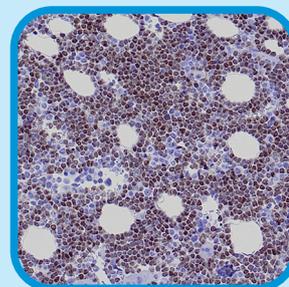
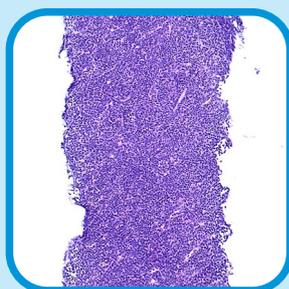
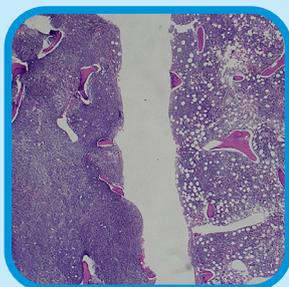
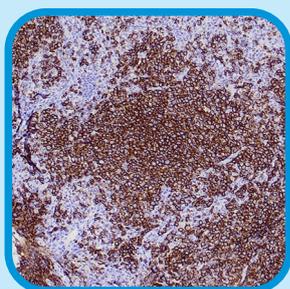


# Bilten Krohema

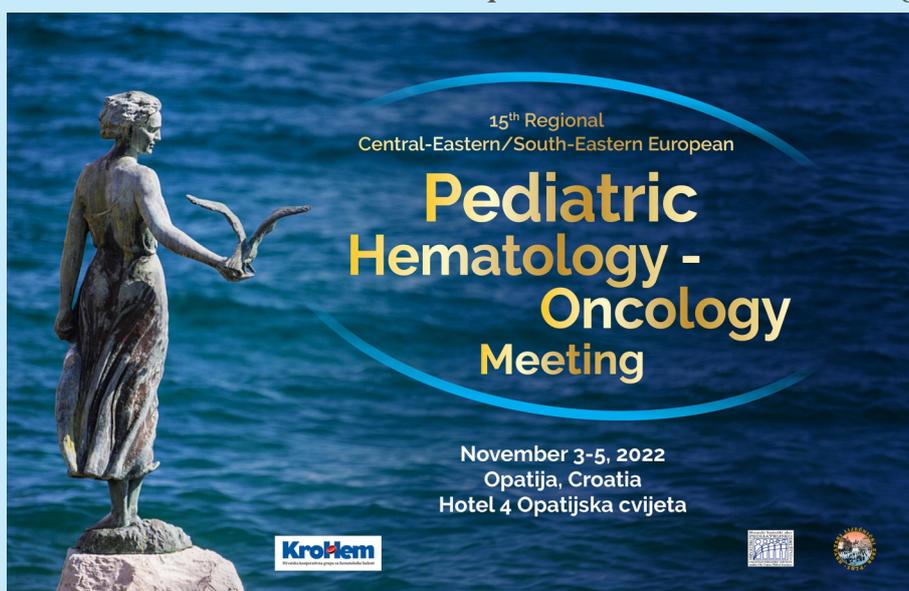
Glasilno Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem

## Četvrti hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma



## *ABSTRACT BOOK*

*15th Regional Central-Eastern/South-Eastern European Pediatric Onco-Hematology Meeting 2022*



Volumen 14., Broj 2.

## **Impresum**

Bilten Krohema  
Glasilo Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohem  
Volumen 14., Broj 2., Studeni 2022.

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 Smoljanović, Vlatka Periša, Mario Piršić

### **Tajnica Krohema:**

Dijana Perčin

### **Autori tekstova:**

Ivona Arić	Marija Ivić	Vlatko Pejša
Igor Aurer	Jasminka Jakelić Piteša	Vlatka Periša
Maja Baučić	Ozren Jakšić	Anđela Pijuk
Sandra Bašić Kinda	Davor Ježek	Fini Plenković
Ernest Bilić	Biljana Jelić Puškarić	Željko Prka
Viktor Blaslov	Matej Jelić	Dražen Pulanić
Klara Bosnić	Lucija Jukić	Margareta Radić Antolic
Marija Burek Kamenarić	Mirjana Mariana Kardum Paro	Delfa Radić-Krišto
Snježana Dotlić	Vlatka Krizmanić	Mirela Raos
Dora Dragčević	Rajko Kušec	Goran Rinčić
Barbara Dreta	Dominik Lozić	Jelena Roganović
Dino Dujmović	Marija Lukić	Sanja Ropac
Ida Hude Dragičević	Sanja Madunić	Jasminka Sinčić-Petričević
Suzana Erić	Inga Mandac Smoljanović	Zoran Šiftar
Ivana Franić Šimić	Lucija Marcelić	Katarina Štingl Janković
Neven Franjić	Marija Maskalan	Željka Tkalčić Švabek
Petar Gaćina	Hana Matijaca	Krešimir Tomić
Lea Galunić Bilić	Marin Međugorac	Katarina Marija Tupek
Davor Galušić	Vibor Milunović	Frane Valković
Branimir Gizdić	Antonija Miljak	Toni Valković
Branka Golubić Čepulić	Karla Mišura Jakobac	Lučana Vicelić Čutura
Zorana Grubić	Zdravko Mitrović	Josipa Vlasac
Ita Hadžisejdić	Stefan Mrđenović	Anamarija Vrkljan Vuk
Hrvoje Holik	Jure Murgić	Renata Žunec
Martina Horvat	Marija Njirić	
Ivana Ilić	Slobodanka Ostojić-Kolonić	

### **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.krohema.hr](http://www.krohema.hr)

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

Patohistološka slika ne-Hodgkinovog limfoma u limfnom čvoru i koštanoj srži, ustupljeno i priređeno ljubaznošću doc. dr. sc. Ivane Ilić, Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb.

# Sadržaj

<b>Igor Aurer:</b> Uvodnik .....	3
<b>Igor Aurer:</b> Četvrti hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma – uvod .....	4
<b>Igor Aurer:</b> Sustavno liječenje limfoma: <b>a) Barbara Dreta, Vibor Milunović, Marija Ivić, Marin Međugorac, Antonija Miljak:</b> Indolentni limfomi i limfom plaštenih stanica .....	5
<b>b) Zdravko Mitrović, Dino Dujmović, Karla Mišura Jakobac, Goran Rinčić, Davor Galušić:</b> Agresivni limfomi .....	7
<b>c) Ida Hude Dragičević, Neven Franjić, Hana Matijaca, Stefan Mrđenović:</b> Hodgkinov limfom .....	8
<b>Lea Galunić Bilić, Maja Baučić, Jure Murgić, Sanja Ropac, Suzana Erić, Krešimir Tomić:</b> Radioterapija limfoma .....	10
<b>Slavko Gašparov, Snježana Dotlić, Ivana Ilić, Ita Hadžisejdić, Biljana Jelić Puškarić, Zoran Šiftar, Margareta Radić Antolic, Ivana Franić Šimić:</b> Morfološka dijagnostika limfoma .....	12
<b>Zdravko Mitrović, Dino Dujmović, Ozren Jakšić, Sandra Bašić Kinda, Petar Gaćina, Vlatka Periša, Željko Prka, Barbara Dreta, Davor Galušić, Hrvoje Holik, Vlatko Pejša, Igor Aurer:</b> Rezultati liječenja R-DA-EPOCH-om u starijih bolesnika s prognostički nepovoljnim B-velikostaničnim limfomom – Krohemovo istraživanje .....	14
<b>Ivana Ilić:</b> Biopsija širokom iglom u dijagnostici limfoma .....	17
<b>Branimir Gizdić, Ivona Arić, Katarina Marija Tupek, Vlatko Pejša, Rajko Kušec, Ozren Jakšić:</b> Određivanje TP53 mutacija u kroničnoj limfocitnoj leukemiji .....	19
<b>Željka Tkalčić Švabek, Martina Horvat, Karla Mišura Jakobac, Inga Mandac Smoljanović, Mirjana Mariana Kardum Paro:</b> FLT3/ITD pozitivna B-akutna limfoblastična leukemija – prikaz slučaja .....	22
<b>Marija Burek Kamenarić, Zorana Grubić, Katarina Štingl Janković, Marija Maskalan, Lucija Jukić, Renata Žunec:</b> Protutijela HLA specifična za darivatelja u transplantaciji alogeničnih krvotvornih matičnih stanica ....	26
<b>Klara Bosnić, Matej Jelić, Ernest Bilić:</b> Stečena aplastična anemija kod djece .....	31
<b>Andela Pijuk, Viktor Blaslov, Jasminka Jakelić Piteša, Dominik Lozić, Sanja Madunić, Antonija Miljak, Lučana Vicelić Čutura, Davor Galušić:</b> TPO agonisti u liječenju imunosne trombocitopenije - iskustvo KBC-a Split .....	35
<b>Vlatka Krizmanić, Inga Mandac Smoljanović:</b> Hemoglobin i more: gdje je veza? .....	37

<b>Marija Ivić, Zdravko Mitrović, Anamarija Vrkljan Vuk, Rajko Kušec, Vlatko Pejša:</b> Dijagnostika i liječenje hereditarne hemoragijske teleangiektazije .....	42
<b>Mirela Raos, Dražen Pulanić, Fini Plenković, Marija Lukić, Branka Golubić Čepulić:</b> Indikacije za primjenu intravenskih gamaglobulina u hematoloških bolesnika .....	46
<b>Dora Dragčević, Inga Mandac Smoljanović:</b> VEXAS sindrom: imunološko-hematološka bolest .....	49
<b>Dražen Pulanić:</b> Aktivnosti Radne skupine za benigne hematološke bolesti u 2022. godini .....	53
<b>Lucija Marčelić, Frane Valković, Toni Valković:</b> Anketa studenata na Integriranom preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci o atraktivnosti specijalizacije iz hematologije .....	57
<b>Davor Ježek:</b> Oncofertility procedures to preserve reproductive potential in men .....	63
<b>ABSTRACT BOOK - 15<sup>th</sup> Regional Central-Eastern/South-Eastern European Pediatric Onco-Hematology Meeting 2022 (November 3-5) .....</b>	<b>69</b>

## Uvodnik

Drage Krohemovke, Krohemovci i ostali čitatelji Biltena,

eto vam se opet javlja vaš predsjednik (tj. predsjednik prve dvije skupine) povodom izlaska novog broja i novog sastanka Krohema, ovaj puta jesenskog u Osijeku, jednom od najljepših i navećih kontinentalnih hrvatskih gradova, često, po mom mišljenju neopravdano, zapostavljanog. Hrana, vino i zabava u Osijeku i okolici su odlični, hematolozi i kolege koji se bave temeljnim istraživanjima vrhunski (iako ponekad ni okolica niti oni nisu toga svjesni), priroda prekrasna, a mjesto za parkiranje je puno lakše naći nego u Zagrebu. Jedino što možda smeta su komarci u toplijim mjesecima.

Mislim da ste već po početku ovog uvodnika počeli shvaćati u čemu je moj problem. Ustanovio sam da uopće nije lako biti novinski kolumnist i da sam polako ostao bez tema o kojima bih mogao pisati. Na COVID-19 smo se navikli, probleme s odobravanjem lijekova uglavnom rješavamo ne kaskajući previše za bogatim državama EU, specijalizacije se raspisuju, mladi kolege dolaze i polako preuzimaju svoja mjesta (opravdano) potiskujući nas starije, uspješno pratimo i primjenjujemo najnovija saznanja tako da je kvaliteta skrbi o hematološkim bolesnicima u Hrvatskoj još uvijek odlična. Skoro bi čovjek rekao da u hrvatskoj hematologiji sve ide kako treba. Naravno da sve nije posve ružičasto i da je ono što jest takvo prvenstveno zbog velikog truda svakoga od nas, ali i dalje mislim da možemo biti ponosni na to što činimo i što smo posti-

gli. Od zadnjeg broja Biltena i sastanka Krohema imali smo sastanke nekoliko radnih skupina, izdali jednu knjigu (Hemokromatoze čiji je urednik ujedno i glavni urednik Biltena i voditelj RS za benigne hematološke bolesti) i organizirali četvrti Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma (na koji su ovaj puta došli i onkolozi-radioterapeuti iz skoro svih hrvatskih centara!). Na kraju, ne mogu da to ne spomenem, u časopisu EHA HemaSphere je prihvaćen rad o našim iskustvima s obinutuzumabom u 1. liniji liječenja folikularnog limfoma što je prvo takvo izvješće izvan kliničkih ispitivanja u svijetu!

Što se organizacijskih pitanja tiče, naš sastanak u Crikvenici je bio izuzetno uspješan pa je sve veći interes za sudjelovanje i kolega iz susjednih zemalja i to ne samo zbog odličnog društvenog programa na čemu zahvaljujem g. Vidu Benku i drugim djelatnicima tvrtke Vivid. Naposljetku, moj prvi mandat i mandat ostalih dužnosnika Krohema se polako približava kraju pa ćemo na idućem proljetnom sastanku imati izbornu skupštinu. Stoga pozivam sve zainteresirane da razmisle o kandidatima za sve dužnosti u udruzi, uključivo predsjedničkoj (iako se planiram ponovno kandidirati, a nadam se i članovi Upravnog i Nadzornog odbora, naravno osim onih koji planiraju skori odlazak u mirovinu).

U nadi da ću vas vidjeti u Osijeku, najtoplije vas pozdravlja

Vaš predsjednik  
prof. dr. Igor Aurer

## Četvrti Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma

### Igor Aurer

Četvrti Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma održan je 25. i 26.9. ove godine u Zagrebu. Sastanku su nazočila 103 sudionika iz 16 hrvatskih ustanova i SKB Mostar. Sudionici su, kao i prethodna tri puta, bili podijeljeni u četiri radne skupine: za laboratorijsku dijagnostiku, za slikovnu dijagnostiku, za sustavnu terapiju i za radioterapiju. Voditelj sastanka je bio, kao i prethodna tri puta, prof. Aurer, a koordinatori radnih skupina: prof. Gašparov; dr. Dobrenić i dr. Kralik; prof. Aurer; i dr. Galunić Bilić. Sastanak je počeo u nejdeltu navečer večerom i „team buildingom“, a nastavio se u ponedjeljak radnim dijelom koji je završio skoro sat vremena kasnije nego što je bilo predviđeno programom. Za razliku od ranijih konsenzusa, ovome su nazočili i onkolozi-radioterapeuti iz skoro svih hrvatskih radioterapijskih centara i Mostara što će,

nadamo se, značajno unaprijediti multidisciplinarno liječenje bolesnika s limfomima. Stručne rasprave na sastanku su povremeno bile žučne, ali uvijek prijateljske, no o nekim pitanjima nije bilo moguće postići konsenzus. Posebno su težak zadatak imali kolege iz radne skupine za laboratorijsku dijagnostiku obzirom na nedavno objavljivanje dvije nove međunarodne klasifikacije tumora krvotvornog i limfatičkog sustava. Usprkos tome je na kraju dojam svih sudionika bio da je sastanak bio izuzetno uspješan i koristan i da će doneseni zaključci doprinijeti daljnjem poboljšanju skrbi o bolesnicima s limfomom. Zaključke pojedinih radnih skupina iz pera njihovih koordinatora možete pročitati u ovom broju Biltena.

Zadnji dio konsenzusa o slikovnim metodama planiramo objaviti u idućem broju našeg časopisa.

## Sustavno liječenje

Koordinator: **Igor Aurer**

Za razliku od prethodna tri konsenzusa, ovaj puta smo sastavljanje preporuka povjerili generaciji nedavno stasalih hematologa, onima koji će se u budućnosti morati nositi s posljedicama svojih preporuka. Da stvari ipak ne izbjegnu kontroli preporuke je prije sastanka pregledao i svoje primjedbe autorima dao gremij staraca u kome su bili Vlatko Pejša, Ozren Jakšić, Slobodanka Ostojić Kolonić, Delfa Radić Krišto, Jasminka Sinčić Petričević, Toni Valković, Sandra Bašić Kinda, Ivo Radman i glavni koordinator. Budući da bi cjelovit tekst pre-

poruka zauzeo previše prostora ovdje su nabrojane samo promjene u odnosu na zadnju inačicu. Cjelovite preporuke bit će objavljene na mrežnoj stranici KroHema.

Masivnom bolešću se smatra najveći promjer tumorske mase veći od 7,5 cm. Za procjenu funkcionalnog statusa, odnosno ranjivosti bolesnika, savjetuje se provesti G8 upitnik prije odluke o terapiji. Za NHL se granica između mlađih i starijih sa 60 godina pomiče na 65, a vrlo starima se smatraju bolesnici s preko 80 godina.

## Indolentni limfomi i limfom plaštenih stanica

Koordinator: **Barbara Dreta**

Izjavitelji: **Barbara Dreta, Vibor Milunović, Marija Ivić, Marin Međugorac, Antonija Miljak**

Kod izbora terapije u liječenju indolentnih limfoma potrebno je uzeti u obzir trenutnu epidemiološku situaciju vezanu za COVID pandemiju zbog B i T stanične deplecije koja se javlja nakon primjene CD20 monoklonskih protutijela i bendamustina. Bolesnici koji su progredirali manje od 6 mjeseci nakon zadnje primjene imunokemoterapije (ne samo imunoterapije!) smatraju se refraktorni na mopt. Ako imaju FL i dobivali su rituksimab, trebaju u sljedećoj liniji dobiti obinutuzumab. Ako imaju FL i liječeni su obinutuzumabom ili imaju drugu vrstu iNHL, ne treba im davati rituksimab.

Razdvojene su preporuke za FL, MZL i LPL. SLL nije obuhvaćen ovim preporukama, treba ga liječiti kao KLL.

### Folikularni limfom

U odnosu na ranije preporuke bendamustin je izgubio prvenstvo pa su sve tri kemoterapijske opcije (B, CHOP i CVP) ravnopravne. U opcije za krhke bolesnike je dodana kombinacija rituksimaba, ciklofosfamida i steroida. Preporuke za terapiju održavanja su ostale nepromijenjene.

Za drugu liniju liječenja je kao ravnopravna terapijska opcija dodan lenalidomid + protu-CD20 monoklonsko protutijelo. Za treću i kasnije linije su kao alternative dodane za sada teško dostupne opcije: bispecifična protutijela i CAR-T stanice.

### Waldenströмова makroglobulinemija

U prvoj liniji liječenja preporuča se provesti 6 ciklusa imunokemoterapije rituksimabom u kombinaciji s bendamustinom, CHOP/CVP-om ili deksametazonom i ciklofosfamidom, odnosno 5 ciklusa terapije rituksimabom u kombinaciji s deksametazonom i bortezumibom. Za sada nedostupna, ali poželjna, opcija je liječenje kombinacijom rituksimaba i iBTK. Terapija održavanja rituksimabom se ne preporuča ako je uvodna terapija sadržavala bendamustin, ali je se treba razmotriti nakon drugih imunokemoterapijskih shema. Bortezumib se preporuča primjenjivati supkutano jednom tjedno radi smanjenja rizika polineuropatije. U bolesnika visokog rizika za razvoj hiperviskoznog sindroma (IgM >40 g/l) preporuča se preventivna plazmafereza i/ili izostavljanje rituksimaba u prvom ciklusu terapije.

U drugoj i kasnijim linijama liječenja preporuča se terapija iBTK, u kombinaciji s rituksimabom ako bolesnik nije na nj refraktoran. Kod mlađih bolesnika koji su kandidati za liječenje intenzivnom kemoterapijom, posebno kod brzog relapsa bolesti, potrebno je razmotriti prikupljanje perifernih matičnih stanica i ATKS. Kod bolesnika koji su progredirali pod terapijom iBTK potrebno je razmotriti aloTKS.

### Limfomi marginalne zone

Sve bolesnike s MZL je potrebno testirati na

HCV. Ako su pozitivni, treba liječiti HCV infekciju, a nakon završetka procijeniti potrebu za dodatnim protulimfomskim liječenjem.

### ***Nodalni limfomi marginalne zone***

U odnosu na ranije preporuke bendamustin je izgubio prvenstvo pa su sve tri kemoterapijske opcije (B, CHOP i CVP) ravnopravne. Preporuke za terapiju održavanja su nepromijenjene. Za drugu liniju liječenja je kao ravnopravna terapijska opcija dodan lenalidomid + rituksimab. iBTK su, za sada nedostupna, terapija izbora za kasnije linije liječenja.

### ***Splenični limfom marginalne zone***

Preporučena prva linija liječenja je monoterapija rituksimabom. U slučaju povoljnog odgovora treba nastaviti terapijom održavanja. U drugoj ili kasnijim linijama liječenja preporuča se splenektomija ili primjena manje agresivne imunokemoterapije odnosno iBTK.

### ***Ekstranodalni limfomi marginalne zone***

Terapija klaritromicinom se više ne preporuča ni u jednom entitetu.

Kod MALT-a želuca prilikom dijagnoze preporuča se učiniti testiranje na *H. pylori* iz bioptata sluznice želuca. U slučaju negativnog nalaza potrebno je učiniti urea izdisajni test ili antigen HP iz stolice. U slučaju pozitivnog nalaza na HP preporuča se provesti eradikacijsku terapiju prema važećim gastroenterološkim preporukama. Šest tjedana od početka provođenja terapije te 2 tjedna po završetku terapije IPP-om učiniti kontrolno testiranje na HP. U slučaju negativnog nalaza preporuča se daljnje praćenje dok u slučaju pozitivnog nalaza preporuča se provođenje 2. linije eradikacijske terapije. Kontrolnu ezofagogastroduodenoskopiju potrebno je učiniti za 3-6 mjeseci. U slučaju da je HP negativan i da makroskopski nema znakova limfoma preporuča se daljnje praćenje za 12 mjeseci čak i ako je u patohistološkom nalazu bioptata prisutan limfom. Kod HP negativnih bolesnika preporuča se također provesti eradikacijsku terapiju, u slučaju pozitivnog nalaza na kontrolnoj ezofagogastroduodenoskopiji za 3-6 mjeseci preporuča se provesti liječenje drugom linijom liječenja. U drugoj liniji liječenja lokaliziranu bolest treba ozračiti, dok se za proširenu bolest u relapsu nakon zračenja preporuča sustavna terapija kao za sMZL.

Kod zahvaćanja okularnih adneksa u bolesnika bez izrazitih simptoma je prva linija liječenja terapija doksiciklinom 200 mg dnevno kroz 3 tjedna,

a kod kožnog MZL, u slučaju infekcije Borelliom, liječenje cefalosporinima. Bolesnike koji na to ne odgovore treba liječiti kao gore navedeno.

U prvoj liniji liječenja ostalih lokalizacija MALT limfoma kod lokalizirane bolesti se preporuča kirurška ekscizija i/ili radioterapija. Kod proširene bolesti uz prisutne simptome preporuča se provesti sustavna imunokemoterapija kao za sMZL.

### ***Limfom plaštenih stanica***

Asimptomatske bolesnike s indolentnim MCL treba opservirati bez liječenja. U slučaju progresije, treba ih liječiti kao i agresivni tip MCL.

Kao opcija za prvu liniju uvodne terapije transplantabilnih bolesnika, posebice onih starijih od 60 godina, dodan je R-BAC. Za netransplantabilne preporučene opcije su R-BAC, BR i R+lenalidomid. Preporuke za terapiju održavanja su ostale nepromijenjene.

Preporučena terapija druge linije su iBTK, u kombinaciji s rituksimabom za bolesnike koji nisu refraktorni na R. Alternative su imunokemoterapijski protokoli 1. linije ili borteomib. Iste terapijske opcije treba razmotriti u kasnijim linijama liječenja. Kod mlađih bolesnika u relapsu nakon ATKS potrebno je razmotriti aloTKS. Za sada teško dostupne opcije za kasnije linije liječenja uključuju primjenu BCL2 inhibitora, CAR-T stanica i bispecifičnih protutijela.

### ***Kožni limfomi***

#### *T limfomi*

Mycosis fungoides i Sezaryjev sindrom

Bolesnika treba liječiti dermatološkom terapijom dok god je to moguće. Za prvu liniju sustavne terapije preporučuje se pegilirani interferon alfa, peroralni metotreksat ili retinoidi. Ovi lijekovi se mogu davati zasebno ili u kombinaciji, s ili bez lokalne terapije (npr. PUVA). U drugoj i kasnijim linijama liječenja u slučaju da je bolest CD30+ preporuča se primjena BV. Alternative su: ranije nekoristene terapije 1. linije, gemcitabin, doksorubicin, klorambucil ili polikemoterapija kao za sustaven limfome. Ukoliko će biti dostupno, u trećoj liniji liječenja može se primijeniti mogamulizumab. Terapijska opcija za Sezaryjev sindroma je alemtuzumab.

U lokaliziranim oblicima bolesti treba razmotriti kombinaciju sustavne i radioterapije. U generaliziranim oblicima bolesti može se razmotriti liječenje TSEBT (total skin electro beam therapy – dostupan u KBC Split) uz adjuvantnu sustavnu terapiju. Ek-

strakorporalna fotofereza indicirana je kod zahvaćanja krvnog odjeljka, sama ili u kombinaciji sa sustavnom terapijom. Kod višestrukih relapsa ili rezistentne bolesti u mlađih bolesnika može se razmotriti aloTKS.

#### Primarni kožni anaplastični T- stanični limfom

U prvoj liniji liječenja pristup liječenju ovisi o proširenosti bolesti. Ako je bolest lokalizirana, preporuča se ekscizija ili lokalna radioterapija. Ako je bolest proširena, preporuča se primjena peroralnog metotreksata. U drugoj liniji liječenja u slučaju CD30 pozitivne bolesti preporuča se primjena BV. Alternative su pegilirani interferon alfa, doksorubicin, gemcitabin, etopozid, ili beksaroten.

#### B-limfomi

##### Primarni kožni B-limfom folikularnog centra

U slučaju lokalizirane bolesti ekscizija ili radioterapija, a u slučaju proširene bolesti monoterapija rituksimabom.

#### Limfoproliferativne bolesti povezane s imunodeficijencijom

Kod HIV+ bolesnika koji su prethodno liječeni HAART-om savjetuje se izostaviti rituksimab ako je broj CD4 stanica < 50/ $\mu$ l.

##### Rani tip PTLD

Prva linija liječenja je redukcija imunosupresije uz procjenu odgovora nakon 2-4 tjedna. Ukoliko je postignuta kompletna remisija preporuča se daljnje praćenje uz praćenje vrijednosti PCR na EBV i funkcije grafta. Ukoliko nije postignuta parcijalna remisija potrebno je provesti liječenje monoterapijom rituksimabom uz praćenje vrijednosti PCR na EBV.

##### Pleomorfni tip PTLD

Preporuča se redukcija imunosupresije i praćenje vrijednosti PCR na EBV. Ako je bolest lokalizirana, potrebno ju je ozračiti ili kirurški odstraniti uz 4 aplikacije monoterapije rituksimabom jednom tjedno. U slučaju postizanja kompletne remisije treba provesti liječenje s još 4 aplikacije rituksimaba svaka 3 tjedna. U slučaju nepostizanja odgovora, terapija izbora je standardna imunokemoterapija.

## Agresivni limfomi

**Koordinator: Zdravko Mitrović**

**Izjavitelji: Zdravko Mitrović, Dino Dujmović, Karla Mišura Jakobac, Goran Rinčić, Davor Galušić**

#### B-velikostanični limfomi

B-velikostanični limfomi se liječe kao DLBCL NOS ako nije drugačije navedeno.

Svi bolesnici s CD20+ NHL trebaju dobiti rituksimab. Za st. I bez nepovoljnih značajki je kao alternativa liječenju s 3 ciklusa R-CHOP i zračenjem zahvaćenih čvorova dodana opcija 3x R-CHOP pa interim PET. Ako je PET negativan, treba dati još 1 ciklus R-CHOPa bez zračenja. Maksimalan broj R-CHOEP14 ciklusa je sa 6 smanjen na 4 (+2 ciklusa R-CHOP). Za sve visokorizične bolesnike (aaIPI 2-3) se preporuča vinkristin zamijeniti polatuzumab vedotinom kada lijek dođe na listu PSL. Za vrlo stare i krhke bolesnike je preporučeni protokol R-miniCHOP / R-mini CEOP. Među ekstranodalne regije koje se preporuča ozračiti nakon završetka sustavnog liječenja su dodane dojka i tonzila. Među preporučene intenzivne kemoterapijske protokole za ka-

snije linije liječenja se umjesto HDIMa uvodi GDP (gemcitabin, deksametazon, cisplatin). Primarno refraktornim bolesnicima i onima u ranom relapsu se preporuča uz intenzivni kemoterapijski protokol dati bortezomib ili lenalidomid. Za bolesnike refraktorne na 1. liniju liječenja ili u ranom relapsu se, kao vrijedna, ali za sada nedostupna, opcija dodaje primjena CAR-T stanica. Za kasnije linije liječenja i drugu liniju u netransplantabilnih bolesnika su kao vrijedne, ali za sada nedostupne, opcije uz kombinacije s PVom, dodani tafasitamab+lenalidomid (za kasni relaps), bispecifična protutijela i lonkastuksimab tesirin (za 3. i kasnije linije liječenja), a izbačen je piksantron.

Primarni medijastinalni B-stanični limfom (PMBCL) je izdvojen kao posebni entitet. Preporučene terapijske opcije za nj su DA-R-EPOCH i R-CHOEP14 te R-CHOP-14, potonji za bolesnike s

aaIPI 0-1. Više se ne preporuča liječenje R-CHO-Pom21. Za refraktornu bolest je preporučena, ali teško dostupna, opcija kombinacija BV-a i iPD-1.

Primarni B-LCL testisa je izdvojen kao poseban entitet. Preporuča se ista imunokemoterapija kao za DLBCL-NOS uz obaveznu prevenciju širenja bolesti u SŽS s 2 ciklusa HD-MTX te ozračenje kontralateralnog testisa. Bolesnicima kojima je tumor ekscirpiran u cijelosti dovoljno je dati 4 ciklusa kemoterapije.

U alternativne protokole za bolesnike s primarnim B-LCL središnjeg živčanog sustava lošijeg općeg stanja dodana je kombinaciji rituksimaba, visokih doza MTX, vinkristina i prokarbazina, a za relapsno-refraktorne se preporuča dodatak lenalidomida, iBTK ili, za BCL2+, venetoklaksa. Bolesnicima koji su u KR nakon ATKS ne treba zračiti mozak.

Za plazmablastični limfom je lenalidomid alternativa bortezomibu u terapiji održavanja.

Mlađe bolesnike s BL niskog rizika se može liječiti manjim brojem ciklusa imunokemoterapije temeljene na visokim dozama MTX.

Kod lokaliziranih B-staničnih limfoma visokog stupnja malignosti bez dodatnih obilježja (stadij I i eventualno II) je kao terapijska opcija dodan R-CHOP.

Medijastinalni limfom sive zone (bivši „Neklasificirani agresivni B-limfom sa značajkama između B-LCL i Hodgkinovog“) se više ni u starijih ne preporuča liječiti ABVDom, već R-CHOPom (ili DA-R-EPOCHom kao u ranijem konsenzusu). U 2. liniji liječenja se preporuča kombinacija BVa i intenzivne kemoterapije, a za kasnije linije liječenja iPD-1.

### T-NHL

Preporučena terapijska opcija za prvu liniju liječenja ALCL je za aaIPI 0-1 BV-CEP ili BV-CHP, a za aaIPI 2-3 BV-CHEP. Za starije bolesnike s angioimunoblastičnim limfomom je kombinacija ciklosporina, ivIg i steroida dodana kao alternativa i za prvu liniju liječenja. Mlađe bolesnike u remisiji nakon prve linije liječenja s infiltracijom koštane srži treba uputiti na aloTKS. Moguća, ali za sada nedostupna, opcija liječenja relapsno-refraktornog angioimunoblastičnog limfoma su inhibitori HDAC, npr. belinostat ili romidepsin te pralatreksat.

Kod NK staničnih limfoma preporučeni protokoli za prvu liniju liječenja su DDGP i m-SMILE s pegiliranom asparaginazom. Lokaliziranu bolest treba ozračiti prije ili nakon 2 ciklusa kemoterapije (sendvič). Za kasnije linije liječenja preporučuju se iPD-1.

## Hodgkinov limfom

**Koordinator:** Ida Hude Dragičević

**Izvjestitelji:** Ida Hude Dragičević, Neven Franjić, Hana Matijaca, Stefan Mrđenović

### Klasični Hodgkinov limfom

#### Prva linija liječenja

Novootkriveni cHL se na temelju kriterija Njemačke skupine za istraživanje Hodgkinovog limfoma (GHSG) dijeli u:

- 1) lokaliziranu bolest povoljne prognoze
  - st. I i II bez čimbenika rizika;
- 2) lokaliziranu bolest nepovoljne prognoze
  - st. I i II s najmanje jednim čimbenikom rizika;
- 3) proširenu bolest
  - st. III i IV te st. II koji zbog proširenosti nije podesan za zračenje svih zahvaćenih regija.

Uz eBEACOPP se preporučuje koristiti interim PET za deeskalaciju terapije. Za sada nije jasno tre-

ba li Deauville 3 interpretirati kao negativan (kao što se radi u rutinskoj kliničkoj praksi) ili pozitivan nalaz (kao što je rađeno u kliničkim ispitivanjima na temelju kojih su donešene preporuke o deeskalaciji terapije). Uz ABVD interim PET treba koristiti za eskalaciju terapije u eBEACOPP, a Deauville 3 treba interpretirati kao negativan nalaz.

#### Lokalizirana bolest nepovoljne prognoze u bolesnika mladih od 60 godina:

Standardna terapija:

2x eBEACOPP + 2x ABVD ± INRT 30Gy ovisno o nalazu iPET4. Bolesnike koji su PET negativni, a po CTu u PR ili KR ne treba zračiti. Bolesnicima koji su PET pozitivni treba ozračiti PET+ čvorove.

Druge opcije su:

2x ABVD pa iPET2. U slučaju da je iPET negativan, nastaviti s 2x ABVD + INRT 30Gy. U slučaju da je iPET pozitivan, terapiju eskalirati u 2x eBEACOPP + INRT 30Gy.

