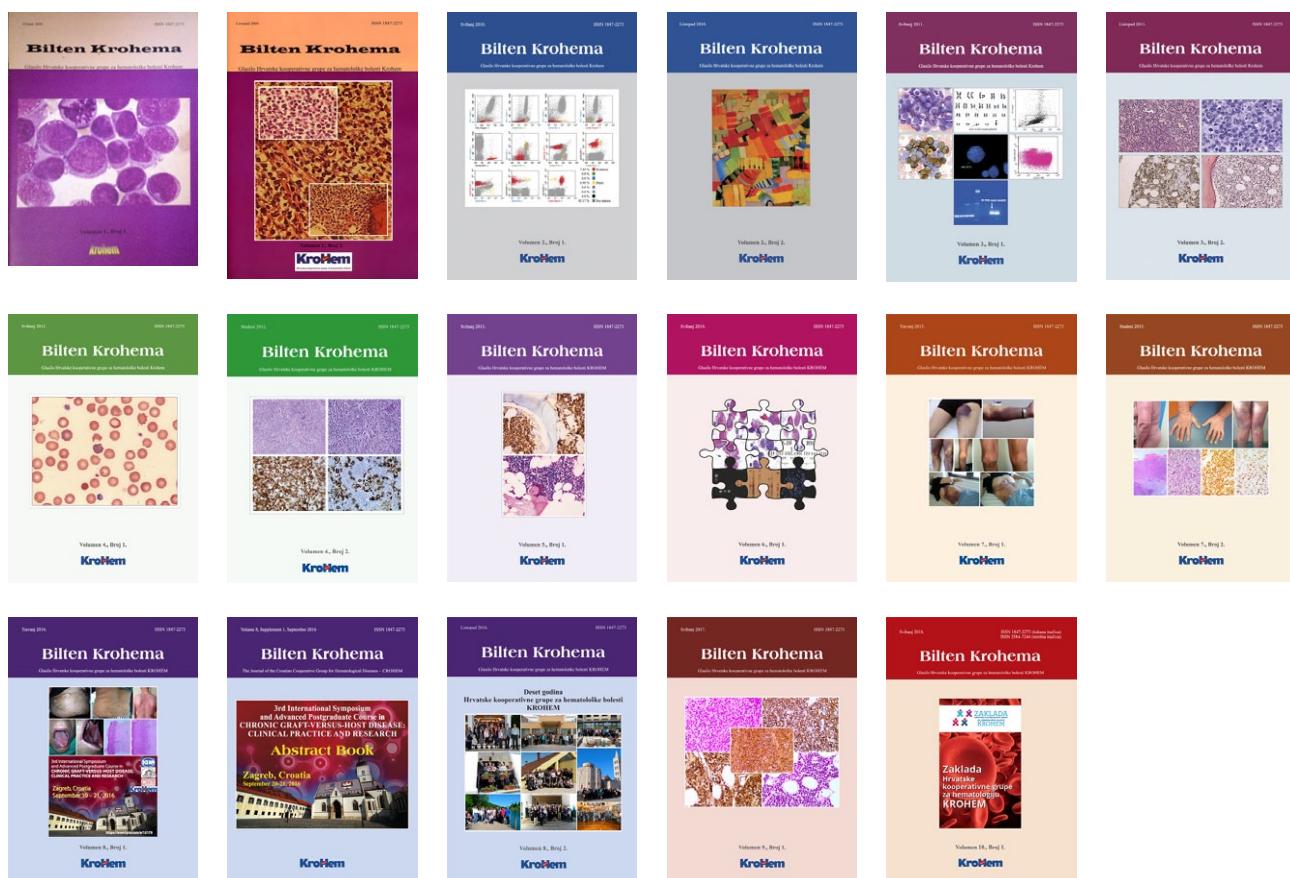
Prvi broj „Biltena Krohema“ tiskan je u ožujku 2009., a glavni urednik tog časopisa od prvog broja sve do danas je doc. dr. Dražen Pulanić (KBC Zagreb). Od studenoga 2012. (volumen 4, broj 2, sveukupno osmi broj časopisa) formirano je Uredništvo „Biltena Krohema“ s tajnicom Uredništva dr. sc. Lanom Desnicom (KBC Zagreb) i članovima Uredništva iz različitih hematoloških centara (prof.

dr. Srđana Čulić (KBC Split), Ivan Host, dr. med. (KBC Rijeka), Inga Mandac Rogulj, dr. med. (KB Merkur), dr. sc. Vlatka Periša (KBC Osijek), mr. sc. Mario Piršić (KB Dubrava)).

Časopis većinom izlazi dva puta godišnje i tema prati stručne sastanke KROHEM-a. Svi brojevi „Biltena Krohema“ objavljeni su u tiskanom obliku a ujedno se nalaze besplatno dostupni i na web stranicama Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM.

Do sada je objavljeno 16 redovitih brojeva "Biltena Krohema" (uključujući i ovaj broj) te jedan suplement na engleskom jeziku – Abstract Book 3. simpozija o kroničnom GVHD (rujan 2016.), sveukupno 17 izdanja „Biltena Krohema“ (Slika 1.).

**Slika 1. Naslovnice svih brojeva „Biltena Krohema“ po godištima/volumenima.**



Vrlo aktivno sudjelovanje velikog broja članova KROHEM-a u pisanju u „Biltenu Krohema“ i niz zanimljivih tekstova koji su u proteklih deset godina objavljeni u tom časopisu najbolji je pokazatelj da je časopis prepoznat kao koristan pisani medij

kojim se bilježe zbivanja, inicijative, smjernice i projekti Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti KROHEM, a u neku ruku je koristan i kao svjedočanstvo povijesti, sadašnjosti i planova za budućnost hrvatske hematologije.