Za sada nedostupna opcija je 4x BV-AVD + INRT 30Gy

### **Proširena bolest u mladim od 60 godina**

Standardna terapija (4-6x eBEACOPP) i prva alternativa (6x BV-AVD) ostaju nepromijenjene. Kao druga alternativa se umjesto 6x ABVDa preporuča 2x ABVD pa iPET2. Ako je negativan, dati 4x AVD, a ako je pozitivan eskalirati u 6x eBEACOPP.

### **Bolesnici s cHL stariji od 60 godina**

S obzirom na dob i biologiju bolesti, savjetuje se u svih bolesnika starijih od 60 godina provesti predfazu kortikosterodima u trajanju od 3-7 dana, kao i primarnu G-CSF profilaksu. Bolesnicima starijima od 70 godina ne treba davati više od 2 ciklusa ABVD (4 aplikacije bleomicina).

Bolesnike zadovoljavajućeg općeg stanja s lokaliziranom bolesti bez nepovoljnih prognostičkih značajki se može liječiti kao i mlađe od 60. Bolesnike zadovoljavajućeg općeg stanja s nepovoljnim prognostičkim značajkama treba liječiti s 4x A(B)VD + INRT 30 Gy, alternativa je 4x CHOP + INRT 30Gy. Standardni protokol za bolesnike zadovoljavajućeg

općeg stanja s proširenom bolesti je sekvencijski protokol 2x BV + 6x AVD + 4x BV. Alternativa su 6x A(B)VD i 6x CHOP. Preferirana, ali za sada nedostupna, opcija za bolesnike koji su nepodesni za ovakvo liječenje je BV+dakarbazin, a dostupna alternativa ostaje LVPP.

### **2. linija liječenja bolesnika s R/R cHL podesnih za ATKS**

Preferirana, ali za sada teško dostupna, opcija je 2-3x BV-DHAP ili BV-ICE. Bolesnike, koji su nakon toga PET-, treba autotransplantirati. Ukoliko je postignuta parcijalna metabolička remisija (PMR), može se nastaviti liječenje autotransplantacijom pa remisiju konsolidirati zračenjem PET+ čvorova i/ili BV ili promijeniti imunokemoterapijsku shemu pa bolesnika autotransplantirati nakon postizanja KR.

Bolesnici visokog rizika (primarno refraktorni, rani relaps, st. IV u relapsu), koji nisu rezistentni na BV, trebaju u 2. liniji liječenja u sklopu uvodne terapije ili konsolidacije dobiti BV, do ukupno najviše 16 ciklusa.

### **3. i kasnije linije liječenja cHL ili 2. linija u netransplantabilnih bolesnika**

Nema većih izmjena osim što se u bolesnika, koji nisu bili autotransplantirani, preporuča konsolidirati remisiju postignutu iPET-1 s ATKS.

## Radioterapija limfoma

**Koordinator: Lea Galunić Bilić**

**Izjestitelji: Lea Galunić Bilić, Maja Baučić, Jure Murgić, Sanja Ropac, Suzana Erić, Krešimir Tomić**

Limfomi su radiosenzitivni tumori pa radioterapija (RT) ima važnu ulogu u liječenju i mogućnosti izlječenja bolesnika. RT je i danas važan dio liječenja mnogih bolesnika. Vizualizacijom organa i tumora u trodimenzionalnom obliku vrlo se točno i precizno može dostaviti doza na željeno područje, uz istovremenu poštedu okolnih zdravih organa. Primjena CT aparata omogućila je kvalitetnije i kompleksnije planiranje zračenja, kao osnove za uvođenje konformalne radioterapije (3D-CRT) koja se temelji na CT slikovnoj tehnici te volumnom (3D) planiranju zračenja. Razvojem tih suvremenih tehnika snimanja nadvladala su se ograničenja radioterapije u prošlosti, kada se liječenje zračenjem baziralo na dvodimenzionalnim dijagnostičkim slikama.

U radioterapiji limfoma danas primjenjujemo tri važne odrednice: 1) manja polja; 2) manje doze i 3) suvremene radioterapijske tehnike zračenja.

Međunarodna onkološka grupa za zračenje limfoma (The International Lymphoma Radiation Oncology Group -ILROG) je objavila smjernice za zračenje limfoma koje se temelje na ISRT (Involved Site Radiation Therapy - zračenje zahvaćenog sijela bolesti) i INRT (Involved Node Radiation Therapy - zračenje zahvaćenog limfnog čvora) konceptima. U odnosu na starije pristupe, planiraju se i zrače manji volumeni, a postiže se učinkovita kontrola bolesti zahvaćenog područja.

U planiranju radioterapijskog liječenja savjetuje se 3D simulacija koristeći CT simulator. Ako se PET i/ili CT radi prije ili odvojeno od simulacije, potrebno je fuzionirati elektronski slike sa simulacijskim CT-om. Za provođenje zračenja bolesnika s limfomima preporuča se volumetrijski modulirana tehnika zračenja (VMAT) uz svakodnevnu slikovnu kontrolu namještaja (IGRT) čime se postiže maksimalna pošteda zdravih organa od zračenja. Ukoliko ista nije dostupna, preporuča se zračiti standardnom 3D-konformalnom tehnikom.

### Volumeni zračenje limfoma

Prekemoterapijski ili preoperativni GTV (Gross Tumor Volume) čine sva područja zahvaćena bolešću prije bilo kakve intervencije. Njih treba označiti na simulacijskom CT-u jer ih se treba uključiti u CTV.

CTV (Clinical Target Volume) obuhvaća orginalan (prije bilo kakve intervencije) GTV, čak i ako se širi izvan orginalnih tkiva i organa. Normalne strukture, kao što su pluća, bubrezi, mišići koji su očigledno nezahvaćeni, iako su pomaknuti od strane GTV-a, trebaju biti izuzeti iz CTV-a, ovisno o kliničkoj prosudbi. U označavanju CTV-a treba uzeti u obzir: 1. kvalitetu i točnost slikovnih pretraga; 2. promjene volumena u razdoblju od snimanja; 3. način širenja bolesti; 4. potencijano subkliničko postojanje bolesti; 5. ograničenja za priležeće organe.

PTV (Planning Target Volume) uzima u obzir CTV nesigurnosti kod namještaja pri pozicioniranju bolesnika te podešavanja fotonskih snopova za vrijeme planiranja i provođenja zračenja. To je volumen koji mora biti ozračen da bi CTV dobio propisanu dozu. PTV se razlikuje među ustanovama pa ga svaka treba sama izračunati i odrediti.

Organi od rizika su kritični organi ili zdravi organi koji su u blizini područja zračenja čije ozračivanje može rezultirati značajnim morbiditetom što utječe na planiranje liječenja ili određivanje doze zračenja. Kliničar pri izradi plana zračenja treba proučiti i uzeti u obzir dozno-volumne histograme i odrediti vjerojatnosti komplikacija zdravog tkiva te potom odobriti plan za zračenje.

### Doze i opseg zračenja

#### *Klasični Hodgkinov limfom*

Stadij I i II s povoljnim prognostičkim značajkama nakon kemoterapije: 20 Gy u 10 frakcija na sve inicijalno zahvaćene čvorove.

Stadij I i II s nepovoljnim značajkama nakon kemoterapije: 30 Gy u 15 frakcija. Ako je bolesnik liječen ABVDom, zračiti treba sva inicijalno zahvaćena sijela, a ako je liječen s 2 eBEACOPPa i 2 ABVDa, cijeli PET+ čvor

Proširena i relapsno-refraktorna bolest: 30 Gy u 15 frakcija na cijeli PET+ čvor, inicijalno zahvaćeno ektranodalno sijelo ili reziduum inicijalno masivne bolesti.

Preporuča se s radioterapijom započeti 4-6 tjedna po završetku kemoterapije. Ukoliko se bolesnika zrači nakon ATKS, RT treba primijeniti čim se bolesnik oporavi od akutnih nuspojava ASCT-a, idealno

u roku od 6 tjedana nakon infuzije matičnih stanica.

### **Nodularna limfocitna predominacija (NLPHL)**

Ako se RT upotrebljava kao jedini modalitet liječenja, CTV mora obuhvatiti GTV i suspektnu subkliničku bolest uz dodatak margine ovisno o kliničkoj situaciji. Primjenjuje se ukupna doza 30 Gy u 15 frakcija.

### **Indolentni NHL**

Preporučena doza za potencijalno kurativnu RT (st. I i ev. II) i dužu kontrolu bolesti (nakon imunoterapije) je 24 Gy u 12 frakcija. Doza od 4 Gy u 2 frakcije je pogodna za anatomske osjetljiva područja, bolesnike starije životne dobi i palijativnu, odnosnu simptomatsku RT. 2/3 pacijenata zračenih s 4 Gy postiže dugotrajnu lokalnu kontrolu bolesti. U slučaju masivne bolesti s mogućom progresijom i oštećenjem funkcije organa, doza se može povećati na 30 Gy.

Lokalizirani ektranodalni limfomi marginalne zone

- CTV: cijeli zahvaćeni organ (želudac, slinovnice, štitnjača, orbita)
- Parcijalna iradijacija organa: pluća, koža, dojka kod mlađih pacijentica
- GTV: PET pozitivne lezije i PET pozitivni limfni čvorovi
- TD 24-30 Gy

### **Agresivni NHL**

U prvoj liniji liječenja lokalizirane bolesti nakon sustavnog liječenja, polje zračenja treba obuhvatiti mjesto inicijalno zahvaćeno tumorom i/ili vidljivu tumorsku masu. Preporuča se ISRT u ukupnoj dozi od 30 Gy u 15 frakcija. U bolesnika s proširenom bolesti treba nakon sustavnog liječenja ozračiti: 1) reziduum inicijalno velike tumorske mase; 2) inicijalno zahvaćena ektranodalna sjela (vidi preporuke za sustavno liječenje) i 3) PET+ čvorove ili ektranodalna sjela. Preporuča se ISRT 30- 45 Gy u 15 frakcija.

U slučaju relapsno-refraktorne bolesti koja je dobro odgovorila na sustavno liječenje, preporučena doza je 30-40 Gy. Bolesnike koji su autotransplantirani treba ozračiti čim se bolesnik oporavi od akutnih nuspojava transplantacije, unutar 6-8 tjedana od infuzije matičnih stanica, dozom 20-30 Gy ovisno o mjestu bolesti i prethodnoj izloženosti radioterapiji. Kod bolesnika s refraktornom bolesti koji nisu za transplantaciju, može se doza povećati na 40- 55 Gy. U palijativne svrhe se može primijeniti

i doza od 4 Gy u 1-2 frakcije ili 30 Gy u 10 frakcija.

Primarni B-velikostanični limfom središnjeg živčanog sustava (PCNSL)

Primarno je liječenje sustavnom terapijom. Preporuča se personalizirani pristup pacijentu i multidisciplinarna odluka o RT. U bolesnika koji su po nalazu MR u KR, a treba im zračenje, preporuča se ozračenje cijelog mozga s 24 Gy (12x2 Gy ili 13x1,8Gy). U bolesnika koji nisu postigli KR treba cijeli mozak ozračiti s 30 - 36 Gy nakon čega se može provesti boost na zahvaćena područja (ili cijeli mozak) do 45 Gy.

Ukoliko je RT primarno liječenje kod bolesnika koji nisu kandidati za KT: doza je 40 do 50 Gy

CTV bi trebao uključivati cijeli mozak te 1 ili 2 gornja cervikalna kralješka i stražnju stranu oka (optički živac i retina se smatraju dijelom CNS-a pa polje treba uključivati stražnje dijelove orbita iako nema dokaza bolesti oka). Ukoliko su oči primarno zahvaćene, oba oka trebaju u cijelosti biti uključena u polje.

Ektranodalni DLBCL

RT cijelog organa: CTV je cijeli zahvaćeni organ (želudac, štitnjača, dojka)

RT dijela organa: kada je bolest dobro definirana i unifokalna. CTV je volumen tkiva zahvaćenog prije KT (duge kosti, pluća, koža, dojka kod mlađih pacijentica)

Primarni DLBCL testisa

Nakon provedenog sustavnog liječenja, ozračiti kontralateralni testis ukupnom dozom 30 Gy u 15 frakcija.

NK/T stanični limfom, nazalni tip

RT je osnovna komponenta liječenja lokalizirane bolesti. Treba je primijeniti rano u tijeku liječenja, prije sustavne terapije ili nakomn 1-2 ciklusa (sendvič). Primjenjuju se doze  $\geq 50$  Gy.

CTV: zahvaćena nosna šupljina i susjedne strukture (visoki rizik submukoznog širenja). Treba zračiti cijelu zahvaćenu šupljinu s priležećim strukturama (prošireni ISRT).

**Primarni kožni limfomi**

MZL, FL kože, primarni kutani limfom centra folikula, ALCL : TD 24 – 30 Gy

Mycosis fungoides/Sezary sy: pojedinačne lezije TD 8-12 Gy u 2-3 frakcije; solitarna lezija: 24- 30 Gy

## Morfološka dijagnostika limfoma

**Koordinator: Slavko Gašparov**

**Izjestitelji: Slavko Gašparov, Snježana Dotlić, Ivana Ilić, Ita Hadžisejdić, Biljana Jelić Puškarić, Zoran Šiftar, Margareta Radić Antolic, Ivana Franić Šimić**

Povećani limfni čvor ili tumorsko tkivo sumnjivo na limfom potrebno je punktirati tankom iglom (FNA). Citološki nalaz klasificira se kao benigna promjena, suspektni limfom ili limfom. U slučajevima citoloških nalaza koji govore za limfom ili su suspektni, kao i u slučajevima kada citološki nije moguće doći do adekvatnog uzorka, bolesnika treba uputiti kirurgu radi ekstirpacije limfnog čvora ili ekscizije tumorskog tkiva. U centrima u kojima je to moguće u bolesnika s citološkim nalazom suspektim na limfom može se prije ekstirpacije čvor ponovno punktirati i uzeti materijal za protočnu citometriju (FC). Negativan nalaz potvrđuje benignu etiologiju limfadenopatije pa čvor nije potrebno bioprirati.

Dijagnoza i klasifikacija limfoma provodi se patohistološkom analizom ekstirpiranog čvora ili tumorskog tkiva prema kriterijima klasifikacije limfoma SZO-a (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC: Lyon 2022). S obzirom na trenutno postojanje paralelne klasifikacije limfoma ICC-a (The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms) dogovoreno je s hematolozima da se u patohistološkom nalazu privremeno navode nazivi limfoma prema obje klasifikacije (ukoliko postoji razlika). Ako se uzorci za patohistološku analizu uzimaju endoskopski (želudac, crijevo, pluća i sl.), treba uzeti što više uzoraka, a najmanje pet. Kod sumnje na kožni limfom poželjno je uzeti više lezija različite starosti te patolozima dostaviti podatke o eventualnoj prethodnoj lokalnoj primjeni lijekova. Dijagnoza limfoma postavlja se na uzorku dobivenom iglenom biopsijom limfnog čvora ili tumora iznimno, u slučajevima kada kliničko stanje pacijenta ne dopušta ekstirpaciju limfnog čvora ili eksciziju tumorskog tkiva, odnosno kada bi se zbog nedostupnosti tumora do većeg uzorka moglo doći samo radikalnijim kirurškim zahvatom. Dijagnoza relapsa limfoma može se postaviti na temelju citološke punkcije i analize ako nema sumnje na transformaciju ili promjenu tipa limfoma. U slučajevima kod kojih se citološki postavlja sumnja na transformaciju, potrebno je postupiti kao i pri postavljanju primarne dijagnoze, tj. ekstirpirati limfni čvor ili tu-

morsko tkivo. Analizom uzorka dobivenog iglenom biopsijom ne može se sa sigurnošću postaviti dijagnoza pojedinih limfoma (tzv. limfoma sive zone, folikularnog limfoma, klasičnog Hodgkinovog limfoma i sl.). Kad god je to moguće, u centrima koji se bave hematopatologijom treba na Zavod/Odjel patologije dostaviti svježi (nefiksirani) uzorak tkiva. Uzorke tkiva treba fiksirati u neutralnom formalinu u trajanju od 12 do 36 sati, uklopiti jedan uzorak u jednu parafinsku kocku. Preporučuje se čitav uzorak uklopiti u odgovarajući broj parafinskih blokova. Nakon analize histoloških HE (hemalaun-eozinskih) preparata određuje se parafinska kocka na kojoj će se raditi imunohistokemijska analiza (IHC) i/ili FISH. U slučaju kada se uzorci šalju na konzultaciju iz manjih centara potrebno je poslati sve parafinske kocke s dostupnim kliničkim i laboratorijskim podacima u jedan od centara koji se bave dijagnostikom limfoma (KBC Zagreb, KB Merkur, KBC Osijek, KBC Rijeka, KBC Split, KB Dubrava). Za dijagnozu limfoma potrebna je opsežna imunohistokemijska obrada, a sve češće i molekularne metode dijagnostike. Osim navedenog još je važniji iskusan patolog. U većini zapadnih razvijenih zemalja pokazalo se korisnim da se dijagnostika ovih tumora centralizira, tj. analizira u nekoliko visokospecijaliziranih, adekvatno opremljenih centara. Prema neslužbenim preporukama francuskih i engleskih društava patolog se može smatrati stručnjakom u ovom području ako ima najmanje 200 pregledanih i dijagnosticiranih limfoma godišnje.

Kvalitetu imunohistokemijske analize potrebno je kontinuirano kontrolirati, a svako novo protutijelo adekvatno testirati i u laboratoriju primjenjivati uz obavezno provođenje pozitivnih i negativnih kontrola. Svaki centar hematopatološke dijagnostike stoga treba provoditi internu i vanjsku kontrolu kvalitete

### Dodatne metode u morfološkoj dijagnostici limfoma

Osim imunohistokemijske obrade te prema potrebi protočne citometrije u dijagnostici pojedinih entiteta potrebno je učiniti i FISH analizu radi dokazivanja citogenetskih promjena koje su od dijagnostičkog i/ili prognostičkog značenja (tablica 1).

Prema klasifikaciji limfoma SZO-a za definitivnu i točnu dijagnozu nekih entiteta potrebno je dokazati i prisutnost infekcije EBV metodom *in situ* hibridizacije (ISH–EBV, EBER) (tablica 2). Određivanje klonalnosti potrebno je učiniti isključivo na traženje patologa ako na temelju ostalih raspoloživih analiza i metoda nije sigurno radi li se o limfomu ili reaktivnoj leziji. Određivanje preuredbe gena za teški i laki lanac imunoglobulina, dokazivanje B-klonalnosti (IgH i IgK), određivanje preuredbe gena za lance  $\beta$  i  $\gamma$  T-staničnog receptora (TCR $\beta$  i TCR $\gamma$ ) te dokazivanje T-klonalnosti treba raditi prema važećim protokolima velikih centara.

Prema kriterijima klasifikacije limfoma SZO-a za postavljanje dijagnoze sve većeg broja limfoma potrebna je metoda sekvenciranja nove generacije (NGS) koja nije uvedena u RH za potrebe dijagnostike ovih tumora. S obzirom na godišnji broj limfoma u Hrvatskoj prijedlog je Radne skupine laboratorijske dijagnostike sa sastanka održanog u sklopu Hrvatskog konsenzusa dijagnostike i liječenja limfoma održanog u rujnu 2022. godine da se ova metoda što hitnije uvede i radi na jednom mjestu za potrebe svih šest centara koji se bave dijagnostikom limfoma. Mišljenje je članova skupine da je KBC Zagreb kao naš najveći centar najbolje mjesto za uvođenje ove metode. Neki od limfoma za čiju dijagnozu je često potrebna metoda NGS-a prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 1. FISH analiza neophodna pri postavljanju dijagnoze nekih vrsta limfoma.**

Limfom malih limfocita/kronična limfocitna leukemija  
del 11q (ATM)  
del 17p (p53)  
del 13q14, +12

MALT-limfom (ekstranodalni limfom marginalne zone)  
t (11;18) (q21;q21) - API2-MALT1

Folikularni limfom  
t (14;18) – IGH/BCL2  
IRF4 (FL, blastoidni/veliki centroцити MUM1+ vs DLBCL IRF4)

Limfom plaštenih stanica  
t(11;14)(q13;q32) – IGH-CCND1 (samo kod cyclin D1 neg. slučajeva)  
CCND2/CCND3

Difuzni B velikostanični limfom  
BCL2, BCL6, MYC

ALCL, ALK negativan  
IRF4/DUSP2  
TP63

Burkitt limfom – IGH-MYC  
DLBCL s aberantnim 11q, 1q23q24 del/amp

**Tablica 2. Neke od limfoproliferativnih bolesti/limfoma kod kojih je nužno dokazati infekciju EBV-om.**

EBV+ difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL)  
DLBCL povezan s kroničnom upalom  
Limfomatoidna granulomatoza  
Plazmablastični limfom  
Posttransplantacijski limfoproliferativni poremećaj  
Drugi limfoproliferativni poremećaji povezani s jatrogenom imunodeficijencijom (npr. terapijom metotreksatom)  
Mukokutani ulkus

**Tablica 3. Neki od limfoma kod kojih je nužna analiza sekvenciranja nove generacije (NGS)**

Limfomi folikularnog T helper fenotipa (FTH/nFTH)  
RHOA, IDH2, TET2, DNMT3A

Refraktora celijakija/S enteropatijom povezan T limfom (RCD/EATL)  
STAT3, JAK1

Monomorfni epitelotropni T limfom (MEITL)  
SETD2, STAT5B, JAK3

Supkutani panikulitisu sličan T limfom (SPTCL)  
HAVCR2

Limfoplazmocitoidni limfom/Waldenstromova makroglobulinemija (LPL/WM)  
MYD88 (90%), CXCR4 (40%)

Folikularni limfom (FL), Folikularni limfom CD23+  
EZH2, STAT6, TNFRSF14

Limfom plaštenih stanica (MCL)  
TP53 mut

## Rezultati liječenja R-DA-EPOCH-om u starijih bolesnika s prognostički nepovoljnim B-velikostaničnim limfomom – Krohemovo istraživanje

Zdravko Mitrović<sup>1,2</sup>, Dino Dujmović<sup>3</sup>, Ozren Jakšić<sup>1,2</sup>, Sandra Bašić Kinda<sup>3</sup>, Petar Gačina<sup>4</sup>, Vlatka Periša<sup>5</sup>, Željko Prka<sup>1</sup>, Barbara Dreta<sup>3</sup>, Davor Galušić<sup>6</sup>, Hrvoje Holik<sup>7</sup>, Vlatko Pejša<sup>1,2</sup>, Igor Aurer<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti KB Dubrava;

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

<sup>3</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb;

<sup>4</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Sestre Milosrdnice i Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu;

<sup>5</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Osijek i Medicinski fakultet Sveučilišta „Josip Juraj Strossmayer“ u Osijeku;

<sup>6</sup> Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Split i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

<sup>7</sup> Odjel za hematologiju i onkologiju, Dr. Josip Benčević, Slavonski Brod

### Uvod

Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL) je najčešći tip agresivnog ne-Hodgkinovog limfoma (NHL). Medijan dobi pojavnosti je oko 66 godina. Za procjenu rizika bolesti koristi se međunarodni prognostički indeks (IPI) odnosno njegova izvedenica prema dobi - aaIPI (age-adjusted International Prognostic Index) koja se sastoji od tri varijable udružene s nepovoljnom prognozom: stadij III i IV po Ann Arboru, povišen LDH (laktat dehidrogenaza) i opće stanje bolesnika – performance status (PS) po ECOG-u (Eastern Cooperative Oncology Group) 2 ili više. Ne postoji konsenzus kako liječiti visokorizične limfome, ali generalni je stav da bi terapija trebala biti intenzivnija od standardnog R-CHOP-a.<sup>1</sup> Intenziviranje terapije je posebno izazovno u starijih bolesnika koji su ionako zbog dobi i komorbiditeta podložniji toksičnosti. R-DA-EPOCH je protokol razvijen na NCI (National Cancer Institute) u kojem se (pored standardnog rituksimaba, kortikosteroida i ciklofosfamida), etopozid, vinkristin i doksorubicin daju u kontinuiranoj infuziji kroz 96h što dovodi pojačanog uništavanja tumorskih stanica, a istodobno je kardiotoksičnost manja zbog produljene primjene doksorubicina.<sup>2</sup> K tome, riječ je o dinamičkom protokolu gdje se doza prilagođava ovisno o hematopoetskoj rezervi bolesnika (tj. broju neutrofila i trombocita). Sve to ga čini potencijalno dobrim izborom za primjenu kod starijih bolesnika.

### Bolesnici i metode

Retrospektivno smo skupili podatke iz šest hrvatskih bolnica koje su primjenjivale R-DA-EPOCH (KB Dubrava, KBC Zagreb, KBC Sestre Milosrdnice, KBC Osijek, KBC Split, OB Josip Benčević Slavonski Brod). Kriteriji za uključivanje su bili dob

iznad 60 godina, aaIPI 2 ili 3, dok su bolesnici s „double hit“ i limfomom poveznim s HIV-om bili isključeni. Terapija je primjenjivana u standardnoj dozi, korišteni su standardni kriteriji bazirani na CT-u te uobičajene statističke metode.

### Rezultati

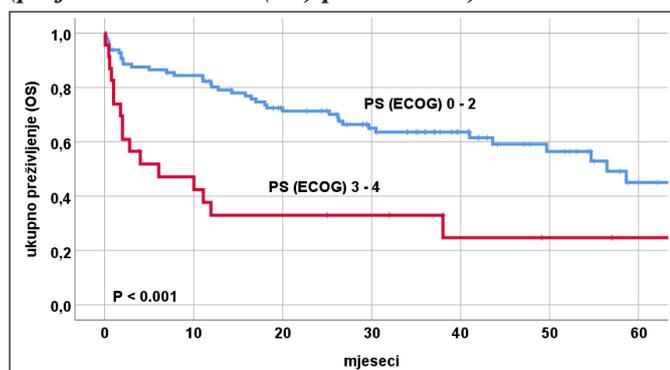
Između veljače 2011. i veljače 2020., ukupno 120 bolesnika u 6 navedenih bolnica je primilo 592 ciklusa R-DA-EPOCH-a. Liječeno je 62 muškarca (52%) i 58 (48%) žena, a medijan dobi bio je 69 godina (raspon između 60 i 82 godine). Ukupno 81 bolesnik imao je aaIPI 2 dok je 39 bolesnika imalo aaIPI 3. Medijan broj ciklusa bio je 6 (raspon 1 – 8), a medijan trajanja ciklusa 24.7 dana. Doze su barem jednom eskalirane u 50 bolesnika (od čega dvostruka eskalacija u 28 bolesnika) od 101 bolesnika koji su dobili barem dva ciklusa. Za jednog bolesnika nije bilo podataka o eskalaciji, dok preostalih 18 nije dobilo drugi ciklus (13 zbog smrti, 5 zbog promjene modaliteta liječenja). Ukupno je 15 (12.5%) bolesnika promijenilo terapiju na ambulantni protokol sličan R-CHOP-u.

Toksičnost je bila značajna, 94% bolesnika imalo je hematološku toksičnost 3. ili 4. stupnja. Ukupno 37% bolesnika imalo je neutropeničnu vrućicu barem jedanput, dok ih je 12% imalo multiple epizode. Ozbiljne infekcije (3-5. stupanj) zabilježene su u 26% bolesnika. Periferna neuropatija gr. 2 i više, javila se u 21% bolesnika, a tromboembolijske komplikacije (uglavnom vezane uz venske katetere) su zabilježene u 14% bolesnika. Nešto rjeđe su bile kardiovaskularne komplikacije (10%) i krvarenja iz probavnog sustava (5%). Pet bolesnika imalo je sekundarne tumore. Smrtnost od komplikacija bila je značajna. Od 23 bolesnika koja su umrla tijekom

liječenja, 16 (13%) ih je umrlo od komplikacija i to uglavnom u prvom ciklusu (9 bolesnika), najviše od infekcija (11 bolesnika). Deset od 16 umrlih bolesnika bili su oni s lošim općim stanjem (23 bolesnika su imala PS 3 ili 4 na početku liječenja) što je statistički značajna razlika u mortalitetu ( $P < 0.001$ ).

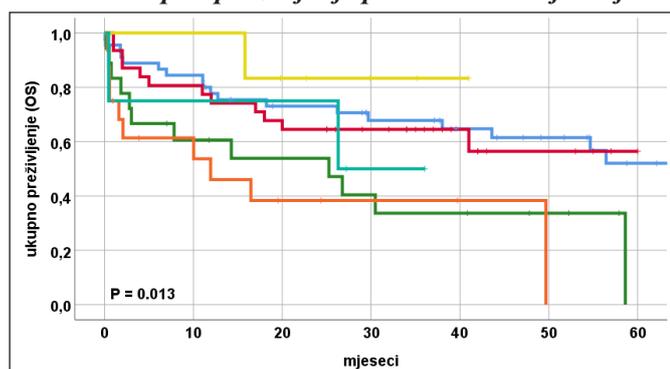
Kompletna remisija je postignuta u 59% bolesnika, parcijalna remisija u 15%, 4% bolesnika imalo je stabilnu bolest, a 4% progresiju. Nakon medijana praćenja od 27 mjeseci, 63 bolesnika je živo. Procijenjeno trogodišnje ukupno preživljenje (OS) i preživljenje bez progresije bolesti (PFS) je 58 odnosno 53%. Bolesnici s aaIPI 2 imali su bolji PFS, ali ne i značajnu razliku u OS. Najveća razlika bila je prema PS-u, pri čemu su bolesnici s PS 0-2 imali bolji ishod u odnosu na one s PS 3-4: 3-godišnji OS je bio 64% prema 33%, a PFS 58% prema 32% ( $P < 0.001$ ) (slika 1).

**Slika 1. Ukupno preživljenje prema stanju bolesnika (performance status (PS) po ECOG-u)**



Drugi parametri aaIPI nisu bili značajni, kao niti spol, B-simptomi, masivna bolest. Dob veća ili manja od 70 godina je utjecala na OS, ali ne na PFS. Dvije varijable vezane uz samo liječenje su značajno utjecale na preživljenje. Prvo, eskalacija doze pokazala je trend ka boljem preživljenju, a ono je doseglo statističku značajnost ako se gledaju svi bolesnici. Drugo, postojale su razlike u preživljenju među centrima (slika 2).

**Slika 2. Ukupno preživljenje prema centru liječenja**



Suprotno tome, trajanje ciklusa nije utjecalo na preživljenje kao niti prelazak na R-CHOP-u slične protokole. Naposljetku u multivarijantnoj analizi, centar liječenja i PS su zadržali statističku značajnost (omjer rizika (HR) 2.93 odnosno 2.36, 95% interval pouzdanosti).

## Rasprava i zaključak

U ovoj multicentričnoj retrospektivnoj studiji iz stvarnog života uključen je velik broj bolesnika s visokorizičnim DLBCL-om starijih od 60 godina što prema našem saznanju predstavlja najveću seriju takvih bolesnika. Iako je preživljenje komparabilno studiji GELA grupe<sup>3</sup> gdje su stariji bolesnici liječeni R-CHOP-om imali 2-g PFS i OS 57% odnosno 70%, treba uzeti u obzir da su u našoj seriji liječeni bolesnici s visokom rizikom. Stoga možemo zaključiti da R-DA-EPOCH ipak može neutralizirati nepovoljne prognostičke faktore inkorporirane u aaIPI. To je jednim dijelom potvrdila i randomizirana studija R-CHOP-a i R-DA-EPOCH-a koja, iako nije našla razlike u preživljenju, ipak je pokazala trend boljeg PFS kod bolesnika s visokim IPI.<sup>4</sup> Međutim, R-DA-EPOCH nije blag protokol, toksičnost je značajna, a to posebno vrijedi za bolesnike s lošim općim stanjem (PS 3-4) koji su imali visok mortalitet vezan uz liječenje. K tome, R-DA-EPOCH nije ni praktičan protokol jer zahtijeva stabilan venski put i hospitalizaciju (barem u našim uvjetima) pa je 12.5% pacijenata ipak prešlo na ambulantni protokol. Nedostatci naše studije su da su bolesnici liječeni u razdoblju od devet godina te da nismo koristili niti jedan oblik gerijatrijske procjene, što se sada preporučuje u smjernicama.<sup>5</sup> No, naša studija potvrdila ključnu ulogu selekcije bolesnika, važnost dizanja doze kod bolesnika koji to toleriraju te, pomalo neočekivano, ukazala i na utjecaj centra koji daje terapiju.

Zaključno, R-DA-EPOCH je učinkovit, ali toksičan protokol kod starijih bolesnika s DLBCL. Bolesnici koji su relativno dobrog općeg stanja (PS 0-2) i mogu podnijeti dizanje doze će imati najviše koristi. Obrnuto, bolesnici lošeg stanja imaju veliku toksičnost i zapravo im je bolje dati neku blažu terapiju. Testovi gerijatrijske procjene bi pomogli u boljoj selekciji bolesnika te su zato su navedeni u novim Krohemovim smjernicama za liječenje limfoma.

*Napomena:* Ovo je pisana verzija predavanja koje je održano na proljetnom Krohemu 2022. godine, ekstenzivna publikacija će biti predana u međunarodni indeksirani časopis.

**Literatura:**

1. Hill BT, Kahl B. Upfront therapy for diffuse large B-cell lymphoma: looking beyond R-CHOP. *Expert Rev Hematol.* 2022;15: 805-812.
2. Wilson WH, Grossbard ML, Pittaluga S, et al. Dose-adjusted EPOCH chemotherapy for untreated large B-cell lymphomas: a pharmacodynamic approach with high efficacy. *Blood.* 2002; 99: 2685-2693.
3. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002; 346: 235-242.
4. Bartlett NL, Wilson WH, Jung SH, et al. Dose-Adjusted EPOCH-R Compared With R-CHOP as Frontline Therapy for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical Outcomes of the Phase III Intergroup Trial Alliance/CALGB 50303. *J Clin Oncol.* 2019; 37: 1790-1799.
5. Buske C, Hutchings M, Ladetto M, et al. ESMO Consensus Conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for the clinical management of the elderly patient with malignant lymphoma. *Ann Oncol* 2018; 29: 544-562.

## Biopsija širokom iglom u dijagnostici limfoma

Ivana Ilić

*Klinički zavod za patologiju i citologiju, KBC Zagreb*

Biopsije širokom iglom ili „core“ biopsije uvedene su među dijagnostičke postupke sredinom 80-tih godina 20. stoljeća i vrlo brzo su postale popularne zbog dobrog omjera uloženog i vraćenog kako u financijskom tako i u medicinskom, ali i socialnom smislu jer su znatno skratile vrijeme čekanja na zahvat biopsije i smanjile troškove potrebne za organizaciju sale, kirurga, anesteziologa i pridruženog osoblja, a osigurale relativno veliku točnost dijagnoze (1). Danas je biopsija širokom iglom neizostavna u dijagnostici bolesti dojke, prostate i koštane srž, no u dijagnostici nekih drugih bolesti nisu dobro prihvaćene kao na primjer u dijagnostici koštanih i mekotkivnih tumora gdje su na vidjelo izašli i ne toliko brojni ali ključni nedostaci (2).

U Kliničkom bolničkom centru Zagreb, kao i u ostatku Svijeta, pratimo porast broja biopsija širokom iglom u svrhu dijagnosticiranja limfoproliferativnih bolesti zadnjih dvadesetak godina. U 1999. godini napravljeno je 8 biopsija limfnog čvora širokom iglom, dok je broj ekstripiranih limfnih čvorova za istu svrhu bio deset puta veći. Sličan se omjer zadržao do 2009. godine dok je 2010. godine taj omjer narastao na 1:1. U 2020. godini omjer ekstripiranih limfnih čvorova i biopsija širokom iglom iznosi 1:1,1.

Igle kojima se radi biopsija imaju duljinu 2 cm i različit raspon promjera lumena što znači da se dobivaju uzorci različitih volumena. Za potrebe hematološke dijagnostike optimalne su one sa širinom lumena 0,7 do 1,8 mm što označava igle od 11 do 18 Gaugea. Biopsija ovom iglom uključuje i kontrolu slikovnom metodom (ultrazvuk ili CT).

Ukoliko se biopsija limfnog čvora izvodi iglom od 14G dobije se uzorak volumena 20 mm<sup>3</sup> što je u usporedbi s povećanim limfnim čvorom dimenzija 2:1,5:1 cm oko 100 puta manji volumen. Da bi se osigurao veći pregledani udio limfnog čvora uzima se više cilindara. U našoj ustanovi se pod kontrolom ultrazvuka iglom debljine 16G uzima 8 do 10 cilindara što povećava pregledani volumen limfnog čvora (10% ukupnog volumena limfnog čvora) i smanjuje mogućnost dijagnostičke pogreške. Na žalost, pod kontrolom CT se iglom 18 ili 20 G uzimaju dva cilindra što znači ukupan volumen otprilike 20 mm<sup>3</sup>, odnosno 1% ukupnog volumena limfnog čvora.

Biopsija limfnog čvora radi se u slučaju kad postoji sumnja da je limfni čvor zahvaćen tumorom jer je povećan ili je sumnjivog izgleda na ultrazvuku, odnosno pokazuje sumnjivu aktivnost na PET-CT-u. U slučaju da postoji dvojba radi li se o limfomu ili karcinomu ova se dvojba može razriješiti čak i kad je volumen uzorka mali. No kad je potrebno razriješiti dvojbu radi li se po reaktivnoj promjeni limfnog čvora ili limfom te u većini slučajeva o kojem se pod tipu limfoma radi čak i veći volumen uzorka ne osigurava uvijek i točnu dijagnozu. Za postavljanje dijagnoze limfoproliferativne bolesti nužno je analizirati oblik limfnog čvora, vezivnu čahuru, arhitekturu limfnog čvora te svakog odjeljka parenhima kao i morfologiju, odnosno, fenotip stanica koje ga tvore. Prva tri navedena elementa nije moguće procijeniti iz biopsije dobivene tankom iglom. U većini slučajeva, osim ako se ne radi o limfnom čvoru uredne histološke građe ili folikularnoj hiperplaziji s manjim folikulima u kojima se vidi njihova građa te izgled i sastav interfolikularnog prostora, teško je uočiti nodularan izgled pa su česte pogreške u interpretaciji rasta tumorskih stanica u limfnom čvoru.

Nalaz difuznog rasta velikih atipičnih limfocita znači dijagnozu difuznog velikostaničnoga limfoma, no velike stanice koje oblikuju nodule znače dijagnozu folikularnog limfoma. Morfologija stanica i fenotip stanica je identičan u oba slučaja i neće pomoći u razrješavanju diferencijalno dijagnostičke dvojbe. U tom slučaju neće biti moguće postaviti definitivnu dijagnozu, već će u dijagnostičkom zaključku stajati: radi se o agresivnom limfomu, diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze difuzni velikostanični limfom ili folikularni limfom visokog gradusa. Nalaz nodularnog rasta tumorskog tkiva u limfnom čvoru ključno je i pri postavljanju dijagnoze nodularne limfocitne predominacije Hodgkinovog limfoma kojoj je temeljna karakteristika nodularan rast tumorskih stanica. Glavna diferencijalna dijagnoza je velikostanični limfom bogat T limfocitima i histiocitima koji se od nodularna limfocitna predominacija je razlikuje s difuznim rastom tumorskih stanica. Morfologija i fenotip tumorskih stanica, a većinom i stanice koje čine tumorski okoliš, su identične.

Nalaz Reed Sternbergovih stanica koje imaju karakterističan izgled i fenotip potvrđuje dijagnozu klasičnog Hodgkinovog limfoma, no svaki iskusan patolog je svjestan da se ovakav tip stanica (iste morfologije i fenotipa) može naći kao vrsta pozadinskih stanica u perifernom T staničnom limfomu, angioimuoblastičnom limfomu, folikularnom limfomu. Pa čak i onda kad smo sigurni da se radi o klasičnom Hodgkinovom limfomu, ne možemo ga pravilno subklasificirati samo na temelju izgleda i fenotipa tumorskih stanica jer svi podtipovi klasičnog Hodgkinovog limfoma imaju isti fenotip. Razliku između pojedinih podtipova čini raspored tumorskih stanica, izgled čahure, pristunost nodula, vrsta stanica u pozadini tumora. Kriteriji za postavljanje dijagnoze nodularne skleroze su: zadebljana čahura, noduli okruženi skleroziranim vezivom i lakunarne stanice. Da bismo postavili dijagnozu nodularne skleroze moramo imati dva od tri kriterija. U biopsiji širokom iglom od svih kriterija možemo vidjeti lakunarne stanice.

Ovo su samo neki od primjera U kojima se ne može sa sigurnošću diferencirati dva ili više entiteta tek kad se ne može sa sigurnošću procijeniti podtipa limfoma.

Biopsija širokom iglom je korisna, jeftina i kvalitetna metoda koja svakako ima mjesto u dijagnostici tumora različitih lokalizacija pa tako i u dijagnostici limfnih tkiva i organa. U kliničkom bolničkom centru Zagreb posljednjih 10-tak godina prati se porast broja uzoraka dobivenih širokom iglom te je postala dominantna metoda u patohistološkoj dijagnostici limfoma. U objavljenim studijama koje su napravljene u velikim tercijarnim zdravstvenim ustanovama točnost dijagnoze bila je između 85 % i 87 % što znači da niti veći volumen uzorka kao ni iskustvo patologa koji analizira uzorak ne osigurava uvijek točnu dijagnozu. Iz uzorka malog volumena teško je ponekad razlikovati reaktivan proces od indolentnog limfoma. Pa i kad smo sigurni da se radi o limfomu, točna dijagnoza znači da je naveden tip i podtip limfoma prema službenoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije. U velikom broju slučajeva nije moguće točno subtipizirati limfom jer ovako mali uzorak uglavnom onemogućava dodatne, a nužne molekularne metode, a ponekad nije dovoljan niti za najnužnija imunohistokemijska bojenja.

S obzirom na malobrojne ali ključne nedostatke bipsije širokom iglom optimalnim uzorkom za dijagnozu limfoma još uvijek se smatra ekstirpirani limfni čvor, dok se biopsija širokom iglom preporuča kao metoda u praćenju bolesnika sa sumnjom na

povrat bolesti ili kao inicijalna metoda u dijagnostici limfoma kod kirurški teško dostupnih lokalizacija ili bolesnika s teškom kliničkom slikom koji ne mogu podnesti invazivni kirurški zahvat.

#### Literatura:

1. Whitney A, Lachar, MD; Imran Shahab, MD; A. Joe Saad, MD Accuracy and Cost-Effectiveness of Core Needle Biopsy in the Evaluation of Suspected Lymphoma Arch Pathol Lab Med. 2007;131:1033–1039.
2. Loubeyre P, McKee TA, Copercini M, Rosset A and Dietrich P-Y. Diagnostic precision of image-guided multisampling core needle biopsy of suspected lymphomas in a primary care hospital. British Journal of Cancer.2009;100: 1771–1776. doi:10.1038
3. Ahuja A, Ying M, Yang WT, Evans R, King W, Metreweli C. The use of sonography in differentiating cervical lymphomatous lymph nodes from cervical metastatic lymph nodes. Clin Radiol. 1996; 51:186–190.
4. Hu Q, Naushad H, Xie Q, Al-Howaidi I, Wang M, Fu K. Needle-Core Biopsy in the Pathologic Diagnosis of Malignant Lymphoma Showing High Reproducibility Among Pathologists *American Journal of Clinical Pathology*. 2013;140:238–247, doi.org:10.1309
5. Itoa Y et al. Use of Core-Needle Biopsy for the Diagnosis of Malignant Lymphomas in Clinical Practice. *Acta Haematol*. 2021;144:641–648. DOI: 10.1159/000516589

## Određivanje TP53 mutacija u kroničnoj limfocitnoj leukemiji

Branimir Gizdić<sup>1,2</sup>, Ivona Arić<sup>2</sup>, Katarina Marija Tupek<sup>2</sup>, Vlatko Pejša<sup>3</sup>, Rajko Kušec<sup>2,3</sup>, Ozren Jakšić<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Odjel za citologiju, Klinički zavod za patologiju i citologiju, KB Dubrava

<sup>2</sup>Odjel za molekularnu dijagnostiku i genetiku KZLD KB Dubrava

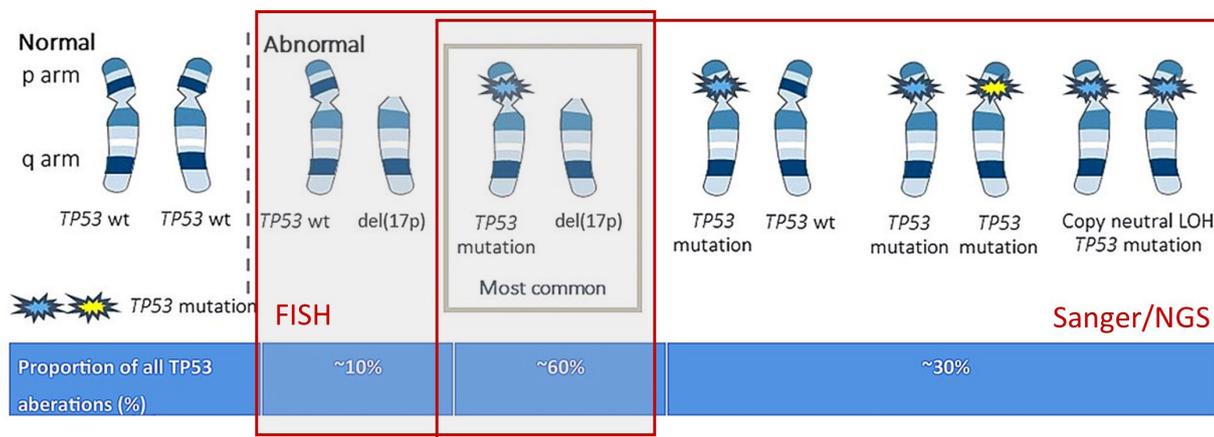
<sup>3</sup>Zavod za hematologiju KB Dubrava Zagreb

TP53 (tumorski protein p53) protein poznat i kao „čuvar genoma“ ima središnju ulogu u očuvanju stabilnosti genoma i sprečavanju mutacija. Poremećaj funkcije TP53 dovodeći do nestabilnog genoma povezan je s brojnim tumorima uključujući i hematološke (KLL, akutne leukemije, ne-hodgkinski limfomi, multipli mijelom, ...) te ima važnu ulogu u progresiji bolesti i rezistenciji na liječenje. Gen za TP53 nalazi se na kratkom kraku 17 kromosoma (17p13.1).

U kroničnoj limfocitnoj leukemiji (KLL) nefunkcionalni p53 protein povezan je s lošijom prognozom i rezistencijom na kemoterapiju, a klinička važnost TP53 aberacije kao prognostičkog i prediktivnog

čimbenika u KLL-u je pokazana u mnogim studijama. Razvoj novih lijekova koji inhibiraju B stanični signalne puteve te antiapoptotične proteine pokazali su se uspješnim u liječenju bolesnika koji nose TP53 aberacije. Iz tog razloga analiza TP53 aberacija je danas vrlo važan biomarker u KLL-u. Nefunkcionalni p53 protein nastaje zbog delecije 17p13 i/ili zbog mutacije u TP53 genu. Istraživanja su pokazala da inaktivacija TP53 lokusa zbog del17p je u više od 60% slučajeva povezana s mutacijom TP53 gena u drugom TP53 alelu dok se kod bolesnika koji nemaju deleciju 17p, mutacija u TP53 genu javlja do 30% slučajeva (Slika 1).

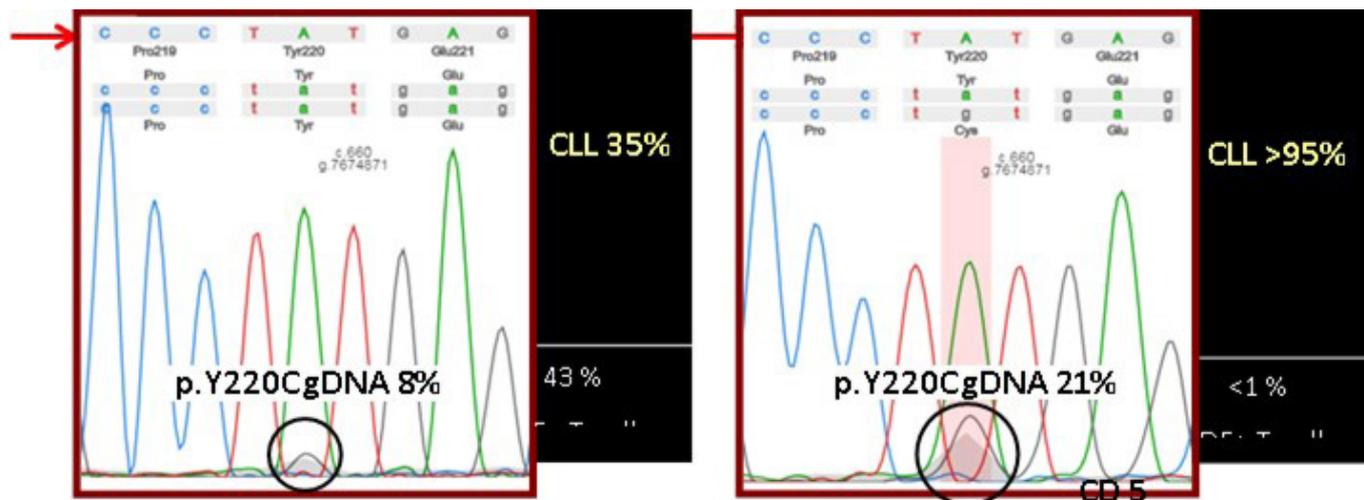
**Slika 1. Aberacije TP53 i metode detekcije (modif. prema <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.187583>)**



Obzirom na važnost aberacija TP53 kao prognostičkog i prediktivnog čimbenika te značajan udio slučajeva s aberacijom bez delecije 17p (koju detektiramo interfaznim FISH-om), analiza TP53 mutacije bi se trebala provesti svaki put prije započinjanja terapije u slučaju negativnog nalaza za 17p deleciju, bilo kod prije neliječenih bolesnika ili kod kasnijih linija liječenja zbog toga jer se TP53 mutacija može javiti na početku ili tijekom bolesti, a isto tako se može i izgubiti tijekom liječenja. Učestalost aberacija TP53 prije 1. linije liječenja može biti i do 10% dok kod idućih linija i više što ovisi i o do tada provedenom liječenju.

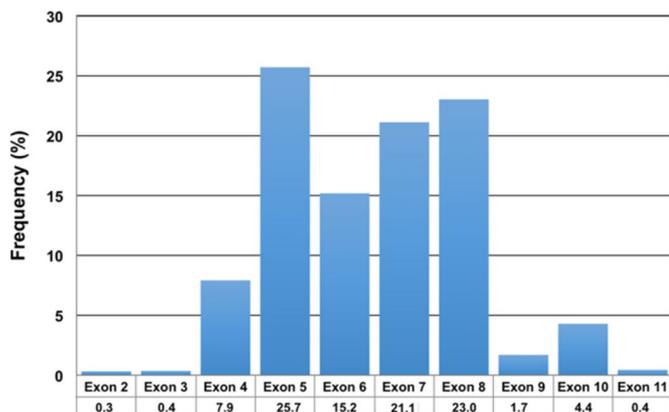
Materijal za analizu TP53 mutacije je najčešće periferna krv, međutim mogu se koristiti i drugi uzorci poput koštane srži i punktata limfnog čvora ukoliko je udio limfocita u perifernoj krvi manji od 70%. Prije izolacije DNA iz uzorka potrebno je izdvojiti mononukleare centrifugiranjem na gradijentu gustoće, te ukoliko je potrebno dodatno izdvojiti KLL limfocite pomoću magnetnih kuglica ili korištenjem staničnog sortera (Slika 2.).

**Slika 2. Razlika u rezultatima sekvenciranja između uzorka s 35% i 95% KLL limfocita. (preuzeto iz <http://www.ericll.org/wp-content/uploads/2018/02/Basic-procedures-%E2%80%93-sampling-material-Sanger-sequencing.pdf>).**



Prema preporukama sekvencirati bi se trebali minimalno egzoni 4-10 koji odgovaraju DNA vezujućoj domeni p53 proteina međutim preporuka je sekvencirati i 2. i 11. egzon da se pokrije cijela kodirajuća regija, a također je potrebno pokriti i područje +/-2-10 nukleotida prije ili nakon regije egzona čime se detektiraju mutacije unutar regije introna koje mogu dovesti do preskakanja transkripcije cijelog egzona ili transkripcije dijela introna (Slika 3.)

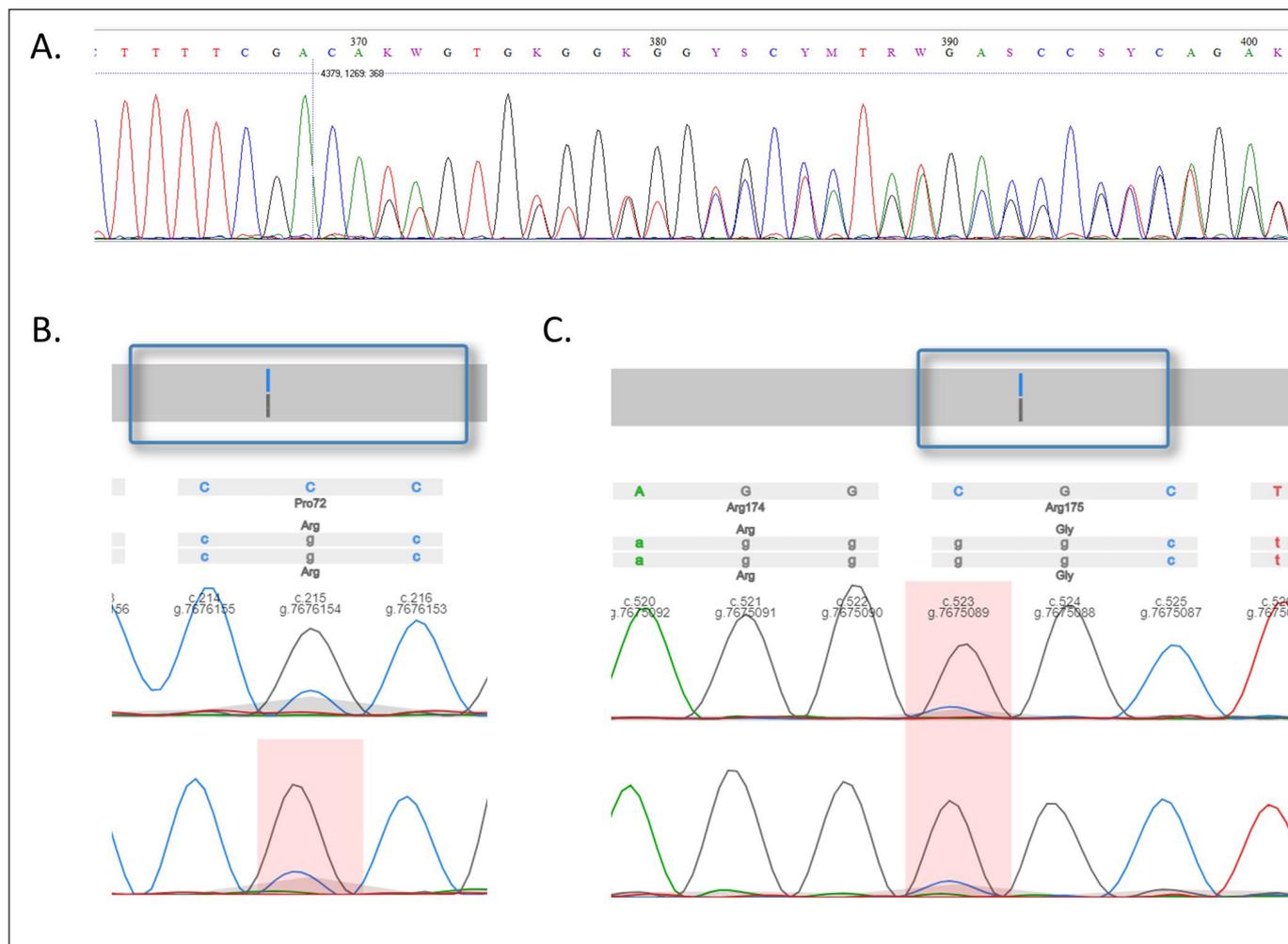
**Slika 3. Frekvencija TP53 mutacija u različitim egzonima. *Leukemia*. 2018; 32(5): 1070–1080.**



Za sekvenciranje koristimo Sanger ili NGS. Razlika između te dvije tehnologije je u osjetljivosti jer sekvenciranje po Sangeru ne može detektirati mutacije prisutne u manje od 10% stanica, dok NGS može detektirati i mutacije prisutne u 5% stanica, a u određenim slučajevima i u manjem postotku. Međutim danas je preporuka ERIC-a da se mutacije prisutne u manje od 5-10% stanica ne navode na nalazu ili ako se navode da se naglasi da nije dokazan klinički značaj tako malih mutacija na liječenje KLL-a. Prilikom interpretacije nalaza treba provjeriti TP53 baze podataka (IARC ili TP53 bazu) koje navode koje mutacije dovode do nefunkcionalnog p53 proteina. Tihe mutacije i polimorfizmi koji se javljaju i ne dovode do nefunkcionalnog p53 proteina ne prijavljuju se na nalazu.

U Kliničkoj bolnici Dubrava u srpnju 2022. počeli smo s rutinskom analizom TP53 mutacije za bolesnike s KLL-om (u skladu s protokolom po ERIC-u) i do sada je testirano 30-tak bolesnika (slika 4.). Upute za slanje uzorka za određivanje TP53 mutacija nalaze se na stranicama Krohema (<https://www.krohema.hr/kronicna-limfocitna-leukemija-kll/>). Navedena metoda uspješno je primijenjena i u drugim hematološkim neoplazmama (npr. AML-u, ...).

**Slika 4. A. mutacija u egzonu 6 – c.642\_643del, p.(His214Glnfs\*7); B. Polimorfizam u egzonu 5 - c.215C>G: p.(Pro72Arg); C. Mutacija u egzonu 5 - c.523C>G, p.(Arg175Gly)**



### Literatura:

1. Malcikova, J., Tausch, E., Rossi, D. et al. ERIC recommendations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia—update on methodological approaches and results interpretation. *Leukemia* 32, 1070–1080 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41375-017-0007-7>
2. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Döhner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood*. 2014;123:3247–54.
3. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910–6.
4. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2012;26:1458–61.

## FLT3/ITD pozitivna B-akutna limfoblastična leukemija – prikaz slučaja

Željka Tkalčić Švabek<sup>1</sup>, Martina Horvat<sup>1</sup>, Karla Mišura Jakobac<sup>2</sup>, Inga Mandac Smoljanović<sup>2</sup>,  
Mirjana Mariana Kardum Paro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinički zavod za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Klinička bolnica Merkur

<sup>2</sup> Zavod za hematologiju, Klinička bolnica Merkur

Kontakt: zeljka.tkalcic.svabek@kb-merkur.hr

### Uvod

FLT3 receptor poznat i kao Fms-slična tirozin kinaza 3 (engl. *FMS-like tyrosine kinase 3*; FLT3), fetalna jetrena tirozin kinaza 2 (engl. *Fetal liver kinase-2*; Flk-2), tirozin kinaza matičnih stanica 1 (engl. *Ser/Thr protein kinase*; STK-1) ili stanični površinski antigen CD135 (eng. *Cluster of differentiation antigen 135*; CD135) kodiran je FLT3 genom smještenim na dugom kraku kromosoma 13 (13q12). Sastoji se od pet domena sličnih imunoglobulinu u izvanstaničnoj regiji: jedne transmembranske, jukstamembranske (JM) domene, dviju tirozin-kinaznih (TK) domena i C-terminalne domene u unutarstaničnoj regiji (1). FLT3 ligand (FL, FLT3LG ili FLT3L) je član male obitelji hematopoetskih faktora rasta, koji uključuje i faktor stimulacije kolonija 1 (engl. *Colony-Stimulating Factors*; CSF-1) i faktor matičnih stanica (engl. *Stimulating Colony Factor*; SCF) poznat i kao KIT ligand (2).

FLT3 se eksprimira na hematopoetskim matičnim i progenitornim stanicama, a FL kao membranski vezan ili topiv oblik u stanicama strome koštane srži (3). U zdravoj koštanoj srži njegova je ekspresija ograničena na nezrele progenitorne stanice, uključujući CD34<sup>+</sup> stanice sa visokim razinama ekspresije staničnog površinskog antigena CD117 (c-KIT), B-limfoidne progenitorne stanice te mijeloidne prekursora i monocite. FLT3 je visoko eksprimiran u hematološkim zloćudnim bolestima uključujući akutne mijeloidne leukemije (AML) (svi podtipovi AML prema FAB klasifikaciji), akutne limfoblastične leukemije B- prekursorskih stanica (B- ALL), T- stanične ALL i kronične mijeloidne leukemije (KML) u limfoidnoj blastičnoj krizi (4).

Vežanje FL na izvanstaničnu domenu izaziva dimerizaciju FLT3, a aktivacijom dolazi do autofosforilacije i pokretanja nekoliko kaskada prijenosa signala. Signalizacija se pokreće regrutiranjem molekula za prijenos signala na aktivirani FLT3 kroz vežanje na specifične fosforilirane tirozinske ostatke u intracelularnoj regiji (5). Aktivacija FLT3 posreduje u preživljavanju stanica, staničnoj proliferaciji i diferencijaciji hematopoetskih progenitornih stanica,

te djeluje u sinergiji s nekoliko drugih citokina kako bi pospješio svoje biološke učinke. FLT3 se također eksprimira i na stanicama akutne leukemije, a FL stimulacija pojačava proliferaciju i smanjuje apoptozu (6- 7). FLT3 je u oko 1/3 pacijenata oboljelih od AML mutiran bilo unutaršnjim tandemskim udvajanjima (ITD) jukstamembranske domene (25%) ili točkastim mutacijama (5%) koje uobičajeno uključuju kinaznu domenu (engl. *Tyrosin kinase domain*; TKD), a obje vrste mutacija konstitutivno aktiviraju FLT3 (8).

### Prikaz slučaja

U radu prikazujemo slučaj 75- godišnjeg muškarca hospitaliziranog na Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice Merkur u lipnju 2022. godine kod kojeg je tijekom obrade pancitopenije u vanjskoj ustanovi postavljena sumnja na akutnu mijeloidnu leukemiju (AML).

U povijesti bolesti pacijenta opisana je arterijska hipertenzija, a od hematoloških bolesti prati se normocitna anemija unazad 10 godina. Pri fizičkom pregledu pacijent ističe stalan umor, opću slabost i malaksalost, a nalaz UZV vrata pokazuje obostrano submandibularno i parajugularno umnožene hipohogene limfne čvorove veličine do 12 milimetara.

Parametri krvne slike (KKS) određeni na brojaču krvnih stanica ukazuju na prisutnu leukopeniju (Lkc =  $1,39 \times 10^9/L$ ), normocitnu anemiju (Hb = 69 g/L, Erc =  $2,49 \times 10^{12}/L$ , MCV = 80 fL) i trombocitopeniju ( $23 \times 10^9/L$ ). U diferencijalnoj krvnoj slici (DKS) nalazi se 88% limfocita (tablica 1), a u citološkom razmazu periferne krvi 1% atipičnih blasta, 9% segmentiranih granulocita, 81% limfocita, 7% monocita, 1% promonocita i 1% plazma stanica.

**Tablica 1. Rezultati hematoloških, koagulacijskih i biokemijskih pretraga pri hospitalizaciji na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Merkur.**

Hematološki parametri			
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval
Leukociti	<b>1.39</b>	x10e9/L	3.4 - 9.7
Eritrociti	<b>2.46</b>	x10e12/L	4.34 - 5.72
Hemoglobin	<b>69</b>	g/L	138 - 175
Hematokrit	<b>0.198</b>	L/L	0.415 - 0.530
MCV	<b>80.2</b>	fL	83.0 - 97.2
MCH	28.0	pg	27.4 - 33.9
MCHC	<b>348</b>	g/L	320 - 345
RDW-KV	14.4	%	9.0 - 15.0
Trombociti	<b>23</b>	x10e9/L	158 - 424
MPV	<b>10.5</b>	fL	6.8 - 10.4
Parametri citološkog razmaza periferne krvi			
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval
Atipični blasti	<b>1</b>		
Segmentirani granulociti	<b>9</b>	44 - 72	
Limfociti	<b>81</b>	20 - 46	
Monociti	7	2 - 12	
Promonociti	<b>1</b>		
Plazma stanice	<b>1</b>		
Morfologija eritrocita: anizocitoza +, poikilocitoza +, hipokromija +			
Malo trombocita u razmazu.			
Koagulacijski parametri			
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval
PV	0.77	1	>0.70
APTV	<b>32</b>	s	22 - 28
APTV-omjer	<b>1.3</b>	omjer	0.8 - 1.2
TV	19	s	16 - 24
Fibrinogen	3.4	g/L	1.8 - 3.5
D-dimeri	<b>5.07</b>	mg/L FEU	<0.50
Biokemijski parametri			
	Rezultat	Jedinica	Referentni interval
Kalij	<b>3.3</b>	mmol/L	3.9 - 5.1
Natrij	<b>128</b>	mmol/L	137 - 146
Kloridi	104	mmol/L	97 - 108
Ukupni kalcij	<b>1.65</b>	mmol/L	2.14 - 2.53
Željezo	29	μmol/L	11 - 32
TIBC	<b>32</b>	μmol/L	49 - 72
UIBC	<b>3</b>	μmol/L	25 - 54
Saturacija transferina	<b>0.91</b>	μmol/L	0.20 - 0.55

Glukoza	4.7	mmol/L	4.4 - 6.4
Ureja	3.5	mmol/L	2.8 - 8.3
Standardizirani kreatinin	<b>56</b>	μmol/L	64 - 104
Urat	186	μmol/L	182 - 403
Ukupni bilirubin	<b>21</b>	μmol/L	3 - 20
Aspartat-aminotransferaza	<b>89</b>	U/L	11 - 34
Alanin-aminotransferaza	<b>86</b>	U/L	9 - 59
Gama-glutamilttransferaza	<b>76</b>	U/L	11 - 55
Alkalna fosfataza	98	U/L	60 - 142
Laktat dehidrogenaza	<b>321</b>	U/L	< 241
Kreatin kinaza	152	U/L	< 177
Proteini	<b>57</b>	g/L	66 - 80
Albumin	<b>32.2</b>	g/L	39.6 - 48.4
Globulini	<b>24.8</b>	g/L	25.0 - 30.0
IgG	11.2	g/L	25.0 - 30.0
IgA	1.3	g/L	1.1 - 3.8
IgM	0.7	g/L	0.6 - 2.2
C reaktivni protein	<b>94.5</b>	mg/L	< 5.0
Beta-2-mikroglobulin	2.5	mg/L	< 3.0
Feritin	<b>1752.0</b>	μg/L	30 - 400

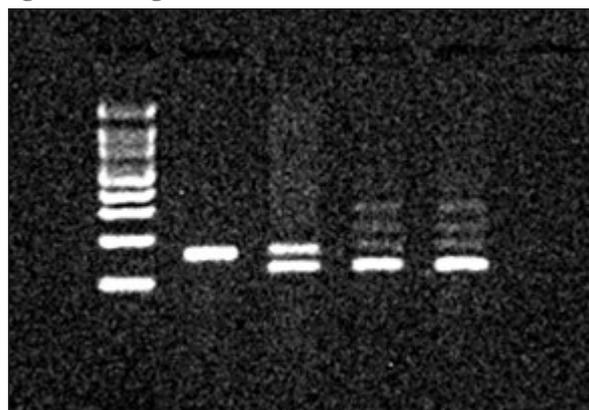
Punktat koštane srži oskudnije celularan, infiltriran nezrelim stanicama tipa limfoblasta (77%) uz dominaciju malih do srednje velikih blasta s vrlo oskudnim citoplazmama koji su imunocitokemijski pozitivni na CD20, CD10, dijelom na TdT i negativni na CD3. Citokemijski je mijeloperoksidaza negativna u blastima, a sve tri loze hematopoeze su vrlo oskudno zastupljene. Nalaz odgovara dijagnozi B-akutne limfoblastične leukemije (B- ALL).

U citološkim razmazima punktata limfnih čvorova nalazi se nešto malih limfocita, dosta srednje velikih i velikih nezrelih stanica tipa limfoblasta pretežno s vrlo oskudnim citoplazmama. Imunocitokemijski pozitivni su na CD20, CD10, dijelom na TdT i negativni na CD3. Nalaz ukazuje na infiltraciju osnovnom bolesti, odnosno B- akutnom limfoblastičnom leukemijom (B- ALL).

Imunofenotipizacijom koštane srži u području blasta nalazi se 62% stanica (isključivo nezrelih stanica B limfocita) abnormalnog fenotipa: reduciran je izražaj biljega CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, HLA D/DR+ uz prekomjeran izražaj biljega CD10+, CD34+, TdT+, CD58+, CD73+, CD38+, CD81+ i CD123+. Nalaz imunofenotipizacije krvotvornih stanica metodom protočne citometrije potvrdio je dijagnozu B- akutne limfoblastične leukemije (B- ALL).

Molekularnom analizom koštane srži metodom alel-specifičnog PCR- a dokazana je mutacija FLT3 unutarnjeg tandemskeg udvajanja (engl. *FLT3 Internal Tandem Duplication*; FLT3/ITD+) unutar FLT3 gena (slika 1).

**Slika 1: prikaz elektroforetskog razdvajanja produkta PCR reakcije za mutaciju ITD unutar FLT3 gena na agaroznom gelu**



M: marker 100 parova baza (pb), +1: pozitivna kontrola homozigot (vrpca >130 pb), +2: pozitivna kontrola heterozigot (vrpca 130 pb i >130 pb), P: pacijent (vrpca na 130pb i 3 banda >130pb), -: negativna kontrola.

Pri primitku bolesnika u KB Merkur ponovljenom dijagnostičkom obradom dijagnosticirana je B- akutna limfoblastična leukemija (B- ALL). Odlukom hematološkog konzilija, a uzevši u obzir dob

i komorbiditete bolesnika, tijekom hospitalizacije je započeta terapija prednizonom i vinkristinom (1 mg i.v.). Radi simptomske anemije bolesnik je primio i 2 doze filtriranih eritrocita te je potom otpušten uz termin nastavka liječenja. Osmi dan od početka liječenja, bolesniku je apliciran vinkristin u sklopu protokola za liječenje B- ALL-a nižeg intenziteta, a po protokolu je nastavio uzimati prednizon peroralno.

Tijekom prvog ciklusa liječenja (petnaestog dana) u citološkom razmazu periferne krvi nađeno je 63% segmentiranih granulocita, 27% limfocita, 1% mijelocita i 2% metamijelocita.

Nakon drugog ciklusa terapije učinjena je reevaluacija bolesti kada nalaz punkcije koštane srži govori u prilog kompletne remisije bolesti. Kliničko stanje pacijenta bilo je zadovoljavajuće te je terapija održavanja kompletne remisije vinkristinom nastavljena.

### Rasprava

Mutacije FLT3 gena često su prisutne u akutnim mijeloidnim leukemijama (AML) i to u gotovo 30% slučajeva. Nasuprot tome, u B- akutnim limfoblastičnim leukemijama (B- ALL) one su izuzetno rijetke (1- 8%), prvenstveno u hiperdiploidiji i translokaciji MLL gena kod podskupina B- ALL. Prisutnost FLT3 mutacija u populaciji pedijatrijskih B-ALL pacijenata kao i odraslih pacijenata povezana je s recidivom i lošom prognozom (9).

Iako FLT3 inhibitori predstavljaju značajan terapijski pomak kod bolesnika s FLT3 mutacijom u AML, dosadašnja klinička istraživanja u ALL su uglavnom usmjerena na učinkovitost pojedinih FLT3 inhibitora (kvizartiniba i lestaurtiniba). Lestaurtinib se u ALL nije pokazao učinkovitim, a moguće objašnjenje nalazi se u epigenetskim mehanizmima koje aktivira fuzijski protein u FLT3 mutiranim ALL stanicama i potrebi genomski vođene terapije u toj grupi bolesnika, uglavnom pedijatrijske dobi (10).

U prikazanom slučaju FLT3 mutacija u ovog bolesnika nije pokazala agresivnost u tijeku B-ALL. Tijekom redovne kontrole, u rujnu ove godine i tri mjeseca nakon postavljene dijagnoze, bolesnik je i dalje u kliničkoj remisiji sa zadovoljavajućom kvalitetom života.

### Literatura:

1. Palmisano TG, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology Reviews* 2012; volume 6:e8.
2. Kazi JU, Rönstrand L. FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol Rev* 2019;99:1433-1466.
3. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Oncogene* 2002;11;21(16):2555-2563.
4. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100(5):1532-1542.
5. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional Alterations of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2009;15(13): 4263-4269.
6. Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, Consoli U, Sanchez-Williams G, Snell V et al. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood* 1996;88(10):3987-3997.
7. Acharya B, Saha D, Armstrong D, Rajiv Lakkani N, Frett B. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: successes, defeats, and emerging paradigms. *RSC Medicinal Chemistry* 2022;13(10).
8. Kennedy VE, Smith CC. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front Oncol* 2020;10:612880.
9. Okabe A, Guirales F, Zhao D, Tirado CA. FLT3 Gene Involvement in B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL). *J Assoc Genet Technol* 2021;47(1):6-14.
10. Zhao X, Wang P, Diedrich JD et al. Epigenetic activation of the FLT3 gene by ZNF384 fusion confers a therapeutic susceptibility in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Commun* 2022;13:5401.

## Protutijela HLA specifična za darivatelja u transplantaciji alogeničnih krvotvornih matičnih stanica

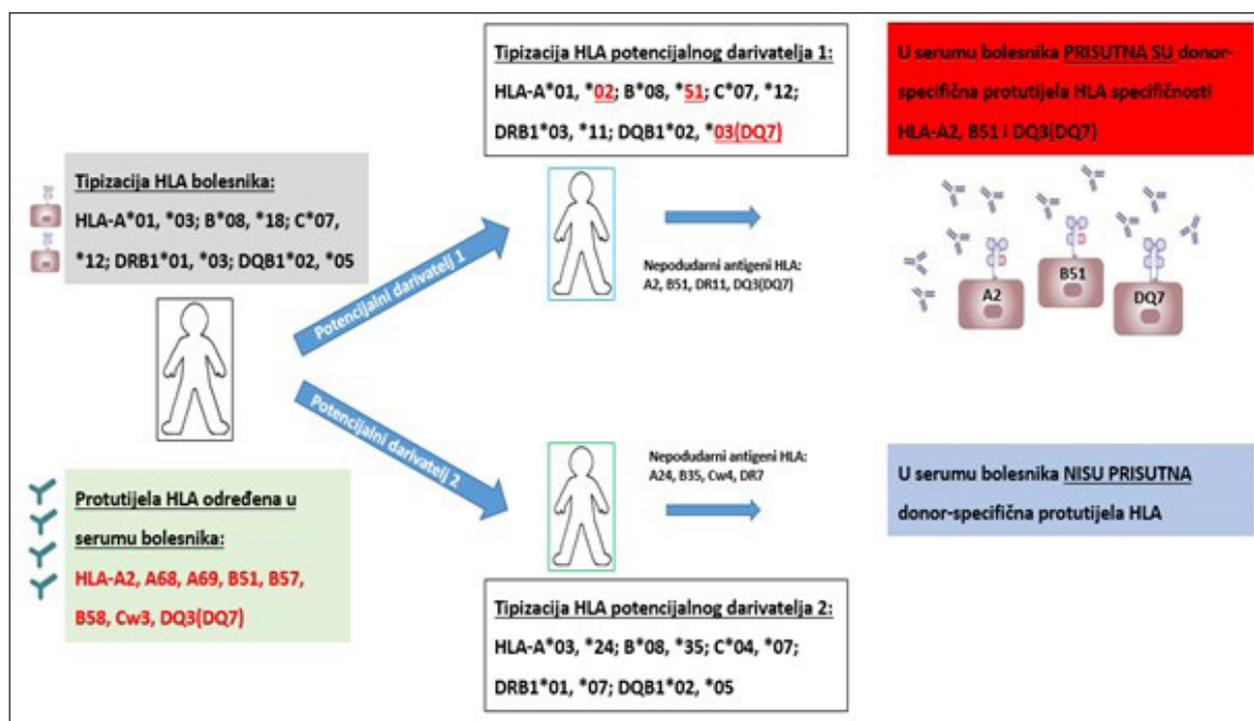
Marija Burek Kamenarić, Zorana Grubić, Katarina Štingl Janković, Marija Maskalan, Lucija Jukić, Renata Žunec

Odjel za tipizaciju tkiva, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, KBC Zagreb

Alogena transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) spasonosni je postupak liječenja različitih hematoloških i imunoloških poremećaja. Idealni darivatelj krvotvornih matičnih stanica (KMS) je brat ili sestra podudarni za alele humanih leukocitnih antigena (HLA) lokusa HLA-A, -B, -C, -DRB1 i -DQB1 (10/10), međutim takvog darivatelja ima samo oko 30% bolesnika. Slijedeća najbolja mogućnost je 10/10 HLA podudarni nesrodni darivatelj, iako u gotovo 80% takvih slučajeva prisutna je nepodudarnost za ostale gene HLA (HLA-DPB1, -DRB3, -DRB4, ili -DRB5)<sup>1</sup>. Ostali izvori KMS uključuju jedinice krvi iz pupkovine ili HLA nepodudarne srodne i nesrodne darivatelje, pri čemu je odabir haploidentičnog darivatelja (srodni darivatelj koji s bolesnikom dijeli jednu identičnu kopiju kromosoma 6) u zadnjih nekoliko godina česti odabir budući su takvi darivatelji dostupni za gotovo sve bolesnike.

Međutim, transplantacija HLA nepodudarnog prestaka predstavlja veliki izazov u kontroli dvosmjerne aloreaktivnosti pri čemu imunološki sustav primatelja nastoji eliminirati stanice darivatelja (engl. Host versus Graft, HvG), a imunološki sustav darivatelja djeluje protiv tkiva primatelja (engl. Graft versus Host, GvH)<sup>2</sup>. Imunološki odgovor organizma može biti stanični (posredovan T-limfocitima) i/ili humoralni, s protutijelima usmjerenim na strane antigene, među kojima i nepodudarne antigene HLA na stanicama prestaka. S obzirom da se protutijela HLA stvaraju kao posljedica izloženosti bolesnika stranim antigenima HLA tijekom transfuzije krvnih pripravaka, trudnoće ili prethodnih transplantacija organa ili tkiva, u HLA nepodudarnoj TKMS postoji dodatan rizik da bolesnici već posjeduju protutijela HLA specifična za nepodudarne antigene HLA darivatelja tzv. donor-specifična protutijela (engl. Donor Specific Antibodies, DSA) (Slika 1).

**Slika 1: shematski prikaz HLA senzibiliziranog bolesnika i dva potencijalna haploidentična darivatelja krvotvornih matičnih stanica. Oba darivatelja su HLA nepodudarna s bolesnikom. U serumu bolesnika prisutna su protutijela HLA specifična za nepodudarne antigene potencijalnog darivatelja 1 (donor-specifična protutijela). Protutijela HLA specifična za nepodudarne antigene potencijalnog darivatelja 2 nisu prisutna. Time je potencijalni darivatelj 2 bolji izbor za haploidentičnu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica.**



Prevalencija protutijela HLA u odraslih bolesnika s hematološkom bolešću koji idu u postupak liječenja TKMS kreće se između 16-40%, dok je učestalost DSA u tih bolesnika između 10-21%, u oba slučaja sa značajno većom učestalošću kod žena

u odnosu na muškarce <sup>1,3</sup>.

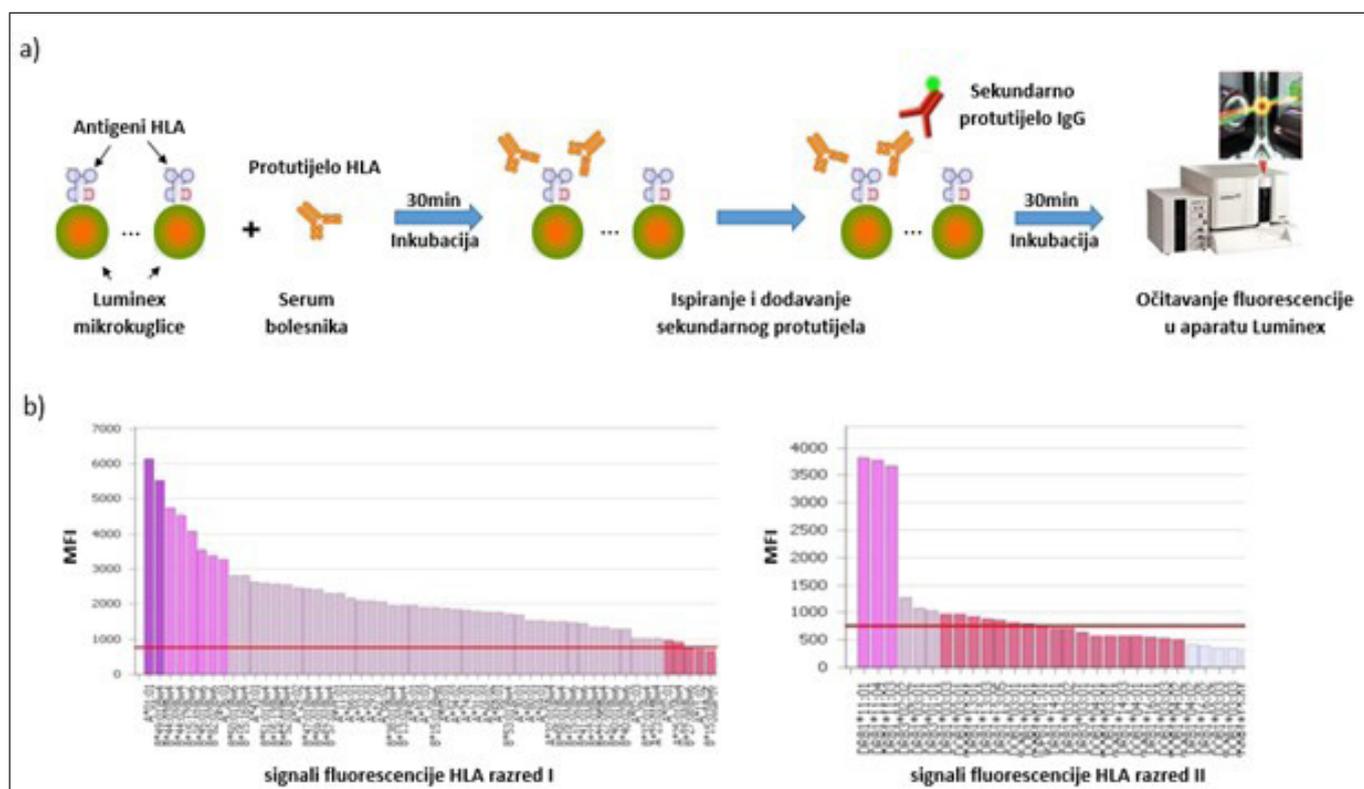
Brojne studije su pokazale da prisutnost DSA u primatelja uzrokuje odgođeno prihvaćanje presatka i povećanu učestalost primarnog odbacivanja presatka (Tablica 1).

**Tablica 1. Literaturni pregled istraživanja o utjecaju HLA donor-specifičnih protutijela na ishod transplantacije krvotvornih matičnih stanica – učinak na odbacivanje presatka.**

Autori	Ispitanici	Darivatelj	DSA (%)	Odbacivanje presatka	
				DSA poz	DSA neg
<sup>13</sup> Ciuera i sur. 2009	24	Haplo	21	<b>60%</b>	1%
<sup>14</sup> Spellman i sur. 2010	115	MMUD	9	<b>24%</b>	1%
<sup>15</sup> Takanashi i sur. 2010	386	CBU	5	<b>83%</b>	32%
<sup>16</sup> Ciuera i sur. 2011	592	MMUD/ MUD	1,4	<b>37,5%</b>	2,7%
<sup>17</sup> Cutler i sur. 2011	73	CBU	24	<b>57%</b>	5,5%
<sup>18</sup> Brunstein i sur. 2011	126	CBU	24	<b>22%</b>	17%
<sup>19</sup> Yoshihara i sur. 2012	79	Haplo	14	<b>27%</b>	3%
<sup>20</sup> Ruggeri i sur. 2013	294	CBU	5	<b>81%</b>	44%
<sup>21</sup> Yamamoto i sur. 2014	175	CBU	ND	<b>50%</b>	16%
<sup>4</sup> Ciuera i sur. 2015	122	Haplo	18	<b>32%</b>	4%
<sup>22</sup> Chang i sur. 2015	345	Haplo	11,3	<b>61%</b>	3,2%
<sup>23</sup> Fuji i sur. 2019	343	CBU	7	<b>44%</b>	25%

Pojmovnik: CBU - jedinice krvi iz pupkovine; DSA - donor-specifična protutijela HLA; Haplo - haploidentičan darivatelj; MUD - podudarni nesrodni darivatelj; MMUD - nepodudarni nesrodni darivatelj; ND - nije definirano

**Slika 2. Luminex tehnologija čvrste faze za otkrivanje protutitijela HLA. a) shematski prikaz tehničke izvedbe testa za otkrivanje protutitijela HLA; b) grafički prikaz kompjuterske analize očitanih signala fluorescencije izražene kao srednji intenzitet fluorescencije (MFI). Crvena linija predstavlja granicu između pozitivnih i negativnih reakcija određenu u postavkama programa za analizu od strane proizvođača testova.**



Metodologija čvrste faze (tzv. Luminex tehnologija) (Slika 2), danas je najčešće korištena metoda za otkrivanje protutijela HLA svih specifičnosti razreda I (HLA-A, B, C) i razreda II (HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1). Test se zasniva na korištenju komercijalnih polistirenskih mikrokuglica na koje su vezani antigeni HLA razreda I i razreda II. Tijekom inkubacije mikrokuglica sa serumom bolesnika, prisutna protutijela HLA specifično se vežu na komplementarne antigene HLA vezane na mikrokuglice. Vezana protutijela HLA označavaju se dodavanjem sekundarnog protutijela IgG obilježenog fluorokromom fikoeritrin. Signali reakcija u vidu fluorescencije očitavaju se laserima u aparatu Luminex. Rezultati se analiziraju pomoću kompjuterskog programa gdje se signali fluorescencije izražavaju kao srednji intenzitet fluorescencije, tzv. MFI (engl. Median Fluorescence Intensity). Svaki laboratorij koji provodi ovo testiranje određuje vlastitu granicu pozitivnosti reakcija (tzv. cut-off) prema kontrolnim vrijednostima MFI, provedenim validacijama (zasebno za svakog od dva postojeća proizvođača testova, Immucor i One Lambda) te kliničkim iskustvima. U Odjelu za tipizaciju tkiva KBC Zagreb reakcije s vrijednostima MFI većim od 1000 smatraju se pozitivnima (za testove proizvođača Immucor). U analizi rezultata važno je procijeniti klinički značaj prisutnih protutijela HLA što se postiže uz pomoć nekoliko kriterija.

### Kriterij 1: „Snaga” protutijela HLA

Iako semi-kvantitativna metoda, vrijednost MFI koristi se za procijenu „snage” reakcije antigen-protutijelo. Pokazalo se da ovako temeljena procijena „snage” prisutnih DSA korelira s ishodom TKMS te je važna za donošenje odluke o odabiru darivatelja. Ciuera i suradnici pokazali su kako je među DSA pozitivnim primateljima do odbacivanja presatka došlo kod svih s DSA razine MFI >5000 prije transplantacije dok su primatelji s DSA nižeg intenziteta reakcija (MFI <2000) imali normalnu funkciju presatka<sup>4</sup>. Bramante i suradnici ukazali su na to kako nema statistički značajne razlike u funkciji prestaka kod DSA pozitivnih primatelja s MFI <3000 u odnosu na primatelje bez DSA<sup>5</sup>.

U Odjelu za tipizaciju tkiva Zagreb vodimo se slijedećim kriterijima:

- protutijela s MFI < 1500 → niski intenzitet reakcija
- protutijela s MFI 1500-5000 → srednji intenzitet reakcija

- protutijela s MFI > 5000 → visoki intenzitet reakcija
- protutijela s MFI > 15000 → vrlo visoki intenzitet reakcija

Navedeni rasponi su orijentacijski, a svaka interpretacija rezultata radi se individualno za svakog testiranog bolesnika. Unatoč varijacijama u laboratorijskim protokolima i analizi, smatra se da DSA vrijednosti MFI >5000 predstavljaju visoki imunološki rizik za uspješnu TKMS<sup>4</sup>.

### Kriterij 2: Komplement-vezujuća protutijela HLA

Ciurea i suradnici pokazali su kako su primatelji s prisutnim DSA (MFI >5000) koja su ujedno i komplement-vezujuća izloženi mnogo većem riziku od primarnog zatajenja presatka u odnosu na primatelje s DSA koja su komplement-nevezujuća<sup>4</sup>. Dodatno, nedavno istraživanje iste skupine autora istražila je učinak desenzibilizacije u slučajevima prisutnosti DSA vrlo visokog intenziteta. Primatelji s DSA početne vrijednosti MFI >20000 koja su komplement-vezujuća, nakon desenzibilizacije imali su nižu stopu prihvatanja presatka, višu stopu smrtnosti i lošije preživljenje u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim primatelji s DSA početne vrijednosti MFI >20000, ali komplement-nevezujućim protutijelima bili su usporedivi s kontrolnom skupinom bez DSA<sup>6</sup>.

Prema našem protokolu, dokazivanje komplement-vezujućih protutijela moguće je klasičnim testom mikrolimfocitotoksičnosti (engl. Complement-Dependent Cytotoxicity, CDC) izvođenjem križne reakcije (engl. cross match, CM) između primatelja i darivatelja, ukoliko postoji dostupan materijal darivatelja. Također, uz Luminex testove koji su dostupni za otkrivanje DSA, postoje i dodatni testovi (CIq (One Lambda) ili C3d (Immucor)) koji omogućuju razlikovanje komplement-vezujućih i komplement-nevezujućih protutijela.

### Kriterij 3: Specifičnost HLA

Malo je istraživanja te nema jasnih zaključaka postoji li različit utjecaj na ishod TKMS protutijela specifičnosti HLA razreda I u odnosu na protutijela HLA razreda II. Prema jednoj provedenoj meta-analizi ne postoji statistički značajna razlika za rizik primarnog odbacivanja presatka u primatelja koji imaju protutijela i HLA razreda I i HLA razreda II u odnosu na primatelje koji imaju samo protutijela HLA razreda I ili samo HLA razreda II<sup>7</sup>. Također, ne može se pouzdano zaključiti postoji li različit utjecaj svakog pojedinog lokusa (HLA-A vs.

B vs. C vs. DR vs. DQ vs. DP), npr. jesu li DSA specifičnosti HLA-A značajnije povezana s odbacivanjem presatka nego DSA specifičnosti HLA-B? Objavljeno je nekoliko prikaza slučajeva koji su izvjestili o značajnom utjecaju protutijela HLA razreda I pri čemu je većina DSA bila usmjerena na antigene HLA-A i HLA-B, međutim i slučajevi odbacivanja prestaka kada su u pitanju bila samo DSA specifičnosti DRB4 ili specifičnosti DPB1<sup>8</sup>.

Prednosti i ograničenja Luminex tehnologije čine interpretaciju rezultata testiranja kompleksnom i zahtjevnom te je nužna suradnja laboratorija za tipizaciju tkiva i liječnika, kako bi se analiza učinila kvalitetno i bila temeljena na individualnom pristupu pacijentu.

European Society for Blood and Marrow Transplant (EBMT) izdalo je smjernice koje se odnose na testiranje, postupanje i praćenje primatelja s HLA DSA u haploidentičnoj TKMS<sup>9</sup>. Smjernice preporučuju Luminex testiranje i određivanje DSA za sve potencijalne primatelje u haploidentičnoj, ali i HLA nepodudarnoj nesrodnoj TKMS. Ako su otkrivena DSA (MFI > 1000), potrebno je odrediti radi li se o komplement-vezujućim DSA (Luminex testiranje) ili napraviti test križne reakcije metodom CDC. Ukoliko ne postoji alternativni darivatelj protiv kojeg primatelj nema DSA, potrebno je provesti postupak desenzibilizacije primatelja (protokol ovisi o transplantacijskom centru), obavezno ako se radi o DSA s MFI > 5000 ili komplement-vezujućim DSA. Luis-Hidalgo i suradnici naknadno su predložili novi algoritam za odabir darivatelja u haploidentičnoj TKMS pri čemu smatraju da u slučajevima kada su prisutna komplement-vezujuća DSA ili DSA s MFI > 5000, od darivatelja treba odustati, a u slučajevima kada su prisutna DSA s MFI < 5000 i koja nisu komplement vezujuća ići u postupak desenzibilizacije<sup>10</sup>.

U protokolu našeg transplantacijskog centra KBC Zagreb otkrivanje protutijela HLA Luminex metodologijom provodi se za sve potencijalne primatelje u programu liječenja haploidentičnom TKMS, a nastoji se rutinski uvesti i za sve potencijalne primatelje u programu liječenja nesrodnom TKMS s HLA nepodudarnim darivateljem (HLA podudarnost 9/10; HLA-A, B, C, DRB1, DQB1). Ostaje otvoreno pitanje testiranja primatelja i u slučajevima kada je darivatelj HLA podudaran 10/10 (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1), ali postoji nepodudarnost alela HLA-DPB1 (HLA podudarnost 11/12 ili 10/12) s obzirom na dokaze o negativnom učinku DSA specifičnosti DP na ishod TKMS.

Trenutno se vrlo malo zna o ulozi protutijela HLA u darivatelju pri čemu ona mogu biti usmjerena prema antigenima HLA primatelja te u tom slučaju govorimo o primatelj-specifičnim protutijelima (engl. Recipient Specific Antibodies, RSA)<sup>11</sup>. Pretpostavka je da presadak sadrži memorijske B stanice darivatelja koje u primatelju mogu diferencirati u plazma stanice i stvarati RSA. Delbos i suradnici utvrdili su kako postoji povećan rizik za razvoj kronične reakcije presatka protiv primatelja (engl. Graft versus Host disease, GvHD) u primatelja koji su dobili presadak od nesrodnog darivatelja (10/10 ili 9/10) s prisutnim RSA specifičnosti HLA razreda II<sup>12</sup>. Većina RSA bila je specifičnosti DP i mogla su se detektirati u primatelju najmanje 6 mjeseci nakon TKMS. Ciuera i suradnici prikazali su slučaj višerotkinje kao haploidentičnog darivatelja s prisutnim RSA protiv antigena HLA primatelja<sup>11</sup>. Učinjena je deplecija plazme iz presatka i RSA su u potpunosti eliminirana. Transplantacija nije bila uspješna, ali zbog DSA primatelja. Autori smatraju kako je potrebno rutinsko pre-transplantacijsko određivanje RSA u odraslih ženskih darivatelja kod haploidentične TKMS.

Zaključno, postoji dovoljno dokaza da možemo sa sigurnošću reći kako prisutnost DSA u HLA nepodudarnoj TKMS ima utjecaj na lošiji ishod transplantacije te se moraju uzeti u obzir kao važan čimbenik u odabiru darivatelja. Posljedično, probir i otkrivanje DSA trebao bi biti obavezan i rutinski protokol u svakoj HLA nepodudarnoj TKMS.

#### LITERATURA:

1. Morin-Zorman S, Loiseau P, Taupin J-L et al. Donor-specific anti-HLA antibodies in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2016;7:307. doi: 10.3389/fimmu.2016.00307
2. Kanakry CG, Fuchs EJ, Luznik L. Modern approaches to HLA-haploidentical blood or marrow transplantation. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(1):10-24. doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.128
3. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus recommendations for donor selection in haploidentical hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55(1):12-24. doi.org/10.1038/s41409-019-0499-z
4. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR et al. Complement-binding donor-specific anti-HLA antibodies and risk of primary graft failure in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:1392-1398. doi.org/10.1038/s41409-017-0062-8

5. Bramanti S, Calafiore V, Longhi E, et al. Donor specific anti-HLA antibodies (DSA) in haploidentical stem cell transplantation with post transplant cyclophosphamide: risk of graft failure, poor graft function and impact on outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019;25:1395-1409. doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.02.020
6. Ciurea SO, Al Malki MM, Kongtim P et al. Treatment of allosensitized patients receiving allogeneic transplantation. *Blood Advances.* 2021;5(20):4031-4043. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004862
7. Yiyu X, Jay P, Zaixiang T et al. Donor-Specific Antibodies and Primary Graft Failure in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transplantation and Cellular Therapy.* 2021;27:687.e1-687.e7. doi.org/10.1016/j.jtct.2021.04.030
8. Krummey SM, Gareau AJ. Donor specific HLA antibody in hematopoietic stem cell transplantation: Implications for donor selection. *Front Immunol.* 2022;13:916200. doi: 10.3389/fimmu.2022.916200
9. Ciurea SO, Cao K, Fernandez-Vina M et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Consensus Guidelines for the Detection and Treatment of Donor-specific Anti-HLA Antibodies (DSA) in Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(5):521-534. doi: 10.1038/s41409-017-0062-8
10. Luis-Hidalgo M, Planelles Silvestre D, Guzmán-Fulgencio M et al. Algorithm to Study HLA-Antibodies and Selecting Criteria for the Best Haploidentical Donor. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2020;36(3):573-574 doi.org/10.1007/s12288-019-01246-y
11. Ciurea SO, Cao K, Zou J. Donor-specific anti-HLA antibodies and ...recipient-specific anti-HLA antibodies? The conundrum on pregnancy in transplantation. *Am J Hematol.* 2020;95(5):E128-E130. doi: 10.1002/ajh.25762
12. Delbos F, Barhoumi W, Cabanne et al. Donor immunization against human leukocyte class II antigens is a risk factor for graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22:292-299. doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.09.027
13. Ciurea SO, de Lima M, Cano P et al. High risk of graft failure in patients with anti-HLA antibodies undergoing haploidentical stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2009;88(8):1019-1024. doi: 10.1097/TP.0b013e3181b9d710
14. Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson S et al. The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure. *Blood.* 2010;115:2704-2708 doi.org/10.1182/blood-2009-09-244525
15. Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K et al. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood.* 2010;116:2839-2846. doi.org/10.1182/blood-2009-10-249219
16. Ciurea SO, Thall PF, Wang X et al. Donor-specific anti-HLA Abs and graft failure in matched unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2011;118:5957-5964. doi.org/10.1182/blood-2011-06-362111
17. Cutler C, Kim HT, Sun L et al. Donor-specific anti-HLA antibodies predict outcome in double umbilical cord blood transplantation. *Blood.* 2011;118:6691-6697. doi.org/10.1182/blood-2011-05-355263
18. Brunstein CG, Noreen H, DeFor TE et al. Anti-HLA antibodies in double umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:1704-1708. doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.04.013
19. Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K et al. Risk and prevention of graft failure in patients with pre-existing donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2012;47:508-515. doi.org/10.1038/bmt.2011.131
20. Ruggeri A, Rocha V, Masson E et al. Impact of donor specific anti-HLA antibodies on graft failure and survival after reduced intensity conditioning-unrelated cord blood transplantation: a Eurocord, Soci'et'e Francophone d'Histocompatibilit'e et d'Immunog'en'etique (SFHI) and Soci'et'e Franc,aise de Greffe de Moelle et de Th'erapie Cellulaire (SFGM-TC) analysis. *Haematologica.* 2013;98(7):1154-1160. doi: 10.3324/haematol.2012.077685
21. Yamamoto H, Uchida N, Matsuno N et al. Anti-HLA antibodies other than against HLA-A, -B, -DRB1 adversely affect engraftment and nonrelapse mortality in HLA-mismatched single cord blood transplantation: possible implications of unrecognized donor-specific antibodies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(10):1634-1640. doi:10.1016/j.bbmt.2014.06.024
22. Chang Y-J, Zhao X-Y, Xu L-P et al. Donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies were associated with primary graft failure after unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation: a prospective study with randomly assigned training and validation sets. *J Hematol & Oncol.* 2015;8:84. doi.org/10.1186/s13045-015-0182-9
23. Fuji S, Oshima K, Ohashi K et al. Impact of pretransplant donor-specific anti-HLA antibodies on cord blood transplantation on behalf of the Transplant Complications Working Group of Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2020;55(4):722-728. doi: 10.1038/s41409-019-0712-0

## Stečena aplastična anemija kod djece

Klara Bosnić<sup>1</sup>, Matej Jelić<sup>2</sup>, Ernest Bilić<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>2</sup>Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za pedijatriju,

Zavod za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica

### Uvod

Stečena aplastična anemija (SAA) u djetinjstvu rijetka je i životno ugrožavajuća bolest uzrokovana nepravilnom funkcijom koštane srži. Napredovanjem dijagnostike i liječenja, SAA u pedijatrijskoj populaciji ima povoljan ishod, s dugoročnim preživljenjem oko 90% pacijenata u zadnjem desetljeću (1).

Aplastična anemija (AA) definira se kao pancitopenija u perifernoj krvi uz nalaz hipocelularne koštane srži. Za postavljanje dijagnoze SAA potrebno je isključiti postojanje infiltrativne bolesti i fibroze kao mogućih uzroka oštećenja koštane srži. U pedijatrijskoj je populaciji vrlo važno isključiti prirodene uzroke AA, odnosno sindrome zatajenja koštane srži (Fanconi anemija, Dyskeratosis congenita, Shwachman-Diamond sindrom, kongenitalna amegakariocitna trombocitopenija...) koji se mogu prezentirati istovjetno SAA, ali zahtijevaju različit pristup liječenju, te genetsko testiranje srodnika pri doniranju koštane srži (2).

Učestalost bolesti u zapadnim zemljama je dva oboljela na milijun stanovnika (3).

Etiologija SAA je u 70% slučajeva nepoznata, a najčešći poznati uzroci su lijekovi (npr. fenilbutazon, kloramfenikol, sulfonamidi, citotoksični lijekovi), radioaktivno zračenje, kemikalije (npr. benzen) i virusne infekcije kao što su infekcija parvovirusom B19 i hepatitis (2).

Bolest se očituje simptomima i znakovima pancitopenije: trombocitopenijom, anemijom, vrućicom, ulceracijama sluznice te učestalim i teškim bakterijskim infekcijama kao komplikacijama neutropenije.

Dijagnoza se postavlja biopsijom kosti i isključivanje drugih uzroka zatajenja koštane srži (2).

Aplastična se anemija se može podijeliti na umjerenu, tešku i vrlo tešku prema stupnju celularnosti koštane srži, težini citopenije u perifernoj krvi te apsolutnom broju retikulocita (tablica 1.) (1).

**Tablica 1. Podjela aplastične anemija s obzirom na težinu bolesti**

Umjereni teška AA	Celularnost KS-a <50% i dvije ili sve krvne loze suprimirane više od 6 tjedana: ANC<1500/μL, T<100 000/μL, ARC<60 000/μL i ne zadovoljava kriterije teške AA
Teška AA	Celularnost KS-a <25% i prisutnost bar dvoje od navedenog: ANC<500/μL, T<20 000/μL, ARC<60 000/μL
Vrlo teška AA	Zadovoljava kriterije teške AA i ANC<200/μL

ANC (absolute neutrophil count) – apsolutni broj neutrofila;

T - broj trombocita; ARC (absolute reticulocyte number) – apsolutni broj retikulocita (1)

Odluka o liječenju SAA ovisi o težini bolesti. Teška i vrlo teška SAA zahtijevaju brzu evaluaciju i suportivnu terapiju (2). Bez konačnog liječenja, smrtnost iznosi oko 70% unutar dvije godine (4). Postoje dva pristupa definitivnom liječenju ovog poremećaja: transplantacija krvotvornih matičnih stanica (TKMS) i imunosupresivna terapija (IST). Kod teške i vrlo teške SAA, ako postoji srodni podudarani donor, TKMS je terapija izbora (2). Dugoročno preživljenje kod djece liječene primarnom TKMS iznosi 90% (5). TKMS nesrodnog donora terapija je drugog izbora kod pacijenata refraktornih na liječenje IST-om. U slučaju imunosupresivne terapije, daje se kombinacija konjskog antitimocitnog globulina (ATG), kortikosteroida i ciklosporina. Inicijalni odgovor na IST prisutan je kod dvije trećine pacijenata, a oko 30-40% njih dobije povrat bolesti (6). Standardnoj terapiji se može dodati i eltrombopag, agonist trombopoetinskog receptora, koji potiče proliferaciju i preživljavanje krvotvornih matičnih stanica te time pospješuje liječenje SAA (7). Kao zamjena konjskom antitimocitnom globulinu može se davati zečji ATG.

Pacijente je potrebno dugotrajno pratiti zbog mogućeg povrata i razvoja komplikacija bolesti te liječenja: GVHD-a, mijelodisplastičnog sindroma (MDS) i akutne mijeloične leukemije (AML) te sekundarnih maligniteta (2).

## Ciljevi rada

Cilj rada je analizirati i prikazati karakteristike pacijenata i njihove kliničke slike pri početnoj prezentaciji aplastične anemije, te utvrditi preživljenje djece ovisno o primjenjenoj terapiji i komplikacije povezane s terapijom.

## Ispitanici i metode

U istraživanje su uključena 24 pacijenta s dijagnozom SAA liječena u Zavodu za pedijatrijsku hematologiju, onkologiju i transplantaciju krvotvornih matičnih stanica Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, kojima je bolest dijagnosticirana u vremenskom razdoblju od 1. siječnja 2000.g. do 31. prosinca 2021.g.

## Metode

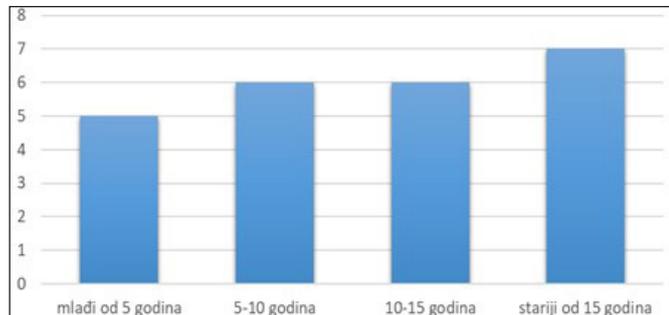
Podatci su prikupljeni iz medicinske dokumentacije.

## Rezultati

Od ukupno 24 ispitanika uključenih u ovo istraživanje, bilo je 11 djevojčica (46%) i 13 dječaka (54%).

Na slici 1. prikazana je raspodjela pojave bolesti po dobnim skupinama.

**Slika 1. Raspodjela pacijenata po dobnim skupinama**

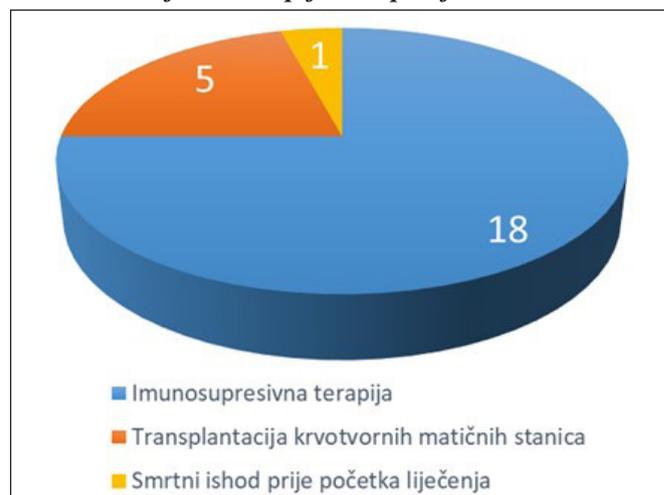


Prosječna dob pri postavljanju dijagnoze bila je 10,7 godina.

Od 24 praćena pacijenta, preživjelo je njih 19 (79%). Među preminulima, bila su 3 dječaka i 2 djevojčice.

Na slici 2. prikazana je inicijalna terapija primjenjena kod pacijenata sa SAA.

**Slika 2. Inicijalna terapija kod pacijenata sa SAA**

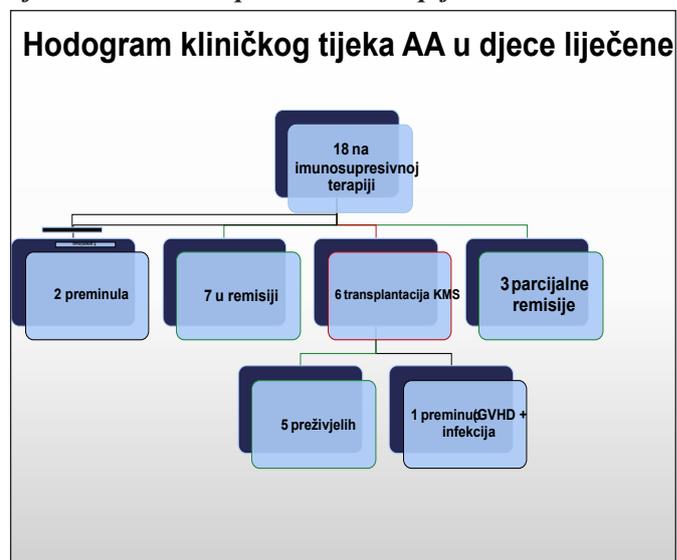


Od pet pacijenata primarno liječeno TKMS-om srodnog donora, jedno je dijete preminulo, a četiri su imala potpuni oporavak (80%).

Potpuni oporavak nakon prvotne IST imalo je sedam pacijenata (39%), dvoje je preminulo (11%), a devet pacijenata (50%) nije odgovorilo na terapiju te je njihovo liječenje nastavljeno.

Četiri pacijenta primila ponovni ciklus IST-a u kojem je konjski ATG zamijenjen zečjim ATG-om, a dva su pacijenta liječena i eltrombopagom. Navedeni se modaliteti liječenja nisu pokazali uspješnima.

**Slika 3. Hodogram kliničkog tijeka AA u djece liječene s imunosupresivnom terapijom**



Kod pet od ukupno jedanaest pacijenata liječenih TKMS, kao komplikacija liječenja, razvio se uglavnom blagi GVHD kože i crijeva. Dva transplantirana pacijenta umrla su od teškog GVHD, sepse i posljedičnog multiorganskog zatajenja.

Kod jedne pacijentice, 17 godina nakon haploidentične TKMS, dijagnosticiran je planocelularni karcinom vagine nastavno na ginekološki GVHD.

Dvije godine nakon, istoj je pacijentici dijagnosticiran intramedularni karcinom četvrtog stadija. Pacijentica je prethodno imala teške komplikacije TKMS-a u vidu kardiomiopatije, somatske retardacije, epileptičkih napadaja i raznih endokrinoloških poremećaja.

### Rasprava

U ovom retrospektivnom radu opisana su 24 bolesnika oboljela od stečene aplastične anemije. Osnovne epidemiološke podatke usporedili smo s podacima dostupnim u literaturi.

Prema istraživanju koje su proveli Miano i sur. (8) preživljenje kod pacijenata s AA bilo je 90%, a većina pacijenata imala je iznad 10 godina pri dijagnosticiranju bolesti. U našoj ispitivanoj skupini preživjelo je 79,17%, a 54,17% pacijenta imalo je više od 10 godina pri dijagnozi, pri čemu je medijan dobi bio 10,7 godina.

Prema istraživanjima Passweg i sur. (9), Gillio i sur. (10) te Bacigalupo i sur. (11) primarna je TKS dovela do 90%-tnog preživljenja bez bolesti, a primarna je IST u 75-80% slučajeva postigla odgovor, a u 50% slučajeva taj je odgovor bio kompletan. U našem istraživanju primarna je TKS dovela do kompletnog izliječenja 80% slučajeva, a na primarnu IST odgovorilo je 61,11% pacijenata.

Istraživanja Di Bona i sur. (12), Olnes i sur. (13) te Malhotra i sur. (14) ispitivala su uspješnost modifikacija i alternativa imunosupresivnoj terapiji. Zečji ATG kao alternativa konjskom ATG-u u sekundarnoj IST doveo je do kompletne remisije u devet od 30 pacijenata (30%) (12), eltrombopag kao druga linija liječenja AA nakon primarne IST imao je dobar odgovor kod 40% pacijenata (13), a više doze IST-a dale su jednako uspješan odgovor kao i niže doze IST-a (14). U našem istraživanju zečji ATG i eltrombopag nisu pokazali uspjeh u terapiji AA. Do 2011. godine bolesnici su u sklopu imunosupresivne terapije primali 25% veću dozu ATG, te značajno veće doze kortikosteroida i ciklosporina, nego oni liječeni nakon 2011.g. Unatoč različitim dozama lijekova uspješnost je bila podjednaka.

Istraživanje koje su proveli Rogers i sur. (15) pokazalo je da je sekundarna TKMS u slučaju povrata ili refraktorne AA superiornija od sekundarne IST što se pokazalo točnim i kod naših ispitanika (83.33% naspram 0%).

### Zaključak

Ishod liječenja bolesnika oboljelih od aplastične anemije u našoj ispitivanoj skupini je nešto niži

nego što je to u najboljim svjetskim centrima.

Međutim treba istaknuti da je naša ispitivana skupina liječena u razdoblju od 2000.g. do sada, a u radovima kojima se pokazuje bolje preživljenja djeca su liječena u kasnijem razdoblju sa značajno naprednijom suportivnom terapijom (prvenstveno antimikotici), te boljim tehnikama TKS koje su razvijene u zadnjem desetljeću. Ohrabrujuća je činjenica što niže doze imunosupresivne terapije koje se primjenjuju od 2011. godine postižu slične rezultate kao i više doze što će pridonijeti nižoj učestalosti komplikacija liječenja. Budući da je stečena aplastična anemija rijetka u općoj populaciji, potrebna su daljnja istraživanja i potpunije poznavanje patofiziologije bolesti kako bi se novom, ciljanom i učinkovitijom terapijom postigli bolji rezultati.

### Literatura:

- Hartung HD, Olson TS, Bessler M. Acquired aplastic anemia in children. *Pediatr Clin North Am.* 2013 i 60(6):1311-1336.
- Timothy S Olson, Acquired aplastic anemia in children and adolescents, In D. Mahoney (Ed.) i UpToDate, 1.10.2021., <https://www.uptodate.com/contents/acquired-aplastic-anemia-in-children-and-adolescents>.
- Ahmed P, Chaudhry QUN, Satti TM, et al. Epidemiology of aplastic anemia: a study of 1324 cases. *Hematology.* 2020 i 25(1):48-54.
- Tichelli A, Peffault de Latour R, Passweg J, et al. Long-term outcome of a randomized controlled study in patients with newly diagnosed severe aplastic anemia treated with antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without granulocyte colony-stimulating factor: a Severe Aplastic Anemia Working Party Trial from the European Group of Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2020;105(5):1223-1231. .
- Drexler B, Passweg J. Current evidence and the emerging role of eltrombopag in severe aplastic anemia. *Ther Adv Hematol.* 2021 i 3., 12:2040620721998126. Published 2021 Mar.
- Young NS, Calado RT and Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006 i 2509–2519., 108:.
- Zeigler FC, de Sauvage F, Widmer HR, et al. In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1994 i 4045–4052., 84:.
- Miano M, Dufour C. The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. *Int J Hematol.* 2015 Jun;101(6):527-35.
- Passweg JR, Socié G, Hinterberger W, et al. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: has outcome improved?. *Blood.* 1997;90(2):858-864.
- Gillio AP, Boulad F, Small TN, et al. Comparison of long-term outcome of children with severe aplastic anemia treated with immunosuppression versus bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1997;3(1):18-24.

11. Bacigalupo A, Bruno B, Saracco P, et al. Antilymphocyte globulin, cyclosporine, prednisolone, and granulocyte colony-stimulating factor for severe aplastic anemia: an update of the GITMO/EBMT study on 100 patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Working Party on Severe Aplastic Anemia and the Gruppo Italiano Trapianti di Midollo Osseo (GITMO). *Blood*. 2000;95(6):1931-1934.
12. Di Bona E, Rodeghiero F, Bruno B, et al. Rabbit antithymocyte globulin (r-ATG) plus cyclosporine and granulocyte colony stimulating factor is an effective treatment for aplastic anaemia patients unresponsive to a first course. of intensive immunosuppressive therapy. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO) [published correction appears in *Br J Haematol* 2000 Feb;108(2):461. De Rossi V [corrected to De Rossi G]]. *Br J Haematol*. 1999;107(2):330-334.
13. Olnes MJ, Scheinberg P, Calvo KR, et al. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia [published correction appears in *N Engl J Med*. 2012 Jul 19;367(3):284]. *N Engl J Med*. 2012;367(1):11-19.
14. Malhotra P, Bodh V, Guru Murthy GS, Datta AK, Varma N, Varma S. Outcomes of immunosuppressant therapy with lower dose of antithymocyte globulin and cyclosporine in aplastic anemia. *Hematology*. 2015;20(4):239-244.
15. Rogers ZR, Nakano TA, Olson TS, et al. Immunosuppressive therapy for pediatric aplastic anemia: a North American Pediatric Aplastic Anemia Consortium study. *Haematologica*. 2019;104(10):1974-1983.

## TPO agonisti u liječenju imunosne trombocitopenije – iskustvo KBC-a Split

**Andela Pijuk, Viktor Blaslov, Jasminka Jakelić Piteša, Dominik Lozić, Sanja Madunić, Antonija Miljak, Lučana Vicelić Čutura, Davor Galušić**

*Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Split*

Imunosna trombocitopenija (ITP) stečeni je autoimunosni poremećaj karakteriziran niskim brojem trombocita ( $<100 \times 10^9/L$ ) koji je rezultat razaranja i smanjenog stvaranja trombocita (1). Incidencija poremećaja iznosi između 1,6 i 3,9 oboljelih na 100 000 stanovnika godišnje, a učestalost raste s dobi te je nešto češći kod žena (2). ITP prema kliničkom tijeku može biti akutni (novodijagnosticirani) koji traje do 3 mjeseca od postavljanja dijagnoze, perzistentni u trajanju između 3 i 12 mjeseci, a ukoliko bolest traje dulje od 12 mjeseci govorimo o kroničnom ITP-u (3). Dijagnoza ITP-a temelji se na isključivanju drugih sistemskih bolesti u podlozi kojih se može razviti sekundarna trombocitopenija (virusne infekcije, imunodeficijencije, autoimunosne bolesti, limfoproliferativne bolesti itd.) (3, 4). Opće kliničko stanje bolesnika s ITP najčešće nije znatnije narušeno, javljaju se uglavnom blaža krvarenja u kožu i sluznice, a tek manji broj bolesnika prezentira se ozbiljnijim i životnougrožavajućim krvarenjima. Cilj liječenja bolesnika s ITP je postići stabilan broj trombocita (iznad  $30 \times 10^9/L$ ). Procjena o početku aktivnog liječenja najčešće je individualna i prije svega se temelji na procjeni rizika za krvarenje (nizak rizik ukoliko su trombociti  $>30 \times 10^9/L$ ), dobi bolesnika (kod djece su česte spontane remisije) i pridruženim komorbiditetima. U prvoj liniji liječenja ustaljena je primjena glukokortikoida s ili bez intravenskih imunoglobulina, a terapijske opcije i ishodi liječenja neizvjesni su kod refraktornih bolesnika. Osim splenektomije, moguće je liječenje različitim imunosupresivnim lijekovima, a kao jedna od najučinkovitijih terapijskih opcija pokazala se primjena agonista trombopoetinskih (TPO) receptora s postizanjem terapijskog odgovora u 60 - 90% bolesnika (5, 6). U Republici Hrvatskoj (RH) registrirana su tri TPO agonista za liječenje bolesnika s relapsno refraktornim ITP-om, dva peroralna (eltrombopag i avatrombopag) te jedan supkutani oblik (romiplostim).

Retrospektivno smo analizirali podatke o učinkovitosti i sigurnost primjene TPO agonista u Zavodu za hematologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split. Od registracije TPO agonista u Republici Hrvatskoj do danas, u našem KBC-u TPO agonistima

liječeno je ukupno 29 bolesnika (17 muškaraca i 12 žena). Medijan dobi prilikom postavljanja dijagnoze ITP bio je 59 godina, 21 (72%) bolesnika imalo je pridruženu neku drugu hematološku, autoimunu ili kroničnu infektivnu bolest (7 bolesnika s limfoproliferativnim bolestima, 5 bolesnika s virusnim hepatitisom, jedna bolesnica s karcinom dojke i 8 bolesnika s različitim autoimunim bolestima). Samo 10 (34%) bolesnika imalo je krvarenja, od kojih samo 2 ozbiljnija krvarenja (protrahirana epistaksa i masivna hematokezija). Svi bolesnici su u prvoj liniji liječeni glukokortikoidima, a 22 (76%) primilo je i imunoglobuline. U našoj kohorti, 27 (93%) bolesnika primilo je TPO agoniste u drugoj liniji liječenja, a kod dva bolesnika je prije primjene TPO agonista ordiniran rituksimab. Većini bolesnika (17/29) terapija TPO agonistima ordinirana je unutar godine dana od početka prve linije liječenja, eltrombopag je bio zastupljeniji izbor (22 bolesnika) od romiplostima (7 bolesnika), a 17 (59%) bolesnika je uz TPO agoniste konkomitantno primalo glukokortikoide. Na terapiji TPO agonistima trenutno je 17 bolesnika, 11 na eltrombopagu, 5 na romiplostimu i 1 na avatrombopagu. Terapija TPO agonistima obustavljena je kod ukupno 12 bolesnika (5 umrlih, 4 bolesnika s trajnim odgovorom na terapiju, 2 bolesnika s intolerancijom na lijek i 1 bolesnik koji nije imao odgovor na terapiju). Ukupni odgovor na terapiju TPO agonistima iznosio je 93% (27/29 bolesnika), a 16 (59%) bolesnika postiglo je kompletan odgovor. Medijan trajanja odgovora na terapiju iznosio je 60 tjedana, a medijan broja tjedana s  $Tr > 30 \times 10^9/L$  iznosio je 50. Kod ukupno 7 (24%) bolesnika je zamijenjen TPO agonist, kod 4 je eltrombopag zamijenjen romiplostimom, kod 2 romiplostim eltrombopagom i kod jednog romiplostim avatrombopagom. Nakon promjene TPO agonista 6 od 7 bolesnika postiglo je terapijski odgovor, uz dva kompletna i 5 dugotrajnih terapijskih odgovora. Nuspojave su zabilježene kod ukupno 4 (14%) bolesnika (dijareja, duboka venska tromboza, hepatotoksičnost i infarkt slezene).

Iako se radi o retrospektivnoj analizi podataka na relativno malom uzorku bolesnika, naši rezultati iz stvarne kliničke prakse ukazuju na odličnu učinkovitost TPO agonista u liječenju relapsno re-

fraktornog ITP, uz prihvatljiv sigurnosni profil. S obzirom na dostupnost tri različita TPO agonista u RH, zamjena jednog TPO agonista drugim svakako je korisna terapijska opcija kod refraktornih bolesnika, a prema našim iskustvima, terapijski odgovor se može očekivati kod većine njih.

#### Literatura:

1. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, Cuker A, Despotovic JM, George JN, Grace RF, Kühne T, Kuter DJ, Lim W, McCrae KR, Pruitt B, Shimanek H, Vesely SK. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2019 Dec 10;3(23):3829-3866.
2. Kohli R, Chaturvedi S. Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia. *Hamostaseologie.* 2019 Aug;39(3):238-249.
3. Nadopuna smjernica za dijagnostiku i liječenje imunosne trombocitopenije u odraslih, Dražen Pulanić i sur., Bilten Krohema – Vol. 13, br. 1, Svibanj 2021.
4. Kelton JG, Vrbensky JR, Arnold DM. How do we diagnose immune thrombocytopenia in 2018? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2018 Nov 30;2018(1):561-567.
5. Audia S, Bonnotte B. Emerging Therapies in Immune Thrombocytopenia. *J Clin Med.* 2021 Mar 2;10(5):1004.
6. Gilreath J, Lo M, Bubalo J. Thrombopoietin Receptor Agonists (TPO-RAs): Drug Class Considerations for Pharmacists. *Drugs.* 2021 Jul;81(11):1285-1305.

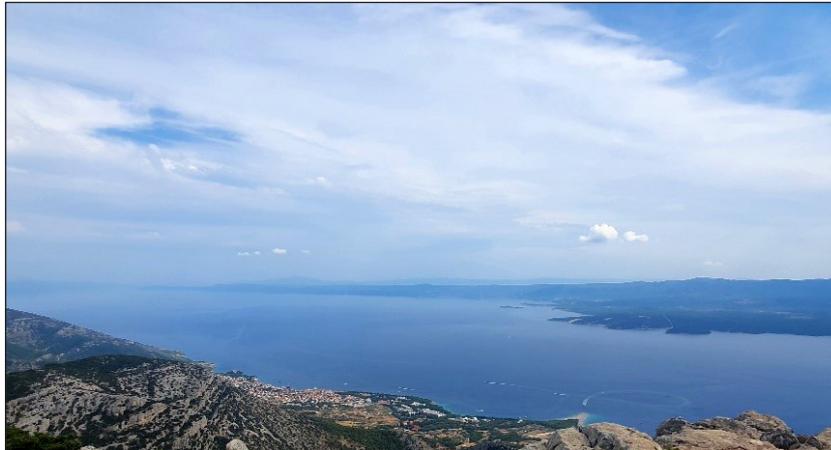
## Hemoglobin i more: gdje je veza?

Vlatka Krizmanić<sup>1</sup>, Inga Mandac Smoljanović<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Odjel za opću internu medicinu, internističku onkologiju i hematologiju, Opća bolnica Karlovac

<sup>2</sup>Zavod za hematologiju, KB Merkur

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



### Hemoglobinopatije

Hemoglobinopatije su čest nasljedni poremećaj uzrokovan kvantitativnim ili kvalitativnim poremećajima u sintezi hemoglobina. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), više od 5% svjetske populacije je zahvaćeno tim poremećajima i svake godine se na svijetu rodi 300 000-400 000 djece s ozbiljnim hemoglobinopatijama.

Iako originalno potječu iz srednjeg istoka (Zapadna Azija) i dijela Afrike, svakodnevne migracije su proširile hemoglobinopatije po cijelom svijetu.

### Talasemije

Talasemije pripadaju skupini hemoglobinopatija, nasljednih hematoloških poremećaja sa smanjenim ili odsutnim stvaranjem  $\alpha$  ili  $\beta$  globinskih lanaca. Hemoglobin A je tetramer od 4 podjedinice:  $2\alpha$  i  $2\beta$ . Svaka podjedinica ima porfirinski prsten koji drži molekulu željeza. To je vezno mjesto za kisik. Nerasazmjer u stvaranju  $\alpha$  ili  $\beta$  globinskih lanaca dovodi do stvaranja precipitata nesparenih lanaca u eritroidnim prekursorima koštane srži i zrelih eritrocitima što za posljedicu ima neefektivnu eritropoezu i perifernu hemolizu.

### Epidemiologija i povijest

Naziv potiče od grčkih riječi *talassa* – more i *haima* - krv. Beta-talasemija je najčešća u mediteranskim zemljama (otkud i potiče naziv), bliskom Istoku, Indiji, subsaharskoj Africi, jugoistočnoj Kini itd. U navedenim regijama malarija jest ili je bila en-

demska bolest, a hemoglobinopatije smanjuju rizik od razvoja malarije zbog otežanog rasta Plasmodiuma u eritrocitima s poremećajem hemoglobina.

### Nasljeđivanje i patofiziologija

Talasemije se uglavnom nasljeđuju autosomno recesivno. Postoji i dominantni oblik nasljeđivanja ali je rijedak.

*Alfa* talasemija nastaje zbog delecije alfa globinskog gena na kromosomu 16 i nasljeđivanje je kompleksno. Osoba nasljeđuje dva alfa globinska alela od svakog roditelja. Da bi se potpuno zaustavilo stvaranje  $\alpha$  globinskog lanca potrebna je delecija sva četiri gena.

*Beta* talasemije su izrazito heterogena skupina bolesti. Poznato je više od 350 mutacija beta globinskog gena na kromosomu 11. Ovisno o prirodni mutacije,  $\beta$  globinski lanac može biti odsutan ( $\beta^0$ ) ili je njegovo stvaranje smanjeno ( $\beta^+$ ).

Roditelji oboljelog djeteta su heterozigoti i nose lji jedne kopije  $\beta$  globinskog gena. Prilikom začeća svako dijete heterozigodnih roditelja ima 25% rizik za teži oblik bolesti, 50% posto su asimptomatski prenositelji, a 25% je bez bolesti i nije prenositelj gena.

Stupanj neravnoteže između  $\alpha$  i  $\beta$  ili gama globinskog lanca najviše utječe na težinu bolesti.

U slučaju *alfa* talasemije klinička slika ovisi o tome je li došlo do delecije jednog, dva, tri ili sva četiri alela za  $\alpha$  globinski lanac.

Delecija sva četiri gena uzrokuje poremećaj stva-

ranja fetalnog hemoglobina te nastaje hemoglobin Barts (tetramer  $\gamma$  globinskih lanaca) sa ekstremno visokim afinitetom vezivanja kisika. Poremećaj koji nastaje naziva se *hydrops fetalis* i završava intrauterinom smrću. Delecija tri alfa globinska gena dovodi do stvaranja HbH koji je tetramer  $\beta$  globinskih lanaca, poremećaj se manifestira mikrocitnom hipokromnom anemijom i splenomegalijom jer HbH precipitira u eritrocitima i dovodi do hemolize. U slučaju poremećaja jednog ili dva alfa globinska gena nema značajnih kliničkih manifestacija, ali u laboratorijskim nalazima MCV i MCH mogu biti niži, a broj eritrocita povišen.

Kod asimptomatskih prenositelja *beta* talasemije, dvostruko je više  $\alpha$  lanaca što je praćeno uglavnom urednom hematopoezom sa blažom mikrocitozom i hipokromijom. Kod težeg oblika *beta* talasemije tj. talasemije intermedije, omjer  $\alpha$  i  $\beta + \gamma$  globinskih lanaca je 3-4:1, a kod najtežeg oblika tj. talasemije major, odsutno je stvaranje  $\beta$  globinskog lanca.

Višak  $\alpha$  lanaca stvara precipitate koji dovode do oštećenja stanične membrane i intracelularnih organela, stvaraju se reaktivni metaboliti kisika koji dalje oštećuju proteine i lipide stanične membrane. Anemija u teškim *beta* talasemijama posljedica je ne samo neefektivne eritropoeze već i skraćenja životnog vijeka eritrocita uslijed nakupina  $\alpha$  globina.

### Klinička slika i podjela

*Podjela alfa talasemija* – Alfa-talasemija major je najteži oblik bolesti koji nastaje kod delecije sva četiri alfa globinska gena i stvaranja *hemoglobina Barts*. U prirodnom tijeku bolesti nastaje intrauterina smrt ploda- *hydrops fetalis*. Ukoliko se primjeni intrauterina transfuzija prije 28. tjedna gestacije, *hydrops fetalis* se može spriječiti.

Težina kliničke slike bolesti *hemoglobina H* varira od umjerene anemije koja može biti asimptomatska do težeg stupnja mikrocitne anemije koja može zahtijevati i povremene transfuzije, uglavnom u periodima kada je pojačana hemoliza (infekcije), u trudnoći (dilucijska anemija) ili u slučaju aplastične krize (parvovirus infekcija).

Alfa-talasemija *minor* predstavlja stanje sa gubitkom dva alfa gena i manifestira se blagom anemijom sa mikrocitozom i hipokromijom.

Alfa-talasemija *minima* je stanje sa gubitkom jednog alfa globinskog gena. Osobe su asimptomatski prenositelji bez anemije i mikrocitoze (u razmazu periferne krvi može biti prisutna hipokromija), u elektroforezi hemoglobina ne nalazi se HbH.

### Podjela beta-talasemija

Talasemija *major* (mediteranska ili Cooleyeva anemija) je najteži oblik, a pojavljuje se kod djece kojima su oba roditelja prenositelji talasemije (heterozigoti).

$\beta$  lanac se ne stvara ( $\beta^0$ ) ili se stvara samo mala količina  $\beta$  lanca. Počinje se manifestirati u periodu od 6 mjeseci do druge godine života kada dolazi do zamjene fetalnog hemoglobina adultnim. Ako se talasemija major ne liječi dolazi do karakteristične kliničke slike sa zaostajanjem u rastu, ikterusom, blijedilom, hepatosplenomegalijom, ulceracijama donjih ekstremiteta, razvojem ekstramedularne hematopoeze, deformitetima skeleta sa karakterističnim promjenama kostiju lica – *facies thalassemica* (izbočene frontalne i parijetalne kosti).

Zbog kronične hipoksije javljaju se promjene srčanog mišića sa posljedičnim srčanim popuštanjem ili nastankom aritmija.

Bolesnici su osjetljivi na infekcije.

Ako se talasemija major liječi redovitim transfuzijama sa održavanjem vrijednosti hemoglobina 90-100 g/L, rast i razvoj su uredni. Osobe koje primaju redovito transfuziju (Ovisno o kliničkim simptomima anemije, ali najčešće kad je razina Hb < 70g/L) mogu živjeti i duže od 40 godina.

Talasemija *intermedija* počinje se manifestirati u kasnijoj dobi nego talasemija major, u najtežim slučajevima u dobi 2 do 6 godina.

Klinička slika varira, bolesnici mogu biti ovisni o transfuzijama ili potpuno asimptomatski do odrasle dobi sa blagom anemijom. Uslijed neefektivne eritropoeze i periferne hemolize pacijenti mogu razviti kolelitijazu.

Talasemija *minor* je uglavnom asimptomatska, heterozigotni prenositelji ponekad imaju blagu anemiju s hipokromnim, mikrocitnim eritrocitima, što može biti zamjenjeno za nedostatak željeza.

Danas se koristi i podjela na talasemije *ovisne i neovisne o transfuziji*.

Talasemija ovisna o transfuzijama obuhvaća talasemije major i neke slučajeve intermedije i bolesti HbH. I u ovoj podjeli posebno je izdvojena talasemija minor koja obuhvaća asimptomatske heterozigotne prenositelje.

Preopterećenje željezom je često i kod talasemija ovisnih o transfuziji kao i kod onih koje nisu ovisne o transfuziji. Uzrok je povećana apsorpcija željeza u crijevima uslijed neefektivne eritropoeze ili preopterećenje željezom uslijed brojnih transfuzija.

## Postavljanje dijagnoze

### Povijest bolesti i klinički status

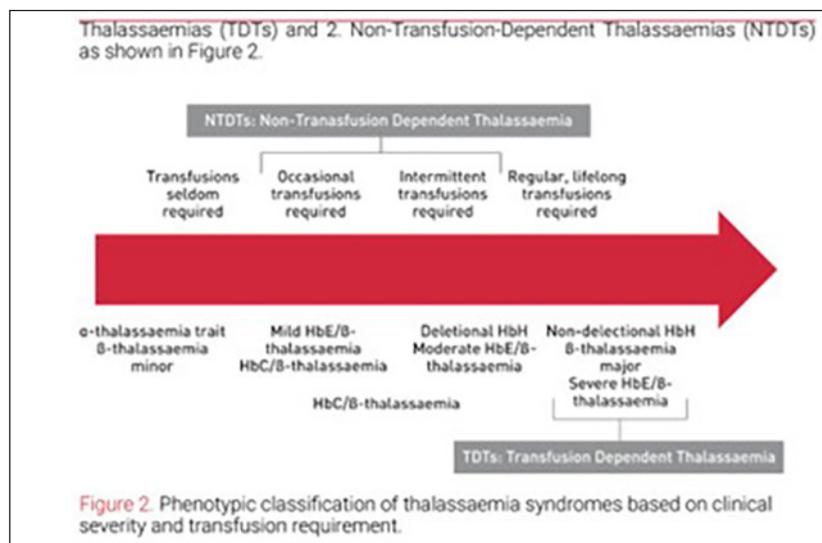
Obiteljska anamneza može pomoći u postavljanju dijagnoze, određivanju tipa i težine talasemije. Pojava simptoma u djetinjstvu (6 do 12 mjeseci) upućuje na talasemiju ovisnu o transfuziji. Povijest žučnih kamenaca upućuje na kroničnu hemolizu, ikterus sa tamnim urinom upućuje na značajnu hemolizu, a usporen rast i promjene skeleta upućuju na ekstramedularnu hematopoezu.

### Laboratorijski nalazi

Mikrocitna hipokromna anemija je tipična za talasemijske sindrome ( talasemija major Hb < 70g/L, MCV 50 – 70 fL, intermedija Hb 70-100 g/L, MCV 50-80 fL). Umjerena mikrocitoza i blaga anemija mogu biti prisutne kod asimptomatskih prenositelja.

U težim slučajevima bolesti prisutni su i drugi poremećaji eritrocita; izražena hipokromija, poikilociti, target stanice (kodociti, eritrociti poput mete), dakriociti i stanični fragmenti. Broj eritrocita je povišen što može pomoći u razlikovanju od sideropenične anemije.

**Slika 1. Transfuzijsko liječenje ovisi o vrsti talasemije (preuzeto sa <https://www.thalassemia.org/wp-content/uploads/2021/06/TIF-2021-Guidelines-for-Mgmt-of-TDT.pdf>)**



Talasemija major liječi se redovitim transfuzijama sa ciljanom vrijednosti hemoglobina prije transfuzije od 95 do 100 g/L, a vrijednost hemoglobina nakon transfuzije treba biti 120-130 g/L. Talasemija intermedija obično kasnije u životu zahtjeva transfuziju, simptomi se razvijaju kada vrijednost hemoglobina padne ispod 70g/L i transfuzije mogu biti povremene, a procjena indikacije za transfuziju eritrocita treba ovisiti o komorbiditetima i jačini tegoba.

Hemoliza je neimuna sa povišenom vrijednosti LDH i indirektnog bilirubina, sniženim haptoglobinom i negativnim Coombs-ovim testom, vrijednost retikulocita može biti blago povišena. Broj leukocita i trombocita je uredan. Feritin je normalne vrijednosti ili povišen osim u stanjima istovremenog deficita željeza.

Elektroforeza hemoglobina i genetski testovi potrebni su za potvrdu dijagnoze.

Diferencijalno dijagnostički može se posumnjati na sideropeničnu anemiju, anemiju kronične bolesti, druge nasljedne anemije, bolesti jetre i druge bolesti kod kojih se mogu javiti target eritrociti (nakon splenektomije).

## Liječenje

### Liječenje anemije

Transfuzijsko liječenje ovisi o vrsti talasemije. Redovite ili povremene transfuzije eritrocita ublažavaju simptome anemije i suprimiraju ekstramedularnu hematopoezu. (slika 1).

### Liječenje kelatorima željeza.

Primjena kelatora željeza najčešće počinje nakon 2 do 3 godine od početka transfuzijskog liječenja. Vrlo je važno primijeniti kelatore svakodnevno (ukoliko bolesnik tolerira i nema značajnijih nuspojava na peroralne), ili najmanje 5 dana u tjednu u slučaju parenteralnog pripravka i u odgovarajućim dozama. U kliničkoj praksi često se za početak primjene kelatora željeza odlučuje ukoliko je bolesnik

dobio najmanje 10 do 20 transfuzija ili je razina feritina iznad 1000 qg/L. Ne preporučuje se uzimanje vitamina C uz kelatore željeza.

Od kelatora se koriste deferoksamin, deferipron i deferasiroks.

Neučinkovita eritropoeza je povezana i sa otpuštanjem eritroferona, koji suprimira hepcidin čime se pomoću intestinalnog feroportina povećava apsorpcija željeza što dodatno podržava opterećenje željezom. Stoga je jedan dio istraživanja novih lijekova usmjeren prema sintetskim hepcidinima ili mimeticima hepcidina.

Dugotrajna potreba za transfuzijskim liječenjem i primjena kelatora željeza značajno poboljšava kvalitetu života, utječe na duljinu trajanja života, ali veliki dio bolesnika se suočava s komplikacijama preopterećenja željezom, unatoč kelatorima. Dio bolesnika susrest će se i s ozbiljnijim nuspojavama kelatora željeza zbog čega će morati prekinuti terapiju.

U beta talasemiji, jedan od ciljeva liječenja može biti smanjenje sinteze hema.i

Zbog istaknute uloge TGF- $\beta$  signalizacije u homeostazi kostiju i mišića, luspatercept i druge slične molekule, kao što je sotatercept (modificirani ActRIIA-huIgG1), u početku su razvijani kao istraživačke terapije za osteopeniju i osteoporozu. Međutim, nakon otkrivanja izraženih eritroidnih odgovora uključujući povećanje hemoglobina i hematokrita u pretkliničkim i ranim kliničkim studijama, započeta je njihova uporaba u  $\beta$ -talasemiji. Beta talasemija s popratnim deficitom u beta lancu rezultira mikrocitnom anemijom i hemolizom, a poremećaj alfa globinskog lanca uzrokuje nakupljanje kompleksa hema alfa globinskog gena kao sliku neučinkovite hematopoeze.

Krajem 2019. luspatercept je postao prvi lijek odobren za liječenje anemije u beta talasemiji koji su bili ovisni o transfuziji.

BELIEVE studija je uključila 336 bolesnika s beta talasemijom ovisnih o transfuzijama. Uz početnu dozu od 1mg/kg svaka 3 tjedna do postupnog povećanja doze na 1,25mg/kg. Kod 21,4% bolesnika došlo je do redukcije transfuzijskih potreba za 33% od 13 do 24.tjedna, za razliku od 4,5% u grupi bez luspatercepta.

Prema preporukama međunarodne grupe za talasemije iz 2021., luspatercept je indiciran kod bolesnika s beta talasemijom koji su ovisno o transfuzijama, ali i onih koji nisu liječeni transfuzijama, ali zadovoljavaju kriterije za transfuzijsko liječenje. Luspatercept se ne preporučuje kod djece, trudnica i kod splenektomiranih bolesnika.

Splenektomija se preporučuje u slučaju teške anemije koja ne reagira na neinvazivne metode liječenja, izrazitog povećanja potrebe za transfuzijama, zaostajanja u rastu, hipesplenizma koji vodi citopenijama, simptomatske splenomegalije, infarkta slezene ili splenične venske tromboze.

Alogenična transplantacija krvotvornih matičnih stanica predstavlja potencijalno kurativni oblik liječenja za pacijente sa teškom anemijom koji su ovisni o transfuziji. Može se primjeniti kod pacijenata sa podudarnim donorom koji nemaju druge komorbiditete.

Genska terapija – koristi se lentivirusni vektor normalnog beta globinskog gena u autolognu matičnu stanicu. Betibeglogen autotemcel (zynteglo) odobren je 2022. od strane FDA za liječenje djece I odraslih sa beta talasemijom ovisnom o transfuziji.

Gensko savjetovanje preporučuje se svim osobama sa svim oblicima talasemije.

## Zaključak

Hemoglobinopatije postaju sve više zastupljene u hematološkim ambulantom diljem svijeta. Globalna svjesnost o tom poremećaju u zadnjih nekoliko godina posebno ističe potrebu za poboljšanom skrbi te skupine bolesnika uzimajući u obzir njihove socioekonomske uvjete i dostupnost zdravstvene zaštite. Potrebno je poboljšati dijagnostiku i stratificiranje bolesnika s težim hemoglobinopatijama kako bi im kombinirana terapija koju budućnost donosi i ciljani lijekovi mogli utjecati na klinički tijek bolesti uz veću kvalitetu života.

**Literatura:**

1. Nienhuis AW, Nathan DG. Pathophysiology and Clinical Manifestations of the  $\beta$ -Thalassemias. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;1;2(12).
2. De Sanctis V, Kattamis C, Canatan D, Soliman AT, Elsedfy H, Karimi M, Daar S, Wali Y, Yassin M, Soliman N, Sobti P, Al Jaouni S, El Kholy M, Fiscina B, Angastiniotis M.  $\beta$ -Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;20;9(1)
3. Harewood J, Azevedo AM. Alpha Thalassemia. [Updated 2021 Sep 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441826/>
4. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; 21;5:11.
5. Edward J Benz, Jr, Emanuele Angelucci, Diagnosis of thalassemia (adults and children). [https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-thalassemia-adults-and-children?search=beta%20thalassemia&sectionRank=1&usage\\_type=default&anchor=H16430211&source=machineLearning&selectedTitle=1~150&display\\_rank=1#H16430211](https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-thalassemia-adults-and-children?search=beta%20thalassemia&sectionRank=1&usage_type=default&anchor=H16430211&source=machineLearning&selectedTitle=1~150&display_rank=1#H16430211), Datum pristupa 1. listopada 2022.
6. Edward J Benz, Jr, Emanuele Angelucci. Management of thalassemia. [https://www.uptodate.com/contents/management-of-thalassemia?search=thalassemia%20treatment&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/management-of-thalassemia?search=thalassemia%20treatment&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1) Datum pristupa 1. listopada 2022.
7. Boris Labar I suradnici. Hematologija. Zagreb: Školska knjiga; 2017; str 166-170
8. Taher AT, Musallam KM, Cappellini MD.  $\beta$ -Thalassemias. *N Engl J Med.* 2021; 384(8): 727- 743.
9. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 2010; 12(2): 61- 76.
10. Longo F, Tesio N, Piolatto A, Battista Ferrero G, Piga A. Luspatercept for the treatment of  $\beta$ -thalassemia: from preclinical research to clinical practice and beyond. *Future Rare Dis.* 2021; 1: 4.
11. Taher AT, Cappellini MD. Luspatercept for  $\beta$ -thalassemia: beyond red blood cell transfusions. *Expert Opin Biol Ther.* 2021;21(11):1363-1371.
12. Kang C, Syed YY. Luspatercept: A Review in Transfusion-Dependent Anaemia due to Myelodysplastic Syndromes or  $\beta$ -Thalassaemia. *Drugs.* 2021;81(8):945-952.
13. Kattamis A, Viprakasit V, Cappellini MD, et al. Luspatercept improves quality of life and reduces red blood cell transfusion burden in patients with non-transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia in the BEYOND trial. *Blood.* 2021; 138(suppl 1): 3081.
14. Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia. 4th ed. TIF; 2021.
15. Santarone S, Angelini S, Natale A, Vaddinelli D, Spadano R, Casciani P, Papola F, Di Lembo E, Iannetti G, Di Bartolomeo P. Survival and late effects of hematopoietic cell transplantation in patients with thalassemia major. *Bone Marrow Transplant.* 2022. 24:1–9.
16. Leonard A, Tisdale JF, Bonner M. Gene Therapy for Hemoglobinopathies: Beta-Thalassemia, Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2022 Aug;36(4):769-795.

## Dijagnostika i liječenje hereditarne hemoragijske teleangiektazije

Marija Ivić, Zdravko Mitrović, Anamarija Vrkljan Vuk, Rajko Kušec, Vlatko Pejša

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Dubrava

### Uvod

Hereditarna hemoragijska teleangiektazija (HHT) ili Rendu Osler Weberova bolest je autosomno dominantno nasljedna bolest karakterizirana malformacijama krvnih žila. Bolest nastaje zbog mutacija jednog od tri do sada poznata gena, te se ovisno o vrsti mutacije dijeli u tri skupine: endoglin (ENG) tip I, aktivin receptor-like kinase (ACVRL1) tip 2 i SMAD4 specifičan za juvenilna polipoza-HHT sindrom preklapanja (1). Svaki od navedenih gena kodira proteine koji su dio signalnog puta TGF $\beta$  koji je ključan u angiogenezi. Zbog poremećaja u razvoju dolazi do nastanka krhkih i tortuotičnih kapilara i venula (1). Do sada je opisano više od 600 različitih mutacija koje dovode do kliničke ekspresije HHT-a (2). Bolest je karakterizirana vaskularnim malformacijama kože, sluznice nosa i gastrointestinalnog sustava te krvnih žila mozga, pluća i jetre. Klinički, bolest je karakterizirana učestalim krvarenjima iz nosa ili gastrointestinalnog sustava, teleangiektazijama lica (slika 1) te brojnim komplikacijama zbog arteriovenskih malformacija (AVM) pojedinih organskih sustava (apscesi mozga, plućna hipertenzija, portalna encefalopatija itd.).

Slika 1: Teleangiodiplazije lica



Prevalencija bolesti iznosi oko 1:5000-8000 ovisno o geografskom području, međutim obzirom da je bolest vrlo često neprepoznata, točna prevalencija je i do danas neprepoznata (3-7). Dijagno-

za bolesti postavlja se na temelju Curaçao kriterija (tablica 1), a to su: teleangiektazije, epistakse, arteriovenske malformacije te obiteljska anamneza (prvi krvi srodnik s poznatom HHT) (8). Genetsko testiranje, iako se preporuča nije neophodno za postavljanje dijagnoze jer je vrlo kompleksno, a izvodi se samo u nekoliko centara u svijetu. Radi se o multidisciplinarnoj bolesti s brojnim kliničkim prezentacijama. Sideropenična anemija koja ne odgovara adekvatno na peroralne preparate željeza jedan je od najčešćih znakova bolesti i glavni je razlog upućivanja ovih bolesnika u hematološke ambulante. Međunarodna organizacija Cure HHT koja obuhvaća veliki broj stručnjaka diljem svijeta objavila je smjernice za dijagnostiku i liječenje HHT-a čiji je cilj bio donošenje konsenzusa temeljenog na dokazima za dijagnozu, liječenje, ali i prevenciju komplikacija ove bolesti (9).

Tablica 1.: Curaçao kriteriji

<b>Teleangiektazije</b>	Koža lica, prstiju i usnica, sluznica nosa
<b>Epistakse</b>	Spontane i ponavljajuće
<b>Arteriovenske malformacije</b>	Mozak, kralježnička moždina, pluća, jetra, teleangiektazije probavnog sustava
<b>Pozitivna obiteljska anamneza</b>	Prvi rođak s poznatom dijagnozom HHT-a
<b>Tri i više kriterija</b>	definitivna dijagnoza
<b>Dva kriterija</b>	vjerojatna dijagnoza
<b>Jedan kriterij</b>	manje vjerojatna dijagnoza

### Epistakse

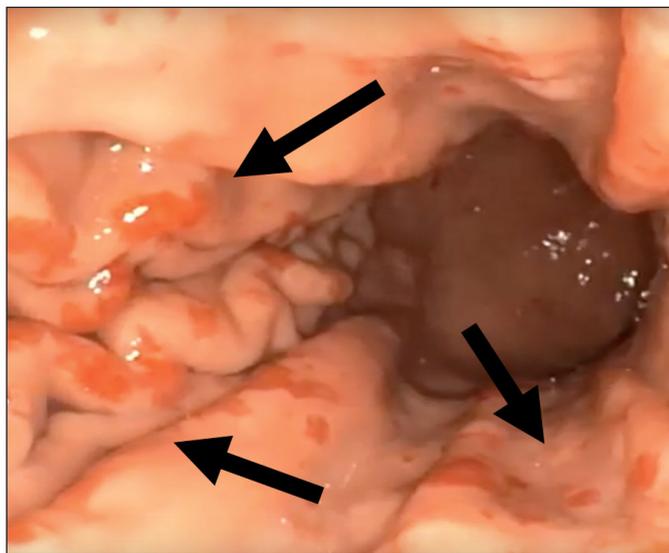
Spontana i ponavljajuća krvarenja iz nosa obično su prvi, ali i najčešći znak bolesti. Javljaju se u oko 90% bolesnika, a kod velikog dijela bolesnika one su gotovo svakodnevne i najčešći su uzrok sideropenične anemije (10). Prva linija liječenja, odnosno prevencije jest redovito vlaženje sluznice nosa topičkim pripravcima (npr. fiziološka otopina). Ukoliko ne dođe do smanjenja učestalosti krvarenja uz primjenu pripravka za vlaženje sluznice preporuča se primjena oralnih pripravaka traneksemične kiseline. Treća linija terapije jest ablacijsko tretiranje teleangiektazija nosa, a ukoliko sve navedeno nije

učinkovito prema smjernicama indicirano je uvođenje bevacizumaba (9). Bevacizumab je monoklonsko IgG protutijelo koje inhibira vaskularni endotelni faktor rasta -VEGF i pokazao se vrlo učinkovit u nekoliko studija (11,12,13). Ukoliko na niti jednu od gore navedenih opcija na dolazi do poboljšanja indicirano je kirurško liječenje (9). Klinička procjena uspjeha liječenja temelji se na određivanju Nasal Severity Score-a (NSS, dostupno na <https://curehht.org/understanding-hht/diagnosis-treatment/nosebleed-severity-score/>).

### Gastrointestinalna krvarenja

Krvarenja iz probavnog sustava posljedica su krvarenja iz angiodisplazija sluznice probavnog sustava (slika 2).

**Slika 2: Angiodisplazije želuca**



Učestalost gastrointestinalnih krvarenja raste s dobi i vrlo su rijetka u mlađoj populaciji (14). Obzirom da su krvarenja najčešće uzrokovana krvarenjima iz teleangiektazija želuca Cure HHT predlaže gastroskopiju kao prvu metodu probira na gastrointestinalna krvarenja (9). Ukoliko se teleangiektazije ne dokažu ezofagogastroduodenoskopijom savjetuje se učiniti i pretragu endoskopskom kapsulom. Kod manjeg dijela bolesnika kod kojih postoji sumnja na krvarenja iz debelog crijeva ili su u dobi za probir na kolorektalni karcinom preporuča se učiniti i kolonoskopiju (9). Kod svih bolesnika s dokazanom SMAD4 mutacijom (juvenilna polipoza-HHT sindrom) preporuča se odmah kod sumnje na krvarenja iz probavne cijevi učiniti kolonoskopiju jer imaju veći rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma (15). Stupanj težine gastrointestinalnih krvarenja određuje se prema potrebi za nadomjesnim pripravcima željeza ili transfuzijskim liječenjima. Ukoliko bolesnici postižu zadovoljavajuće vrijednosti hemoglobina

peroralnim pripravcima željeza radi se o blagom krvarenju, ukoliko je za postizanje ciljnih vrijednosti hemoglobina potrebna primjena parenteralnih preparata željeza radi se o umjerenim krvarenjima, a ukoliko su potrebne transfuzije krvi radi se o vrlo teškim krvarenjima (9). Kao prva linija kod blagih krvarenja preporuča se terapija oralnim antifibrinolitikima. Argon plazma koagulacija (APC) preporuča se primarno prilikom dijagnostičke endoskopije ili kod aktivnog krvarenja. Zbog rizika od nastanka ijtorgenih ozljeda sluznice ne preporuča se ponavljanje APC ukoliko se sistemska terapija pokaže učinkovitom (9). Kod svih bolesnika sa srednjim ili teškim stupnjem krvarenja potrebno je primijeniti bevacizumab. Standardna doza bevacizumaba je 5 mg/kg prema slijedećem protokolu: četiri doze svaka dva tjedna i nakon toga četiri doze svakih mjesec dana (13). Daljnja primjena i doza lijeka ovisi o odgovoru bolesnika te postignutim vrijednostima hemoglobina.

### Arteriovenske malformacije

Arteriovenske malformacije mogu se javiti u mozgu, kralježničkoj moždini, jetri i u plućima. Iako su kod znatnog dijela bolesnika AVM asimptomatske ponekad, ovisno o lokalizaciji mogu dovesti do raznih, ponekad i životno ugrožavajućih komplikacija kao što su apscesi mozga i kralježničke moždine, plućna hipertenzija, srčana dekompenzacija, hepatosplenomegalija i portalna hipertenzija. Metoda izbora za dijagnozu AVM mozga jest magnetska rezonanca. Metoda izbora za probir na plućne AVM jest transtorakalna kontrastna ehokardiografija jer je dokazana veća senzitivnost u odnosu standardnu MSCT plućnu angiografiju (16). Jetrene AVM mogu se dokazati jednom od tri metode: ultrazvučni pregled abdomena, MSCT ili MR jetre. Kod svih bolesnika preporuča se učiniti probir na AVM specifičnih lokacija pri samoj dijagnozi. Liječenje se preporuča samo simptomatskih bolesnika i trudnica s plućnim ili moždanim AVM u trećem trimjesečju trudnoće. Naime, bolest tijekom trudnoće može progredirati, a u jedan posto trudnica dolazi do smrtnog ishoda kao posljedice krvarenja iz plućnih AVM (17). Kod svih bolesnika s poznatim plućnim AVM savjetuje se antibiotska profilaksa prije dentalnih ili kirurških zahvata jer postoji visok rizik sepse (9,18). Metoda izbora liječenja simptomatskih AVM pluća i živčanog sustava jest embolizacija (9). Prva linija liječenja kod bolesnika koji zbog jetrenih AVM razviju srčano popuštanje ili plućnu hipertenziju jest simptomatsko, a ukoliko i uz simptomatske

mjere liječenja ne dolazi do značajnijeg poboljšanja preporuča se primjena bevacizumaba (9, 19).

### Anemija i antikoagulantna terapija

Anemija je jedan od najčešćih znakova ove bolesti, može biti prisutna već u djetinjstvu, a kod većine bolesnika se s godinama pogoršava zbog učestalih epistaksi i/ili krvarenja iz angiodisplazija probavnog sustava. Preporuča se redovita kontrola krvne slike te nadoknada željeza ovisno o nalazima. Prva linija liječenja jesu peroralni pripravci željeza, a kod bolesnika kod kojih ne dolazi do adekvatnog odgovora na peroralne pripravke ili se javlja intolerancija na iste preporuča se primjena intravenskih pripravaka željeza (9). Transfuzijsko liječenje preporuča se kod hemodinamski nestabilnih bolesnika ili kod onih kod kojih ne dolazi do adekvatnog porasta hemoglobina nakon intravenske primjene željeza. Zanimljivo je također da su dvije studije pokazale da kod bolesnika oboljelih od HHT-a postoji veći rizik za nastanak tromboze što se povezuje sa sideropeničnom anemijom, ali i povišenom koncentracijom faktora VIII (20, 21). Antikoagulantna terapija nije kontraindicirana kod ovih bolesnika, ali treba uvijek uzeti u obzir visok rizik krvarenja te izbjegavati istodobnu primjenu antiagregacijske i antikoagulantne terapije ili dvojne antiagregacijske terapije kad je to moguće.

### Zaključak

Hereditarna hemoragijska teleangiektazija je rijetka nasljedna bolest. Radi se o bolesti koja zahvaća više organskih sustava i može se prezentirati brojnim ranije navedenim znakovima i simptomima. Bolest je često neprepoznata i dijagnoza se postavlja uglavnom u odrasloj dobi. Sama dijagnoza i adekvatno liječenje ovih bolesnika zahtjeva suradnju stručnjaka iz više područja. Unatoč znatnom napretku u liječenju ove bolesti zadnjih nekoliko godina ono je još uvijek temeljeno prvenstveno na prevenciji i zbrinjavanju pojedinih komplikacija bolesti. Jedini lijek koji je do sada pokazao značajno smanjenje učestalosti epistaksi i gastrointestinalnih krvarenja te komplikacija jetrenih AVM jest bevacizumab iako se rezultati prvenstveno temelje na rezultatima retrospektivnih studija ili prospektivnih studija na manjem broju bolesnika. Nedavna studija je pokazala kako bolesnici oboljeli od HHT-a koji se zbrinjavaju u centrima izvrsnosti i kod kojih se na vrijeme započne liječenje imaju jednaki životni vijek kao kontrolna skupina bez HHT-a (22). Zbog toga je važno inzistirati na suradnji specijalista iz

više područja (hematologija, gastroenterologija, pulmologija, kardiologija, ORL, intervencijska radiologija) kako bi se oformili multidisciplinarni timovi te pravodobno prevenirale komplikacije bolesti i osigurala adekvatna skrb bolesnika.

### Literatura:

1. Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet.* 2006;43:97-110.
2. Govani FS, Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:860-71.
3. Bideau A, Plauchu H, Brunet G, Robert J. Epidemiological investigation of Rendu-Osler disease in France: its geographical distribution and prevalence. *Popul.* 1989;44:3-22.
4. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 1995;333:918-24.
5. Kjeldsen AD, Vase P, Green A. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *J Intern Med.* 1999;245:31-9.
6. Buscarini E, Buscarini L, Civardi G, Arruzzoli S, Bossalini G, Piantanida M. Hepatic vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: imaging findings. *AJR Am J Roentgenol.* 1994;163:1105-10.
7. Dakeishi M, Shioya T, Wada Y i surad.: Genetic epidemiology of hereditary hemorrhagic teleangiectasia in local community in the northern part of Japan. *Hum Mutat.* 2022; 19:140-8.
8. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E i surad.: Diagnostic criteria hereditary hemorrhagic teleangiectasia (Rendu Osler Weber syndrome). *Am J Med Genet.* 2000;91:66-67.
9. Faughnan ME, Mager JJ, Hetts SW i surad. Second International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Ann Intern Med.* 2020;173:989-1001.
10. Silva BM, Hosman AE, Devlin HL, Shovlin CL. Lifestyle and dietary influences on nosebleed severity in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope.* 2013;123:1092-9.
11. Župančić-Šalek S, Poje G, Bašić Kinda S, Pulanić D, Vodanović M, Boban A. Uspješno liječenje opetovanih epistaksi bevacizumabom bolesnika sa sindromom Osler-Weber-Rendu. *Liječ vjes.* 2017;139:14-15.
12. Thompson AB, Ross DA, Berard P, Figueroa-Bodine J, Livada N, Richer SL. Very low dose bevacizumab for the treatment of epistaxis in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Allergy Rhinol (Providence).* 2014;5:91-95.
13. Iyer V, Apala D, Pannu B i surad. Intravenous Bevacizumab for Refractory Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia-Related Epistaxis and Gastrointestinal Bleeding. *Mayo Clinic proceedings.* 2018;93:155-166.
14. Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev.* 2010;24:203-19.
15. Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TG i surad. SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet.* 2006;43:793-797.
16. Fughnan M, Palda V, Garcia-Taso G i surad.: International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J med Genet.* 2011;48:73-87.

17. Gershon AS, Faughnan ME, Chon KS i surad. Transcatheter embolotherapy of maternal pulmonary arteriovenous malformations during pregnancy. *Chest*. 2001;119:470-7.
18. Shovlin C Bamford K, Wray D. Post-NICE 2008: Antibiotic prophylaxis prior to dental procedures for patients with pulmonary arteriovenous malformations (PAVMs) and hereditary haemorrhagic telangiectasia. 2008;205:531-3.
19. Chavan A, Schumann-Binarsch S, Schmuck i surad. Emerging role of bevacizumab in management of patients with symptomatic hepatic involvement in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Am J Hematol*. 2017;92:E641-E644.
20. Livesey JA, Manning RA, Meek JH i surad. Low serum iron levels are associated with elevated plasma levels of coagulation factor VIII and pulmonary emboli/deep venous thromboses in replicate cohorts of patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thorax*. 2012;67:328-33.
21. Shovlin CL, Sulaiman NL, Govani FS, Jackson JE, Begbie ME. Elevated factor VIII in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): association with venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2007;98:1031-9.
22. De Gussem EM, Kroon S, Hosman AE i surad.: Hereditary Hemorrhagic teleangiectasia (HHT) and survival: The importance of Systematic Screening and treatment in HHT Centres of Excellence. *J Clin Med*. 2020;9: 3581.

## Indikacije za primjenu intravenskih gamaglobulina u hematoloških bolesnika

Mirela Raos<sup>1,2</sup>, Dražen Pulanić<sup>2,3</sup>, Fini Plenković<sup>1</sup>, Marija Lukić<sup>1</sup>, Branka Golubić Čepulić<sup>1,2</sup>

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

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

<sup>3</sup>Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti, KBC Zagreb

Intravenski gamaglobulini (IVIg) primjenjuju se kao nadomjesna terapija kod primarnih i sekundarnih imunodeficijencija, te kao imunomodulatorna terapija kod imunoloških, neuroloških, hematoloških, dermatoloških i nekih drugih bolesti. Potrebe za IVIg-om kontinuirano rastu, a pretpostavka je da će njegove potrebe zbog novih indikacija i dalje rasti (1). Dostupnost lijeka je ograničena obzirom da se proizvodi iz ljudske plazme. Za mnoge bolesti još uvijek nije dokazana učinkovitost IVIg-a pa su potrebna dodatna istraživanja. Kako bi potrošnja IVIg-a bila racionalna, vrlo je važno poznavati trenutne indikacije za njegovu primjenu. Zdravstvena osiguranja i bolnice kontroliraju njihovu primjenu donoseći preporuke za primjenu samo u bolestima s dokazanim indikacijama, a ostale odobravaju različite vrste povjerenstava. U Kliničkom bolničkom centru Zagreb smjernice za primjenu donijelo je Povjerenstvo za lijekove koje se temelje na znanstvenim dokazima, ali i smjericama Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje.

IVIg se proizvodi postupkom miješanja (pooliranja) plazme od nekoliko tisuća darivatelja (1 000 do 10 000). U proizvodnji se izolira frakcija imunoglobulina (Ig), pročišćava prvenstveno IgG razred i inaktiviraju se patogeni. Industrijska proizvodnja IVIg-a započela je 1970-tih godina, a već 1990-tih godina njegova proizvodnja premašuje proizvodnju faktora VIII i IX iz ljudske plazme jer ove lijekove zamjenjuju pripravci dobiveni rekombinantnom tehnologijom.

Mehanizam djelovanja IVIg-a u mnogim je bolestima nejasan. Vrlo je kompleksan, a ovisi o dozi primjenjenog IVIg-a, te o patogenezi bolesti. U svrhu razumijevanja mehanizma djelovanja, učinci IVIg-a se mogu podijeliti na: a) učinke posredovane s Fab varijabilnim regijama (antiproliferacijsko djelovanje, modulacija apoptoze i staničnog ciklusa, aktivacija specifičnih stanica, adhezijsko djelovanje, protutijela na patogene i imunoregulatorne molekule); b) učinke posredovane Fc regijom (inhibicija fagocitoze, stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima i sazrijevanja dendritičkih stanica); c) učinke posredovane vezanjem komplementa za Fc regiju; d)

učinke posredovane drugim molekulama u pripremu, npr. citokinima (2).

Indikacije za primjenu IVIg-a donose su temeljem randomiziranih kontroliranih istraživanja, dok se za rijetke bolesti temelji na stručnom mišljenju eksperata iz područja. Preporuke za primjenu IVIg-a se kontinuirano nadograđuju. Doziranje IVIg-a i protokol liječenja ovisi o indikaciji, a ovisno o kliničkom odgovoru liječenje može biti individualno za svakog pacijenta. Općenito se za nadomjesnu terapiju primjenjuje 0,4 g/kg svaka 3-4 tjedna, a za imunomodulatorno djelovanje 2 g/kg IVIg-a kroz 2-5 dana. Odobrene indikacije, doze i protokoli liječenja IVIg-om prema Europskoj medicinskoj agenciji (EMA) navedene su u Tablici 1 (3). Doziranje i indikacije IVIg kod hematoloških bolesti navedene su u Tablici 2 (4, 5). Najčešće se primjenjuje intravenozni oblik lijeka, ali jedan dio bolesnika može lijek dobiti subkutano (SCIg) u izvanbolničkim uvjetima pa primjena ovog oblika lijeka raste. Trenutno odobrene indikacije za sc. primjenu su primarne imunodeficijencije. Istodobnom primjenom hijaluronidaze uz SCIg poboljšava se njegova bioraspoloživost i rezultira farmakokinetikom sličnoj onoj kod primjene IVIg-a. Kod pravilnog doziranja 20%-tnog SCIg-a, primjena mu se može smanjiti na jednom u dva tjedna. Obzirom na nedostatak velikih randomiziranih istraživanja vezanih uz primjenu SCIg, ne može se preporučiti u svim indikacijama (5).

Tijekom primjene IVIg-a neželjene reakcije su relativno česte. Od neželjenih reakcija najčešće su blage reakcije (5% do 15%), poput glavobolje, mijalgije, boli u leđima, artralgijska, zimice, vrućice, umora, volumnog opterećenja, dok su one teže rijetke npr. tromboembolijski incidenti, hemoliza, anafilaktička reakcija i transfuzijom posredovano oštećenje pluća. Neželjene reakcije učestalije su kod pacijenata koji prvi puta primaju IVIg, te kod pacijenata s bakterijskom infekcijom ili kroničnom upalom (6). Nadalje, neželjene reakcije češće su opažene kod primjene veće koncentracije pripravka, liofiliziranog pripravka i brže infuzije pripravka. Dodatne tvari, poput stabilizirajućih agenasa mogu imati toksične učinke, npr. saharoza je toksična za bubrege, a neki noviji

pripravci umjesto šećera kao stabilizacijskog agensa liječenje nužno je odabrati pripravak sukladno potrebama i stanju pacijenta. u svom sastavu imaju aminokiseline. Za optimalno

**Tablica 1. Doziranje IVIg-a i protokoli liječenja za odobrene indikacije**

Indikacije	Startna doza	Doza održavanja i učestalost primjene
PID	0,4 - 0,8 g/kg/mjesec	min 0,2 g/kg svaka 3 do 4 tjedna
SID	-	0,2 - 0,4 g/kg svaka 3 do 4 tjedna
ITP	0,8 -1 g/kg prvi, a druga doza unutar 3 dana ili 0,4 g/kg dnevno 2-5 dana	Može se ponoviti u slučaju relapsa
GBS	0,4 g/kg kroz 5 dana	-
KD	2 g/kg u jednoj dozi	-
CIDP	2 g/kg kroz 2-5 dana	1 g/kg u 1-2 dana zaredom svaka 3 tjedna
MMN	2 g/kg kroz 2-5 dana	1 g/kg svaka 2 do 4 tjedna ili 2 g/kg svakih 4 do 8 tjedna

PID - primarne imunodeficiencije; SID - sekundarne imunodeficiencije; ITP - imuna trombocitopenija, GBS - Guillain Barreov sindrom, KD - Kawasakijska bolest; CIDP – kronična upalna demijelinizirajuća poliradikuloneuropatija; MMN – multifokalna motorna neuropatija

**Tablica 2. Indikacije i doziranje kod hematoloških bolesti**

Dijagnoza	Indikacije	Doziranje
ITP	- životno ugrožavajuće krvarenje - potreban nagli porast broja Trc (npr. operacija) - refraktornost na drugo liječenje - kod trudnica održavanje broja Trc $>20 \times 10^9/L$ i $>50 \times 10^9/L$ pred porod	- odrasli 1 g/kg (djeca 0,8 – 1 g/kg), a druga doza u slučaju potrebe za 24-48 sata ili 5.-ti dan u slučaju da nema odgovarajućeg porasta broja Trc
SID	- hipogamaglobulinemija uzrokovana lijekovima, monoklonskim protutijelima usmjerenim na B limfocite i plazma stanice (npr. rituximab i drugi anti-CD20, -CD19, daratumumab), transplantacija KMS, NHL, CLL, MM i druge B stanične maligne bolesti - česte i po život opasne bakterijske infekcije unatoč profilaktičkoj primjeni antibiotika kroz 6 mjeseci, razina IgG $< 4$ g/L, izostanak odgovarajućeg odgovora na cijepljenje protiv pneumokoka ili druga polisaharidna cjepiva - profilaktički u hipogamaglobulinemiji zbog B stanične aplazije nakon primjene CAR-T stanica	0,4-0,6 g/kg/mjesec
VITT	- postavljena sumnja ili potvrđena dijagnoza od strane hematologa	- 1 g/kg
NAIT	- prevencija ili liječenje neonatalne trombocitopenije ili krvarenja - prethodne trudnoće povezane s fetalnom smrću, krvarenjem, hidrocefalusom i trombocitopenijom - dokazana trombocitna aloprotutijela usmjerena na trombocitne antigene novorođenčeta	- početak terapije i doziranje ovisno o riziku; kod trudnoća niskog rizika 0,5 -1,0 g/kg/tjedan od 20 tjedna trudnoće, kod trudnoća visokog rizika 1-2 g/kg/tjedan od 12 tjedna trudnoće
HBN	- rast ukupnog bilirubina unatoč fototerapiji kod Rhesus ili ABO hemolitičke bolesti - kod trudnica s prethodnim trudnoćama s HBN-om njegova prevencija	- 0,5 g/kg kroz 4 sata
PTP	- iznenadna teška trombocitopenija 5 do 10 dana nakon transfuzije uz akutno krvarenje	1-2 g/kg kroz 2 dana

Hiperhemoliza nakon transfuzije	- liječenje akutne hiperhemolize nakon hemolize - simptomatska ili teška anemija (Hgb < 60 g/L) uz dokazanu intravaskularnu hemolizu zbog odgođene hemolitičke transfuzijske reakcije - prevencija odgođene hemolitičke transfuzijske reakcije kod pacijenata s prethodnom odgođenom transfuzijskom reakcijom i aloprotutijelima	- 2 g/kg kroz 2 dana; za prevenciju 1-2 g/kg kroz 2 dana
AIHA, uključuje Evansov sindrom	- simptomatska ili teška anemija - refraktornost na terapije kortikosteroidima - kontraindikacija na kortikosteroide - kod trudnica refraktornih na kortikosteroidnu terapiju, kod fetalne anemije - kod novorođenčadi majki s AIHA-om i dokazanom hemolizom i porastom bilirubina unatoč fototerapiji	- 1-2 g/kg u dvije ili pet podijeljenih doza
Inhibitori na čimbenike zgrušavanja	- životno ugrožavajuće krvarenje - neuspjeh postizanja odgovora na drugo liječenje - prije invazivnih zahvata	0,4 g/kg kroz 5 dana ili 1 g/kg kroz 2 dana
Stečena aplazija crvene loze povezana s infekcijom parvovirusom B19	- dokazana parvovirus B19 infekcija PCR metodom - visoka razinu virusa (>109 IU/mL)	- 1,0-1,2 g/kg u podijeljenim dozama
Virusna pneumonija nakon transplantacije KMS	- dijagnoza virusne pneumonije varicella zoster virusom, respiratornim - sincicijskim virusom, virusom parainfluence	- 1-2 g/kg u podijeljenim dozama

ITP - imuna trombocitopenija; SID - sekundarne imunodeficijencije; VITT - COVID cjepivom uzrokovana tromboza i trombocitopenija; NAIT – neonatalna aloimuna trombocitopenija; HBN – hemolitička bolest novorođenčeta; PTP – postransfuzijska purpura

## Literatura:

- Carrock Sewell WA, Kerr J, Behr-Gross ME and Peter HH, on behalf of the Kreuth Ig Working group. European consensus proposal for immunoglobulin therapies. Eur J Immunol, 2014. 44: 2207-2214.
- Jolles S, Sewell WC and Mishah SA. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. British Society for Transfusion. Clinical and Experimental Immunology, 2005. 142: 1-11.
- EMA Core summary of product characteristics for human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg) (2021) <https://www.ema.europa/en/core-summary-product-characteristics-human-normal-immunoglobulin-intravenous-administration> - Rev 6.
- Perez EE, Orange JS, Bonilla F, Chinen J, Chinn IK, Dorsey M, El-Gamal Y, Harville TO, Hossny E, Mazer B, Nelson R, Secord E, Jordan SC, Stiahm RE, Vo AA, Ballow M. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. J Allergy Clin Immunol, 2007. 139: 1-46.
- NHS England Commissioning Criteria Policy for the use of therapeutic Immunoglobulin (Ig) in England (2021). <https://www.england.nhs.uk/publication/commissioning-criteria-policy-for-the-use-of-therapeutic-immunoglobulin-ig-in-england-2021/>
- EMA Clinical investigation of human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg) (2021) <https://www.ema.europa/en/clinical-investigation-human-normal-immunoglobulin-intravenous-administration> - Rev 4

## VEXAS sindrom: imunološko-hematološka bolest

Dora Dragčević<sup>1</sup>, Inga Mandac Smoljanović<sup>1,2</sup>

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

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

### Uvod i genetska pozadina

VEXAS sindrom je genetski sindrom koji uzrokuje različite imunološke i hematološke poremećaje, a osnovni patogenetski čimbenik je stečena mutacija UBA1 gena (eng. ubiquitin-activating enzyme E1) smještenog na X kromosomu<sup>1,2</sup>.

Sindrom je prvi puta opisan u prosincu 2020. godine u studiji Becka i suradnika s Nacionalnog instituta za istraživanje humanog genoma (eng. National Human Genome Research Institute (NIH), Bethesda) analizom genskog materijala 2560 pacijenata praćenih zbog vrućice nepoznatog uzroka, autoimunih zbivanja refraktornih na terapiju i onih sa neklasificiranim tegobama, te je kod ukupno 25 pacijenata (0,9%) detektirana mutacija UBA1 gena<sup>3</sup>. UBA1 gen kodira E1 protein (eng. „E1 ubiquitin activating protein“) važan za adekvatan rad ubikvitina, tj. malih proteinskih molekula zaduženih za sintezu i destrukciju staničnih proteina te samim time za pravilno funkcioniranje stanice<sup>4,5</sup>. U francuskoj multicentričnoj studiji koja je uključila 116 pacijenata sa VEXAS sindromom verificirane su različite skupine mutacija UBA1 gena, a to su pogrešne (engl. missense) mutacije (p.M41T u 45% slučajeva, p.M41V u 30% slučajeva, p.M41L u 18% slučajeva) i mutacije izrezivanja (eng. splice) mutacije u 7% slučajeva<sup>6,7</sup>. Mutacija zahvaća prvenstveno stanice mijeloidne loze i može se očitovati citopenijama, uz uvijek prisutne reumatološko-imunološke poremećaje<sup>8</sup>. Do sada je pojavnost bolesti opisana gotovo isključivo kod starijih muškaraca, dok je kod žena opisana u slučaju monosomije X kromosoma<sup>3,4,6</sup>. Obzirom da se radi o mutaciji gena koji kodira enzim, očekivan je ovakav recesivan obrazac pojavnosti bolesti.

### Klinička slika

VEXAS je akronim koji opisuje za sindrom specifične promjene, uključujući: V – vakuole prisutne u stanicama mijeloidne i eritroidne loze, E – E1 ubikvitin aktivirajući enzim kodiran UBA1 genom, X – zahvaćenost X kromosoma, A – refraktorni autoimuni inflamatorni poremećaji, i S – somatska mutacija stečena tijekom života, a nije naslijeđena<sup>6,9-11</sup>. Kod pacijenata sa ovim poremećajem u kliničkoj slici do-

miniraju autoimuni poremećaji koji se mogu prezentirati kao bolan kožni osip (neutrofilna infiltracija i vakulitis srednje velikih krvnih žila), artritis i hondritis, promjene na plućima (neutrofilna infiltracija) praćene suhim kašljem i dispnejom, i vaskulitis<sup>9,11</sup>. Hondritis tipično obostrano zahvaća hrskavice uha i nosa, koje su otečene i bolne na dodir<sup>2</sup>. Multicentrična studija provedena u Francuskoj od studenog 2020 do svibnja 2021 je uključila 116 pacijenata prezentiranih u nacionalni registar, s glavnim ciljem opisa kliničkih i laboratorijskih karakteristika te prognoze pacijenata sa VEXAS sindromom<sup>6</sup>. Pacijenti su se najčešće prezentirali autoimunim poremećajima (kožne promjene (83%), vrućica (64%), gubitak na tjelesnoj masi (62%), plućni infiltrati/pneumonitis (50%), očni simptomi (39%), hondritis koji se opetovano javljao unatoč terapiji (36%), venske tromboze (35%), limfadenopatija (34%) i artralgijska (27%)<sup>6</sup>. Uz ovaj sindrom, u velikom broju slučajeva javljaju se i druge dijagnoze poput nodoznog poliartritisisa, Sweet sindroma, vaskulitisa, i drugih autoimunih poremećaja<sup>1,2,9-11</sup>. Skupina talijanskih autora analizirala je 147 muških pacijenata sa dijagnozom ANCA (eng. antineutrophil cytoplasmic antibodies) negativnog vaskulitisa rezistentnog na liječenje u periodu od 2013. godine do 2023. godine, a konačna dijagnoza VEXAS sindroma je postavljena u 3/147 pacijenata koji su zadovoljavali i kriterije za dijagnozu mijelodisplastičnog sindroma prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji<sup>12</sup>.

### Hematološke specifičnosti

Analiza francuske grupe pacijenata pokazala je hematološke poremećaje u 50% slučajeva (58/116), a kod svih pacijenata sa dokazanom hematološkom bolesti dijagnosticiran je mijelodisplastični sindrom (MDS), dok je u 20% pacijenata (12/58) uz dijagnozu MDS-a postavljena i dijagnoza monoklonske gamapatije nejasnog značenja (MGUS)<sup>6</sup>.

U koštanoj srži se uz karakteristične vakuole u prekusorskim stanicama eritroidne i mijeloidne loze, nalaze displastične promjene različitog gradusa i hipercelularnost koštane srži što su i dva obilježja koja se tipično opisuju u MDS-u.<sup>8,9</sup> Vakuole

su prisutne isključivo u prekusorskim stanicama eritroidne i mijeloidne loze, te se ne mogu identificirati u zrelim stanicama<sup>13</sup>. Iako se vakuole prisutne u ranim razvojnim stadijima hematopoetskih stanica smatraju karakterističnim obilježjem sindroma, one se mogu javiti i u drugim stanjima poput mijelodisplastičnog sindroma, deficijencije bakra i transkobalamina II, i akutne mijeloidne leukemije<sup>13</sup>. Grupa francuskih znanstvenika je pokušala identificirati razliku vakuola prisutnih u VEXAS sindromu i drugim hematološkim poremećajima. U svojoj studiji genetskoj su analizi podvrgnuli muške pacijente u razdoblju između 2007.-2021. godine koji su zadovoljavali osnovne fenotipske karakteristike VEXAS sindroma (vrućina nepoznata podrijetla i neobjašnjeni znakovi upale, jedno ili više upalnih zbivanja karakterističnog za VEXAS sindrom, jedna ili više kronična citopenija)<sup>13</sup>. Pretraživanjem je detektirano 11 pacijenata koji su zadovoljavali uključne kriterije, kod 9 pacijenata je postojao odgovarajući uzorak koštane srži i mogućnost analize UBA1 mutacije, a 6 od analiziranih 9 pacijenata je isti gen imalo mutirano<sup>13</sup>. Usporedbom citoloških karakteristika stanica koštane srži 6 pacijenata sa dokazanim VEXAS sindromom i 21 pacijenta u kontrolnoj skupini (18 pacijenata sa mijelodisplastičnim sindrom: MDS-EB1, MDS-EB2, MDS-RS-SLD, MDS-RS-MLD i 3 pacijenta sa divljim tipom UBA1 gena i fenotipskim karakteristikama VEXAS sindroma) utvrđeno je da ukoliko u više ili jednako 10% neutrofilnih prekursora postoji više od 1 vakuole, dijagnoza VEXAS sindroma se može postaviti sa 100% specifičnosti i 100% osjetljivosti<sup>13</sup>. S druge strane, kod ovih pacijenata se u velikom broju slučajeva mogu pronaći i drugi poremećaji hematoloških parametara, od kojih su često prisutni anemija (makrocitna), trombocitopenija, koagulopatija s formiranjem tromba prvenstveno u venskom krvožilnom sustavu<sup>4,8,14</sup>. Već je u inicijalnoj Beckovoj studiji VEXAS sindroma opisan povećani rizik razvoja tromboembolijskog incidenta, koji je zabilježen u 44% pacijenata (11/25)<sup>3</sup>. I druge studije i serije prikaza slučajeva pokazale su visoku incidenciju neprovociranih venskih tromboembolijskih incidenata kod pacijenata sa VEXAS sindromom, i to: 35.3% pacijenata (41/116) u francuskoj skupini<sup>15</sup> i 56.25% (9/16) pacijenata u američkoj skupini<sup>16</sup>. Prema dostupnim podacima procjenjuje se da je učestalost venskih tromboembolijskih incidenata u pacijenata sa VEXAS sindromom oko 34.6% uz dostupne opise tipičnih lokalizacija (duboka venska tromboza potkoljenice kod 94% pacijenata (33/35) i plućna embolija kod 23% pacijenata

(8/35))<sup>17</sup>. Sklonost tromboembolijskim incidentima objašnjava se kao posljedica mutacije UBA1 gena, zbog čega se sintetizira defektan E1 protein, dolazi do neadekvatne razgradnje staničnih proteina u mijeloidnim i eritroidnim prekusorskim stanicama, aktivacije unutarstaničnih proupalnih puteva, i u konačnici stvaranja stanja jake i konstantne upale u ljudskom organizmu<sup>17</sup>. Konačno, povišene razine proupalnih citokina (npr. TNF alfa, IL-6, IL-8, IFN gama) dovode do poremećaja koagulacijske homeostaze endotela, trombocita i plazme, što uzrokuje lakši nastanak tromboembolijskog incidenta<sup>17</sup>.

### Dijagnoza, procjena rizika, i mogućnosti terapije

Kada se temeljem kliničke slike postavi sumnja na ovaj sindrom dijagnoza se postavlja ciljanim genetskim testiranjem na mutaciju UBA1 gena smještenog na X kromosomu. Obzirom da u današnje vrijeme još nemamo mogućnosti genske terapije, liječenje je ograničeno na liječenje prisutnog poremećaja. Kao što je i ranije u tekstu spomenuto, autoimune komplikacije koje se javljaju kod pacijenata sa UBA1 mutacijom (VEXAS sindromom) u velikom broju slučajeva su rezistentne na više linija protuupalne terapije (kortikosteroidna terapija, nesteroidni protuupalni lijekovi), uz opisane pojedinačne slučajeve relativne kontrole bolesti u visoke doze kortikosteroidnih lijekova. Velik broj ovih pacijenata zapravo ima progresivne komplikacije konstantno aktivnog autoimunog procesa u organizmu, koji brže ili sporije dovodi do smanjenja kvalitete života i smrtnog ishoda. Statističke analize na francuskoj grupi pacijenata (eng. unsupervised analyses) identificirale su 3 skupine bolesnika koji imaju različita petogodišnja preživljena sukladno procijenjenom riziku bolesti, a to su: skupina 1 (blaga do umjerno teška bolest, 47% pacijenata) sa 5-godišnjim preživljenjem 84.2%, skupina 2 (pacijenti sa MDS-om, 16% pacijenata) sa 5-godišnjim preživljenjem 50.5% i skupina 3 (dominantno konstitucijski i autoimuni upalni simptomi uz visoke vrijednosti C-reaktivnog proteina, 37% pacijenata) sa 5-godišnjim preživljenjem 89.6%<sup>6</sup>. Unicentrična analiza postojećih podataka o pacijentima provedena u Nizozemskoj, identificirala je ukupno 6 pacijenata čije fenotipske karakteristike su odgovarale opisu VEXAS sindroma<sup>9</sup>. Analiza genetskog materijala ispitanika pokazala je da je kod svih 6 pacijenata prisutna mutacija UBA1 gena, dok je kod 50% (3/6) pacijenata utvrđena i dodatna mutacija gena za enzima DNA (citozin-5)-metiltransferaza 3A (DNMT3A). Ukupno su 2 od

3 pacijenta sa dodatnom mutacijom, refrakternosti na više linija protuupalne terapije, ali i bez jasno zadovoljenih kriterija za MDS, liječeni hipometilirajućim agensom (5-azacitidin, 75mg/m<sup>2</sup> /7 dana svaka 4 tjedna) uz postizanje molekularne remisije (nedetektabilnost UBA1 i DNMT3A mutacije) koja se održala i po završetku liječenja<sup>9</sup>. Uz dobar hematopoetski odgovor, zabilježen je i gubitak drugih sistemskih simptoma povezanih sa VEXAS sindromom<sup>9</sup>. Francuska skupina također je analizirala efikasnost liječenja 5-azacitidinom kod 11 pacijenata sa VEXAS sindromom i zadovoljenim kriterijima za MDS te je kod 5 pacijenata (46%) opisala zadovoljavajući odgovor na primijenjenu terapiju<sup>18</sup>. Francuska serija slučajeva iz dva centra prikazala je 6 pacijenata kod kojih se zbog teških i za život opasnih autoimunih simptoma (nodozni poliartritis, Sweet sindrom, neutrofilni dermatitis) rezistentnih na više linija protuupalne i biološke terapije, u sklopu liječenja primijenila alogenična transplantacija koštane srži<sup>19</sup>. Tijekom praćenja nakon alogenične transplantacije koštane srži 50% pacijenata (3/6) je u kompletnoj remisiji duže od 32 mjeseca, 33% pacijenata (2/6) je bilo u remisiji tijekom kraćeg perioda praćenja od 3 do 5 mjeseci, a 1 pacijent je preminuo zbog komplikacija samog postupka<sup>19</sup>.

## Zaključak

VEXAS sindrom je relativno novi hematološko-imunološki entitet koji se ispoljava gotovo isključivo u muškaraca, a u čijoj podlozi je stečena mutacija UBA1 gena na X kromosomu. Autoimune manifestacije mogu zahvatiti većinu organa u tijelu, ali do sada su najčešće opisani opći simptomi kronične upale (vrućica, gubitak tjelesne mase), kožne promjene, promjene na plućima, artritis i hondritis, vaskulitis, itd., a autoimuni poremećaji su rezistentni na liječenje nesteroidnim protuupalnim lijekovima i biološkim lijekovima. Hematološke promjene u perifernoj krvi (citopenije) potaknule su analizu koštane srži pacijenata sa opisanim promjenama, te su u gotovo 50% slučajeva opisane promjene koje zadovoljavaju dijagnostičke kriterije za MDS. Ipak, citološka analiza stanica koštane srži otkriva i za bolest indikativne promjene, a to su višebrojne vakuole u prekusorskim stanicama mijeloidne i eritroidne loze. Zbog malog broja do sada opisanih slučajeva, standard liječenja ne postoji. Obzirom da genska terapija, koja bi ciljala sam uzrok bolesti, nije dostupna, oslonac je specifično liječenje kliničkih manifestacija. Prva linija liječenja kod većine pacijenata su protuupalni lijekovi, jer se inicijalno bolest i prezen-

tira autoimunim simptomima. U slučaju verificiranog MDS-a kao dobra opcija za liječenje pokazao se 5-azacitidin, koji u otprilike 50% pacijenata omogućava postizanje kompletne remisije. Opisano je i nekoliko slučajeva alogenične transplantacije koštane srži zbog izuzetno teške autoimune simptomatologije, nakon čega su pacijenti u duljem periodu praćenja postigli kompletnu remisiju. Iz svega navedenog, može se zaključiti da je patološki klon mijeloidnih stanica odgovoran za autoimune simptome i kliničku sliku VEXAS sindroma.

## Literatura:

1. Grayson PC, Patel BA, Young NS. VEXAS syndrome. *Blood*. 2021;137(26):3591-3594. doi:10.1182/blood.2021011455
2. Patel BA, Ferrada MA, Grayson PC, Beck DB. VEXAS syndrome: An inflammatory and hematologic disease. *Semin Hematol*. 2021;58(4):201-203. doi:10.1053/j.seminhematol.2021.10.005
3. Beck DB, Ferrada MA, Sikora KA, et al. Somatic Mutations in UBA1 and Severe Adult-Onset Autoinflammatory Disease. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2628. doi:10.1056/NEJMOA2026834
4. Templé M, Kosmider O. VEXAS Syndrome: A Novelty in MDS Landscape. *Diagnostics*. 2022;12(7). doi:10.3390/DIAGNOSTICS12071590
5. Schulman BA, Wade Harper J. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):319. doi:10.1038/NRM2673
6. Georgin-Lavialle S, Terrier B, Guedon AF, et al. Further characterization of clinical and laboratory features in VEXAS syndrome: large-scale analysis of a multicentre case series of 116 French patients. *Br J Dermatol*. 2022;186(3):564-574. doi:10.1111/BJD.20805
7. Juraj J. Mutacije i bolesti Anić, Petra. Published online 2022. Accessed October 7, 2022. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:541423>
8. Patel N, Dulau-Florea A, Calvo KR. Characteristic bone marrow findings in patients with UBA1 somatic mutations and VEXAS syndrome. *Semin Hematol*. 2021;58(4):204-211. doi:10.1053/J.SEMINHEMATOL.2021.10.007
9. Raaijmakers MHGP, Hermans M, Aalbers A, et al. Azacytidine Treatment for VEXAS Syndrome. *Hemasphere*. 2021;5(12):e661. doi:10.1097/HS9.0000000000000661
10. Beck DB, Ferrada MA, Sikora KA, et al. Somatic Mutations in UBA1 and Severe Adult-Onset Autoinflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(27):2628-2638. doi:10.1056/nejmoa2026834
11. Afsahi V, Christensen RE, Alam M. VEXAS syndrome in dermatology. *Arch Dermatol Res*. Published online 2022. doi:10.1007/S00403-022-02340-4
12. Muratore F, Marvisi C, Castrignanò P, et al. VEXAS Syndrome: A Case Series From a Single-Center Cohort of Italian Patients With Vasculitis. *Arthritis Rheumatol*. 2022;74(4):665-670. doi:10.1002/ART.41992

13. Lacombe V, Prevost M, Bouvier A, et al. Vacuoles in neutrophil precursors in VEXAS syndrome: diagnostic performances and threshold. *Br J Haematol.* 2021;195(2):286-289. doi:10.1111/BJH.17679
14. VEXAS Syndrome | NIAMS. Accessed October 7, 2022. <https://www.niams.nih.gov/labs/grayson-lab/vexas>
15. Geogin-Lavialle S, Terrier B, Guedon AF, et al. Further characterization of clinical and laboratory features in VEXAS syndrome: large-scale analysis of a multicentre case series of 116 French patients. *Br J Dermatol.* 2022;186(3):564-574. doi:10.1111/BJD.20805
16. Obiorah IE, Patel BA, Groarke EM, et al. Benign and malignant hematologic manifestations in patients with VEXAS syndrome due to somatic mutations in UBA1. *Blood Adv.* 2021;5(16):3203-3215. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2021004976
17. Oo TM, Koay JTJ, Lee SF, Lee SMS, Lim XR, Fan BE. Thrombosis in VEXAS syndrome. *J Thromb Thrombolysis.* 2022;53(4):965. doi:10.1007/S11239-021-02608-Y
18. Comont T, Heiblig M, Rivière E, et al. Azacitidine for patients with Vacuoles, E1 Enzyme, X-linked, Autoinflammatory, Somatic syndrome (VEXAS) and myelodysplastic syndrome: data from the French VEXAS registry. *Br J Haematol.* 2022;196(4):969-974. doi:10.1111/BJH.17893
19. Diarra A, Duployez N, Fournier E, et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with VEXAS syndrome: a 2-center experience. *Blood Adv.* 2022;6(3):998-1003. doi:10.1182/BLOODADVANCES.2021004749

## Aktivnosti Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema u 2022. godini

### Dražen Pulanić

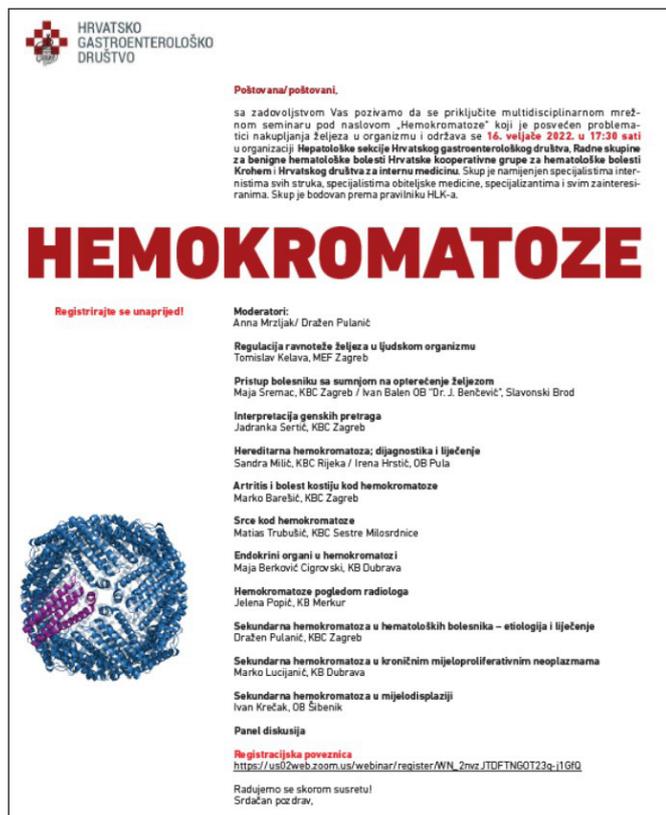
Odjel za hemostazu i trombozu te benigne bolesti krvotvornog sustava, Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC-a Zagreb  
Voditelj Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema

Ove godine je Radna skupina za benigne hematološke bolesti Krohema ponovno bila jako aktivna. Za izdvojiti su dva sastanka i jedna publicirana knjiga – fakultetski priručnik.

### Webinar i fakultetski priručnik „Hemokromatoze“

Dana 16. veljače 2022. održan je odlično posjećen multidisciplinarni mrežni sastanak (webinar) pod naslovom „Hemokromatoze“ u zajedničkoj organizaciji Hepatološke sekcije Hrvatskog gastroenterološkog društva, Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema i Hrvatskog društva za internu medicinu HLZ-a, u kojem su aktivno sudjelovali stručnjaci različitih specijalnosti (Slika 1.).

**Slika 1. Zajednički virtualni sastanak 16.2.2022. s Hepatološkom sekcijom Hrvatskog gastroenterološkog društva i Hrvatskim društvom za internu medicinu HLZ-a o hemokromatozi.**



HRVATSKO GASTROENTEROLOŠKO DRUŠTVO

**POŠTOVANA/POŠTOVANI,**

sa zadovoljstvom Vas pozivamo da se priključite multidisciplinarnom mrežnom seminaru pod naslovom „Hemokromatoze“ koji je posvećen problematiki nakupljanja željeza u organizmu i održava se **16. veljače 2022. u 17:30 sati** u organizaciji Hepatološke sekcije Hrvatskog gastroenterološkog društva, Radne skupine za benigne hematološke bolesti Hrvatske kooperativne grupe za hematološke bolesti Krohema i Hrvatskog društva za internu medicinu. Skup je namijenjen specijalistima internistima svih struka, specijalistima obiteljske medicine, specijalizantima i svim zainteresiranim. Skup je bodovan prema pravilniku HLK-a.

# HEMOKROMATOZE

**Registrirajte se unaprijed!**

**Moderatori:**  
Anna Mrzljak / Dražen Pulanić

**Regulacija ravnoteže željeza u ljudskom organizmu**  
Tomislav Kelava, MEF Zagreb

**Pristup bolesniku sa sumnjom na opterećenje željezom**  
Maja Sremac, KBC Zagreb / Ivan Balen OB "Dr. J. Benčević", Slavonski Brod

**Interpretacija genskih pretraga**  
Jadranka Sertić, KBC Zagreb

**Hereditarna hemokromatoza; dijagnostika i liječenje**  
Sandra Milić, KBC Rijeka / Irena Hrštic, OB Pula

**Artritis i bolest kostiju kod hemokromatoze**  
Marko Barešić, KBC Zagreb

**Srce kod hemokromatoze**  
Matias Trububić, KBC Sestre Milosrdnice

**Endokrini organi u hemokromatozi**  
Maja Berković Cigrovski, KB Dubrava

**Hemokromatoze pogledom radiologa**  
Jelena Popić, KB Merkur

**Sekundarna hemokromatoza u hematoloških bolesnika – etiologija i liječenje**  
Dražen Pulanić, KBC Zagreb

**Sekundarna hemokromatoza u kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama**  
Marko Lucijanić, KB Dubrava

**Sekundarna hemokromatoza u mijelodisplaziji**  
Ivan Krcak, OB Šibenik

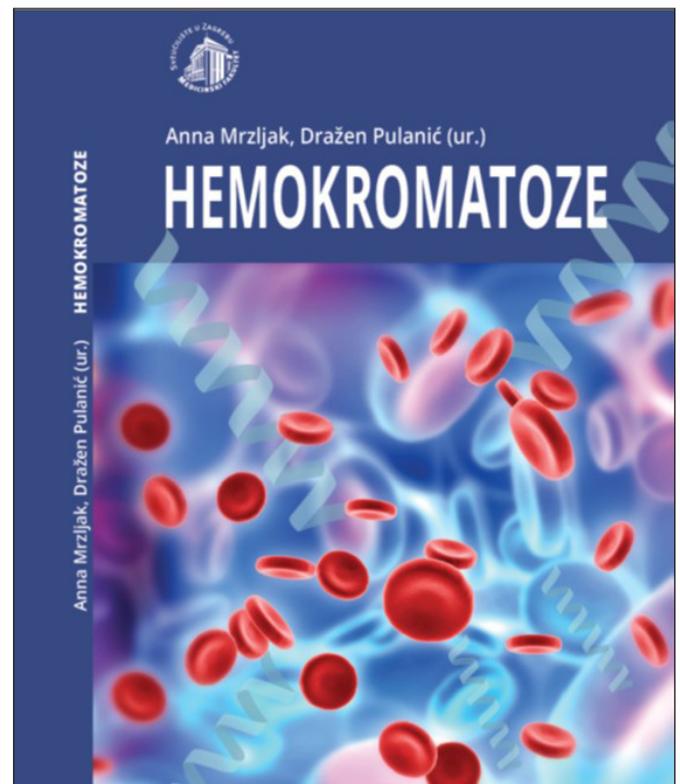
**Panel diskusija**

**Registracijska poveznica**  
[https://us02web.zoom.us/join/register/WN\\_2mzJTDFN60T23q-11Gf0](https://us02web.zoom.us/join/register/WN_2mzJTDFN60T23q-11Gf0)

Radujemo se skorom susretu!  
Srdačan pozdrav,

Hemokromatoza je bolest prekomjernog nakupljanja željeza u organizmu koja može biti hereditarna (nasljedna) i stečena (sekundarna), i koja ima polimorfnu kliničku sliku. S tom bolešću se susreću najviše gastroenterolozi-hepatolozi (hereditarna hemokromatoza) i hematolozi (sekundarna hemokromatoza), ali i specijalisti drugih internističkih struka (reumatolozi, endokrinolozi, kardiolozi...), liječnici obiteljske medicine, radiolozi, te laboratorijski i drugi stručnjaci. Stoga je taj održani webinar bio doista multidisciplinarnan, s preko 220 sudionika koji su ga pratili *on-line*. Tako veliki interes za jedan posve akademski nesponzorirani sastanak potaknuo nas je na izradu knjige - zbornika radova svih predavača s navedenog sastanka. Knjigu su uredili organizatori webinaru prof. dr. Anna Mrzljak i prof. dr. Dražen Pulanić, svi predavači su napisali tekstove vezane uz teme predavanja, a naposljetku je knjiga kategorizirana kao službeni fakultetski priručnik Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Slika 2.).

**Slika 2. Naslovnica knjige – fakultetskog priručnika „Hemokromatoze“.**



U knjizi je prof. dr. Tomislav Kelava napisao o regulaciji ravnoteže željeza u ljudskom organizmu, dr. Ivan Balen, dr. sc. Maja Sremac i prof. dr. Anna Mrzljak o pristupu bolesniku sa sumnjom na opterećenje željezom, prof. dr. Jadranka Sertić sa suradnicama napisala je poglavlje o interpretaciji genetskih pretraga, a prof. dr. Sandra Milić, dr. Tanja Tatalović i doc. dr. Irena Hrستیć poglavlje o hereditarnoj hemokromatozi. Primarijus dr. Marko Barešić napisao je tekst o artitisu i bolesti kostiju u hereditarnoj hemokromatozi, dr. Tanja Režić i prof. dr. Maja Cigrovski Berković o endokrinim organima u hereditarnoj hemokromatozi, prof. dr. Matias Trbušić i dr. Petra Radić o kardiomiopatiji uzrokovanoj hemokromatozom, a prof. dr. Jelena Popić i dr. Thomas Ferenc o hemokromatozi pogledom radiologa. Hematološki dio su napisali prof. dr. Pulanić, o etiologiji i liječenju sekundarne hemokromatoze u hematoloških bolesnika, dr. sc. Marko Lucijanić o sekundarnoj hemokromatozi u kroničnim mijeloproliferativnim neoplazmama i dr. sc. Ivan Krečak o sekundarnoj hemokromatozi u bolesnika s MDS i transformaci-

jom u sekundarnu Ph-pozitivnu ALL.

Knjiga je imala svečano predstavljanje na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 10. listopada 2022. i nadamo se da će biti korisna nastavna literatura u više dodiplomskih i poslijediplomskih predmeta.

### Drugi sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema u Mošćeničkoj Dragi

U Mošćeničkoj Dragi (blizu Opatije) je 16. i 17. rujna 2022. održan Drugi sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema. Sastanak je ponovno održan u hibridnoj formi; održao se uživo, a sva predavanja su bila istovremeno dostupna i virtualno preko *zoom* platforme svim registriranim sudionicima, što je omogućilo većem broju kolega virtualno praćenje sastanka s mogućim *on-line* raspravljanjem. Nekoliko predavača je također svoja predavanja održalo *on-line* iz udaljenih centara.

**Slika 3. Drugi sastanak Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema u Mošćeničkoj Dragi.**



Sastanak je bio podijeljen tematski u dvije cjeline: petak 16. rujna bio je općenito posvećen bolestima trombocita a subota 17. rujna anemijama i drugim nemaliglnim hematološkim bolestima. Na sastanku je sudjelovalo ukupno 67 sudionika, dijelom virtu-

alno *on-line* a dijelom uživo (Slika 4.). Predavači su bili hematolozi i drugi stručnjaci iz velikog broja hrvatskih hematoloških centara, a sudjelovala je po prvi put i inozemna predavačica, dr. sc. Erika Tarasco iz Švicarske.

**Slika 4. Sudionici Drugog sastanka Radne skupine za benigne hematološke bolesti Krohema u Mošćeničkoj Dragi.**



U petak 16. rujna nakon otvaranja i uvodnih riječi prof. dr. Dražen Pulanić (KBC Zagreb) predstavio je novoformiranu bazu benignih hematoloških bolesti Krohema (ITP, TTP, PNH, AA, Gaucherova bolest). Dr. sc. Erika Tarasco (Švicarska) prikazala je međunarodni registar za hereditarnu TTP, pozvavši sudionike na daljnju suradnju. Nakon toga je slijedio dio o imunskoj trombocitopeniji (ITP) i drugim bolestima trombocita. Prim. dr. Goran Rinčić iz KBC Sestre Milosrdnice predavao je o odabiru TPO agonista u liječenju ITP-a, dr. sc. Davor Galušić iz KBC Split prikazao je rezultate KBC Split u liječenju ITP-a TPO agonistima. Dr. Ena Ranković iz KBC Zagreb prikazala je preliminarne rezultate svog istraživanja o glikanima kao biomarkerima ITP-a. Dr. Martina Morić Perić (OB Zadar) prikazala je slučaj izazovnog liječenja bolesnika s refraktornim kroničnim ITP-om, prim. dr. sc. Marko Martinović (KB Merkur) uporabu TPO agonista u trombocitopeniji nakon autologne transplantacije matičnih krvotvornih stanica, dr. Dina Mokwa (OB Varaždin) prikaz bolesnice s Glanzmannovom trombastenijom i GI krvarenjem, a dr. Amina Fazlić Džankić (OB Sisak) prikaz bolesnice s Fisher-Evansovim sindromom liječene TPO agonistima. Nakon stanke slijedio je sljedeći dio o trombotičnoj trombocitopeničnoj purpuri (TTP) i drugim trombotskim mikroangiopatijama (TMA). Dr. sc. Desiree Coen Herak (KBC Zagreb) prikazala je iskustva KBC Zagreb u određivanju aktivnosti ADAMTS13 s izazovnim naslovom o mogućem individualizira-

nom pristupu dijagnostici i liječenju TTP-a. Prof. dr. Dražen Pulanić (KBC Zagreb) prikazao je prvo iskustvo u Hrvatskoj u liječenju TTP-a kaplacizumabom. Dr. Iva Ivanko (KBC Sestre Milosrdnice) prikazala je kompleksnu bolesnicu s TMA u trudnoći i puerperiju potaknuvši dinamičnu raspravu, a dr. sc. Željko Prka (KB Dubrava) prikazao je bolesnika sa sekundarnim aHUS provociranim infekcijom.

Subotu 17.9. započeo je dr. sc. Marijo Vodanović (KBC Zagreb) sa zanimljivim predavanjem o utjecaju cinka i bakra na krvnu sliku. Nakon toga je slijedila dr. sc. Inga Mandac Smoljanović (KB Merkur) s izlaganjem o hemoglobinopatijama, a dr. Danijel Turudić (KBC Zagreb) prezentirao je rezultate svog znanstvenog rada o razlikovanju  $\beta$ -talasemije i sideropenične anemije u dječjoj dobi uporabom metoda strojnog učenja. Nakon toga je prim. dr. sc. Mirta Mikulić (KBC Zagreb) prikazala iskustva KBC Zagreb s uporabom eltrombopaga u liječenju aplastične anemije u odraslih, a prof. dr. Ernest Bilić (KBC Zagreb) je održao zanimljivo predavanje o aplastičnim anemijama u djece. Dr. Marino Narančić (OB Zadar) prikazao je slučaj složene bolesnice s relapsnom AIHA, antifosfolipidnim sindromom i KLL-om. Doc. dr. Zdravko Mitrović (KB Dubrava) prikazao je slučaj bolesnice s izuzetno rijetkim entitetom – aceruloplazminemijom. Slijedio je dio o Rendu-Osler-Weberovom sindromu, o čemu su predavali prof. dr. Ana Boban (KBC Zagreb), dr. Marija Ivić (KB Dubrava) i dr. sc. Ivan Krečak (OB Šibenik). Zatim je prim. dr. sc. Mirela Raos (KBC

Zagreb) predavala o indikacijama za primjenu intravenskih gama globulina, a dr. sc. Lana Desnica (KBC Zagreb) o iskustvima KBC Zagreb u primjeni imunoglobulina protiv CMV-a nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Zadnji dio sastanka bio je posvećen Gaucherovoj bolesti, o čemu su govorili prof. dr. Nadira Duraković (KBC Zagreb) (Gaucherova bolest i komplikacije trudnoće), prof. dr. Toni Valković (KBC Rijeka) (Gaucherova bolest i zloćudne novotvorine) i doc. dr. Vlatka Periša (KBC Osijek) (prikaz bolesnice).

Sastanak je bodovan od Hrvatske liječničke komore, te je predavačima (aktivnim sudionicima) do-

dijeljeno 10 bodova, a pasivnim sudionicima (slušačima) 8 bodova.

Nakon svakog predavanja slijedile su zanimljive rasprave, u koju su se uključivali računalima i virtualno prisutni kolege. Neka od navedenih predavanja rezultirala su s publikacijama u ovom broju Biltena Krohema. Sastanak je održan u ugodnom i vedrom raspoloženju, potaknuvši brojne nove inicijative. Svakako je potrebno istaknuti i zahvaliti se brojnim sponzorima koji su poduprli održavanje ovog sastanka, za koji se nadamo da će se održati i u sljedećim godinama.

## Anketa studenata na Integriranom preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci o atraktivnosti specijalizacije iz hematologije

Lucija Marčelić<sup>1</sup>, Frane Valković<sup>1</sup>, Toni Valković<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Opća bolnica Zadar (liječnik sekundarac)

<sup>2</sup> Zavod za hematologiju Klinike za internu medicinu KBC Rijeka, Medicinski fakultet i Fakultet zdravstvenih studija Sveučilišta u Rijeci

### Uvod

Specijalizacija i uža specijalizacija iz hematologije u Kliničkom bolničkom centru Rijeka posljednjih 10-ak godina nije bila posebno atraktivna, što je razvidno iz malog broja pristupnika i zainteresiranih liječnika koji su se javljali na raspisane natječaje. To predstavlja svojevrsni problem obzirom da može dovesti do usporenja obnavljanja kadra, ali i nemogućnosti izbora kvalitetnijih kandidata prilikom natječaja za specijalizaciju. Zbog svega toga zadnje tri godine provedene su određene akcije u izvođenju nastave iz hematologije na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te samom Zavodu za hematologiju Klinike za internu medicinu KBC Rijeka s ciljem povećavanja broja kvalitetnih pristupnika na raspisane natječaje. Te akcije obuhvatile su rekonstrukciju i preuređenje stacionarnog dijela Zavoda s najvažnijim ciljem poboljšavanja uvjeta boravka naših pacijenata, ali i ugodnije atmosfere za zaposlenike i studente medicine. Nadalje, povećan je broj hematologa na Zavodu kako bi se osim za rad s bolesnicima, našlo više vremena i za rad sa studentima medicine i mladim liječnicima koji se nađu na Zavodu. Konačno, učinjeni su koraci u poboljšavanju nastave što je obuhvatilo djelomičnu izmjenu tema seminara iz hematologije na Integriranom dodiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju medicine s ciljem osuvremenjivanja nastave iz hematologije, povećanja broja suradnika (i onih naslovnih) te nastavnika koji su hematolozi ili budući hematolozi, a koji se trude nastavu uči-

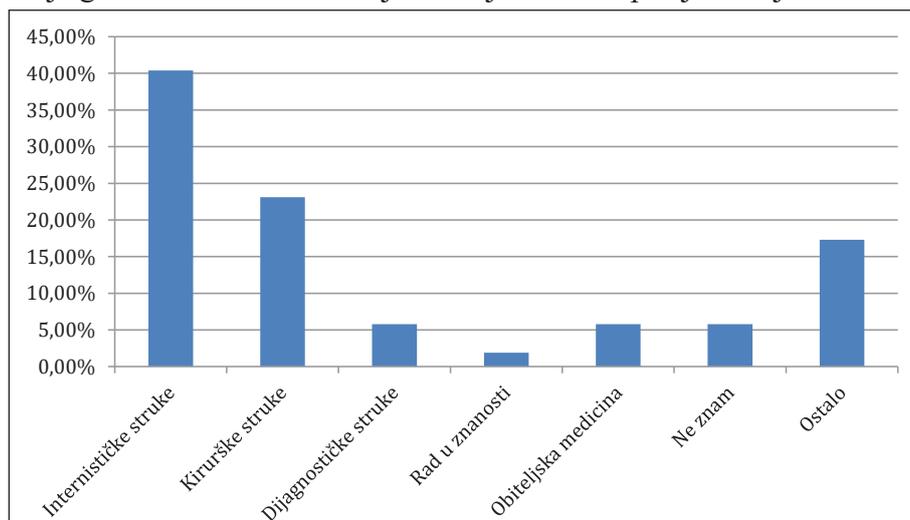
niti što atraktivnijom. Uvedeni su izborni kolegiji za studente medicine te polaznike Doktorske škole. Konačno, pokušava se što više studenata privući na pisanje diplomskog rada iz područja hematologije te pisanja znanstvenih i stručnih radova iz područja hematologije koji uključuju i studente. Slične mjere već su ranije opisivane u svrhu privlačenja studenata k specijalizaciji iz hematologije (1). Kako bismo što točnije ocijenili mišljenje studenata završnih godina vezano za atraktivnost i zainteresiranost za specijalizaciju iz hematologiju učinjena je ova kratka i jednostavna anketa.

### Ispitanici i metode

U ovoj anketi sudjelovala su 52 studenta medicine s Integriranog dodiplomskog i diplomskog sveučilišnog studija medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. U istraživanju je sudjelovalo 35 (67,3%) studentica i 17 (32,7%) studenata s 5. (16 tj. 31%) i 6. (36 tj. 69 %) godine studija. 31 (59,6%) anketiranih studenata imalo je ukupni prosjek ocjena tijekom studija u rasponu od 4,0-4,5, 16 (30,8%) studenata imalo je ukupni prosjek 4,5 ili više, a 5 (9,6%) studenata imalo je ukupni prosjek u rasponu od 3,6-4,0. Sama anketa bila je dobrovoljna, elektronički sprovedena i anonimna. Sprovedena je u lipnju i srpnju 2022. godine, nakon završetka nastave tekuće akademske godine 2021/22. Rezultati ankete su prikupljeni, obrađeni te prikazani koristeći deskriptivnu statistiku.

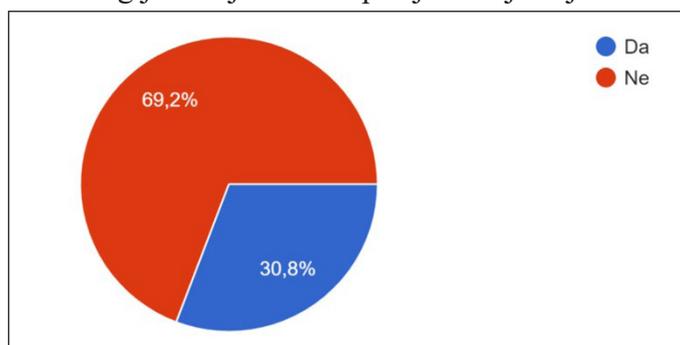
## Rezultati

### Pitanje br.1 Iz koje grane medicine biste najviše željeli dobiti specijalizaciju?



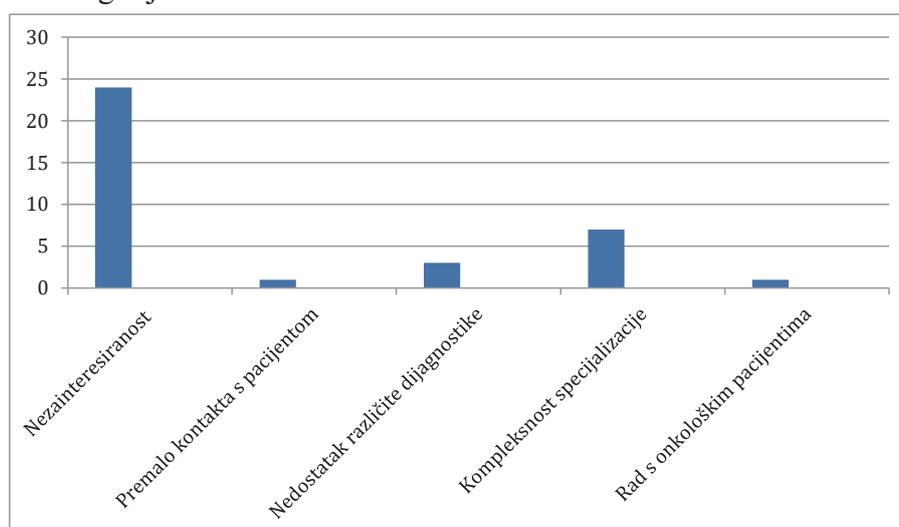
**Slika br. 1.** 40,4% (21) studenata željelo bi dobiti specijalizaciju iz internističkih struka, 23,1% (12) iz kirurških struka, 5,8% (3) iz obiteljske medicine i dijagnostičkih struka, 1,9% (1) htjelo bi se baviti radom u znanosti, 17,3% (9) ostalim granama medicine, a 5,8% (3) još ne zna odgovor.

### Pitanje br. 2. Vidite li hematologiju kao jednu od specijalizacija koju biste željeli dobiti?



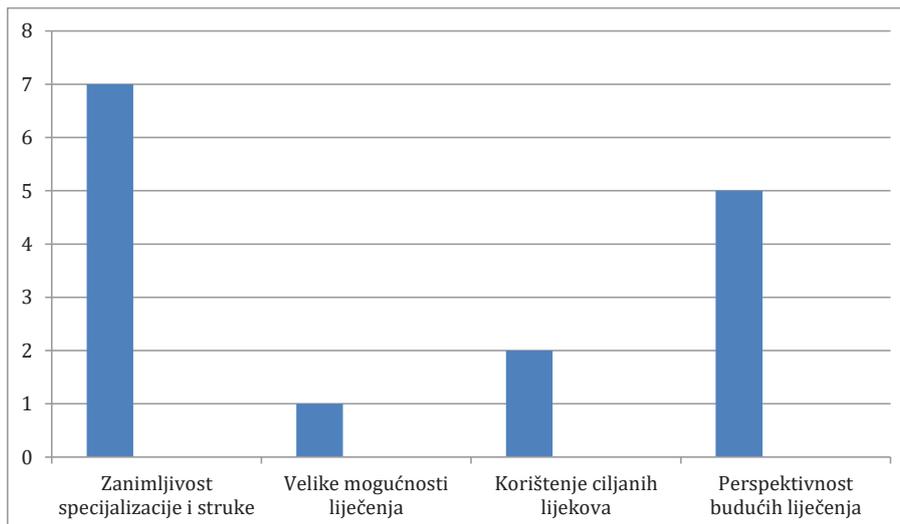
**Slika br.2** 69,2% (36) studenata ne vidi hematologiju kao jednu od specijalizacija koju bi htjelo dobiti, dok 30,8% (16) studenata prepoznaje hematologiju kao jednu od poželjnih specijalizacija.

**Pitanje br. 3** Ako je vaš odgovor na pitanje br. 2 „NE“, navedite glavni razlog/razloge zbog kojeg ne biste željeli biti hematolog/inja:



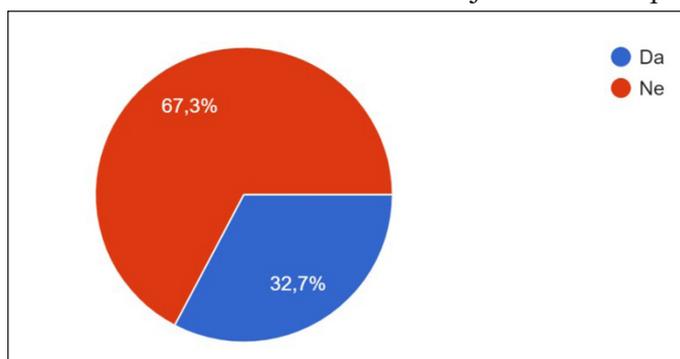
**Slika br. 3.** Studenti koji ne bi željeli dobiti specijalizaciju iz hematologije kao glavni razlog takvoj odluci navode opću nezainteresiranost prema specijalizaciji i struci, kompleksnost specijalizacije i struke, premalo kontakta s pacijentom, premalo dijagnostike u svakodnevnom radu te da ne žele raditi s onkološkim pacijentima.

**Pitanje br. 4.** Ako je vaš odgovor na pitanje broj 2 „DA“, navedite glavni razlog/razloge zbog kojeg biste željeli biti hematolog/inja:



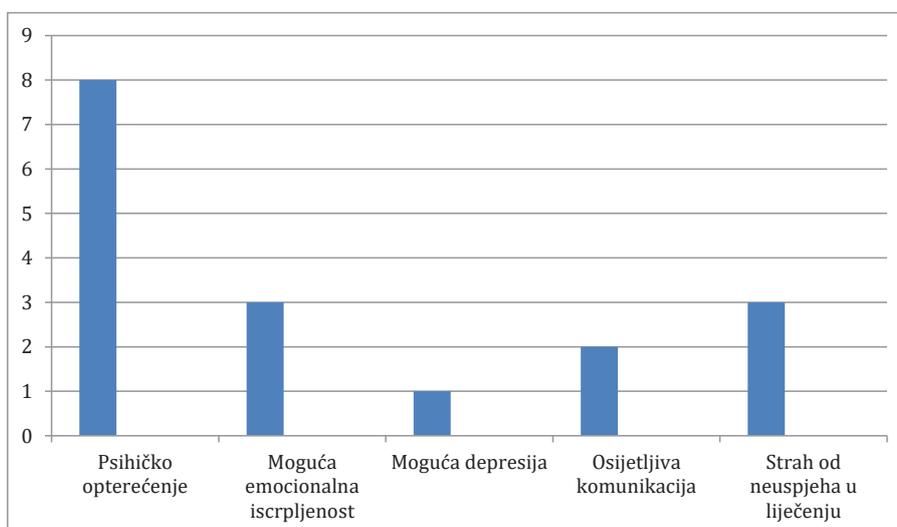
*Slika br. 4. Studenti koji bi željeli dobiti specijalizaciju iz hematologije kao glavni razlog takvoj odluci navode zanimljivost specijalizacije i struke, perspektivnost budućih liječenja, velike mogućnosti liječenja te korištenje ciljanih lijekova.*

**Pitanje br. 5.** Bi li vam svakodnevni rad s bolesnicima oboljelim od raka predstavljao problem?



*Slika br. 5. 67,3% (35) anketiranih studenata ne vidi problem u svakodnevnom radu s bolesnicima oboljelim od raka, dok 32,7% (17) studenata u tome vidi problem.*

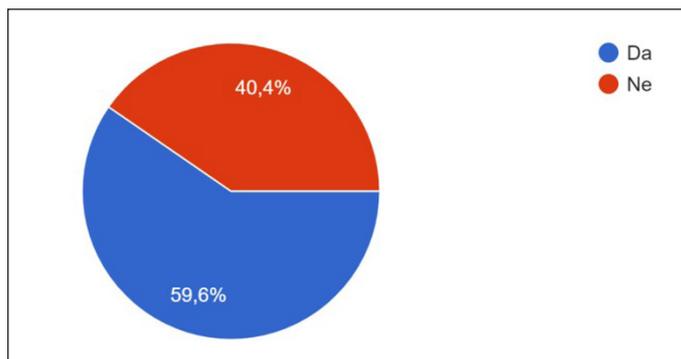
**Pitanje br. 6.** Ako je vaš odgovor na pitanje broj 5 “DA”, navedite glavni razlog/razloge za takav odgovor:



*Slika br. 6. Studenti koji osjećaju problem u svakodnevnom radu s bolesnicima oboljelim od raka kao glavni razlog takvom stavu navode preveliko psihičko opterećenje, moguću emocionalnu iscrpljenost, moguću*

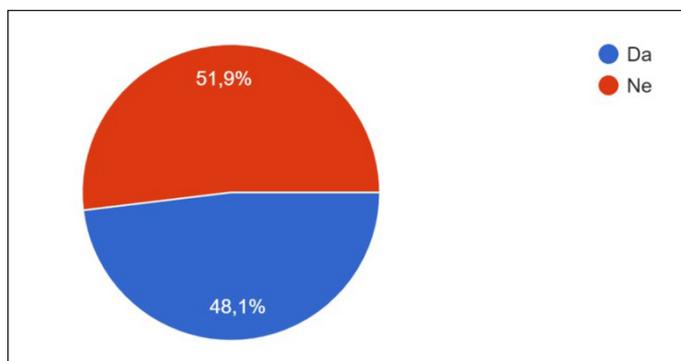
*depresivnost, osjetljivu komunikaciju i strah od neuspjeha u liječenju.*

**Pitanje br. 7.** Je li vam važno da vaša buduća specijalizacija pruža mogućnosti rada i zarade u privatnoj praksi?



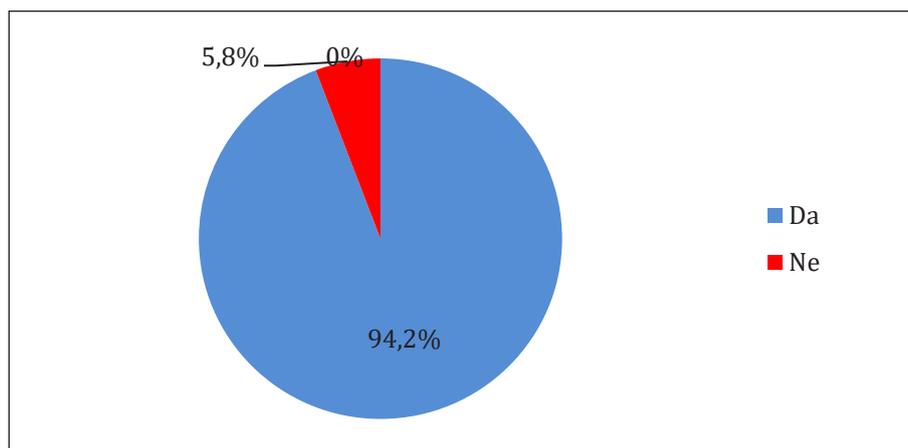
**Slika br. 7.** 59,6% (31) ispitanih studenata smatra važnim mogućnost rada u privatnom sektoru prilikom odabira specijalizacije, dok 40,4% (21) studenata to ne smatra važnim.

**Pitanje br. 8.** Je li vam jako važno da se u svojoj praksi kao liječnik bavite i znanstvenim radom?



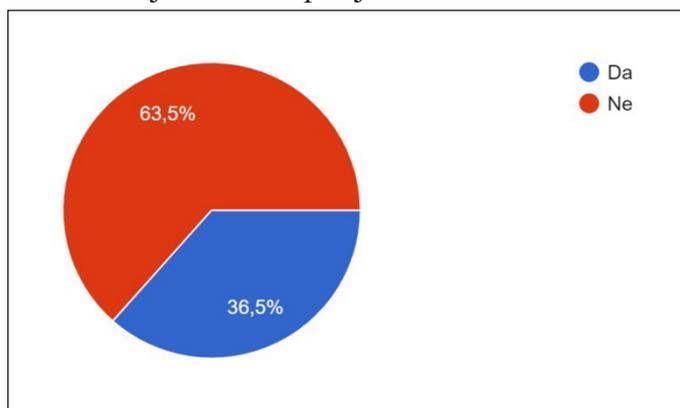
**Slika br. 8:** 51,9% (27) studenata ne smatra osobito važnim da se u svojoj stručnoj praksi bave i znanstvenim radom, dok 48,1% (25) studenata to smatra važnim i poželjnim.

**Pitanje br. 9.** Jeste li voljni čitav profesionalni život učiti i usvajati nova znanja?



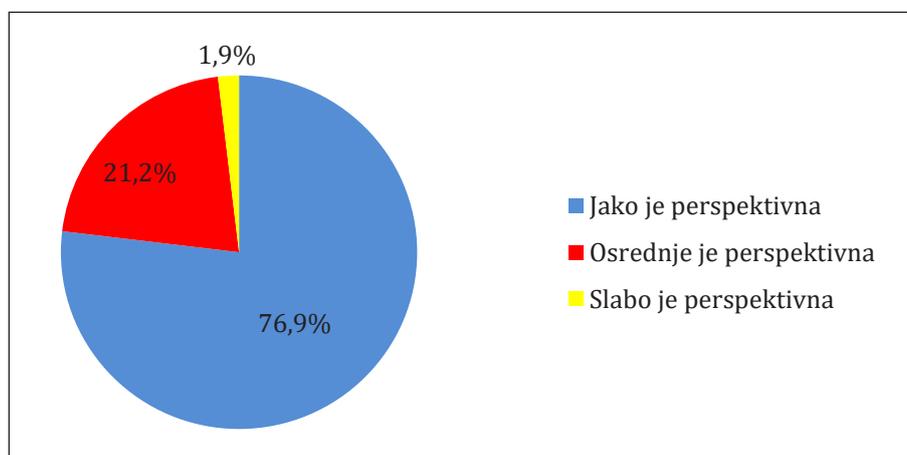
**Slika broj 9.** 94,2% (49) anketiranih studenata voljno je čitav svoj profesionalni život učiti i usvajati nova znanja, a 5,8% (3) nije spremno na to.

**Pitanje br. 10.** Je li često suočavanje sa smrću pacijenata nešto što bi vas odbilo od neke specijalizacije?



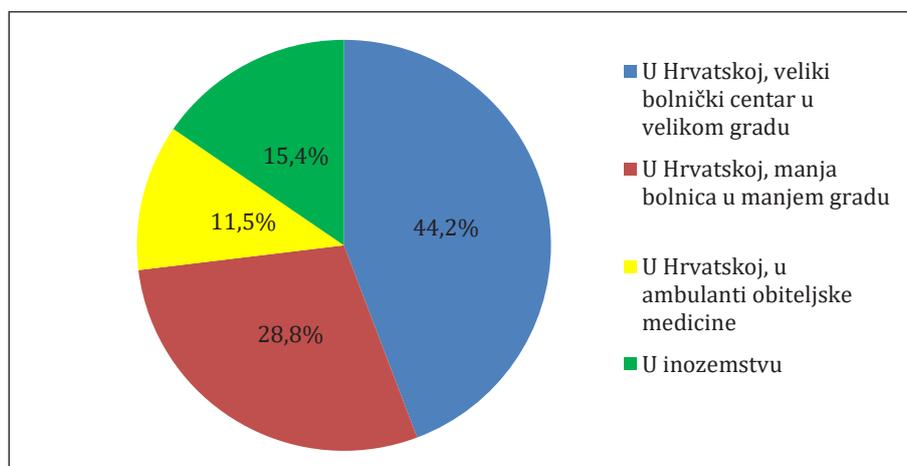
**Slika broj 10.** 63,5% (33) studenata smatra da često suočavanje sa smrću pacijenata nije nešto što bi ih odbilo od potencijalne specijalizacije, dok 36,5% (21) studenata smatra da ih često susretanje sa smrću pacijenata odbija od potencijalne specijalizacije.

**Pitanje br. 11.** Koliko smatrate da je hematologija u bliskoj budućnosti perspektivna klinička struka u smislu poboljšavanja sadašnjih ishoda liječenja hematoloških bolesti?



**Slika br. 11.** 76,9% (40) studenata odgovorilo je da je hematološka struka jako perspektivna u smislu budućeg poboljšavanja ishoda liječenja, 21,2% (11) studenata drži da je hematologija osrednje perspektivna i 1,9% (1) da je slabo perspektivna s obzirom na mogućnosti budućeg liječenja.

**Pitanje br.12.** Gdje biste najviše voljeli provesti svoj radni vijek?



**Slika br. 12.** 44,2% (23) studenata najviše bi svoj radni vijek željelo provesti u velikom kliničkom centru u nekom velikom gradu u Hrvatskoj, 28,8% (15) studenata željelo bi raditi u manjoj bolnici u nekom manjem gradu u Hrvatskoj, 15,4% (8) studenata željelo bi raditi u inozemstvu, a 11,5% (6) studenata željelo bi raditi u ambulanti obiteljske medicine u Hrvatskoj.

## Rasprava

Rezultati ankete provedene među studentima medicine završene 5. i 6. godine studija na Medicinskom fakultetu u Rijeci ponajviše usmjerenoj prema procjeni atraktivnosti specijalizacije iz hematologije dala je relativno zadovoljavajuće rezultate, na što su, vjerujemo, utjecale i razne poduzete mjere za podizanje zanimanja za specijalizaciju iz hematologije navedene u uvodu. Oko 30% studenata vidi hematologiju kao jednu od poželjnih specijalizacija, a općenito među studentima najviše interesa ima upravo za specijalizacije iz internističkih struka. Također, velika većina ispitanika drži da je hematologija perspektivna struka obzirom na mogućnosti liječenja. Kao najveće prednosti buduće specijalizacije iz hematologije studenti navode zanimljivost specijalizacije i struke, velike mogućnosti liječenja hematoloških bolesti uz korištenje ciljanih lijekova, kao i perspektivnost budućih liječenja. Većina ispitanih studenata ne zazire od rada s bolesnicima oboljelim od raka, niti česte suočenosti sa smrću bolesnika. Studenti koji osjećaju problem u svakodnevnom radu s bolesnicima oboljelim od raka kao glavni razlog takvom stavu navode preveliko psihičko opterećenje, moguću emocionalnu iscrpljenost, moguću depresivnost, osjetljivost komunikacije s oboljelima i njihovim obiteljima te strah od neuspjeha u liječenju. Najveći broj ispitanika željelo bi raditi u nekoj od velikih bolnica u najvećim hrvatskim gradovima, a nešto malo više od polovice anketiranih željelo bi dobiti specijalizaciju koja omogućuje bolje perspektive rada u privatnom sektoru. Uz stručni rad, zainteresiranost za znanstveni rad izrazilo je tek nešto manje od polovice anketiranih studenata. Nešto više od 15% ispitanika željelo bi raditi izvan Republike Hrvatske.

Iako je ova anketa učinjena na samo djelomičnom uzorku studenata završnih godina studija medicine te poneka od pitanja te ponuđenih odgovora nisu potpuno precizno i sveobuhvatno postavljena, mišljenja smo da daje dobar uvid u trendove naših studenata prema poželjnosti i atraktivnosti specijalizacije iz hematologije pa i šire, barem u segmentu riječke medicine. Bilo bi zanimljivo učiniti ovu anketu i na drugim hrvatskim medicinskim fakultetima kako bi se utvrdile eventualne međusobne razike, analiziralo ih te iz toga donijelo određene zaključke. Ovakve i slične ankete mogu biti alat za planiranje i provođenje mjera usmjerenih na privlačenje budućih liječnika određenim specijalizacijama, posebno onim manje popularnim te manje lukrativnim, kao što je već i ranije opisivano u literaturi (2,3).

## Literatura:

1. Alhowar, Njoud & Zaidi, Abdul Rehman. (2019). Perception of Medical Students of Working As a Hematologist in an Institution in Saudi Arabia. *Blood*. 134. 5805-5805. 10.1182/blood-2019-132210.
2. Horn, Leora & Koehler, Elizabeth & Gilbert, Jill & Johnson, David. (2011). Factors Associated With the Career Choices of Hematology and Medical Oncology Fellows Trained at Academic Institutions in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29. 3932-8. 10.1200/JCO.2011.35.8663.
3. Masselink LE, Erikson CE, Connell NT, De Castro LM, Dent GA, Marshall AL, Naik RP, Nelson M, O'Connell CL, Rajasekhar A, Sharma D, Smith M, Lee AI. Associations between hematology/oncology fellows' training and mentorship experiences and hematology-only career plans. *Blood Adv*. 2019 Nov 12;3(21):3278-3286. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000569.

**Zahvala:** zahvaljujemo se studentima koji su odvojili svoje slobodno vrijeme kako bi sudjelovali u ovoj anketi.

## Oncofertility procedures to preserve reproductive potential in men

**Davor Ježek**

*Department for Transfusion Medicine and Transplantation Biology, Clinical Hospital Centre Zagreb, University of Zagreb, School of Medicine*

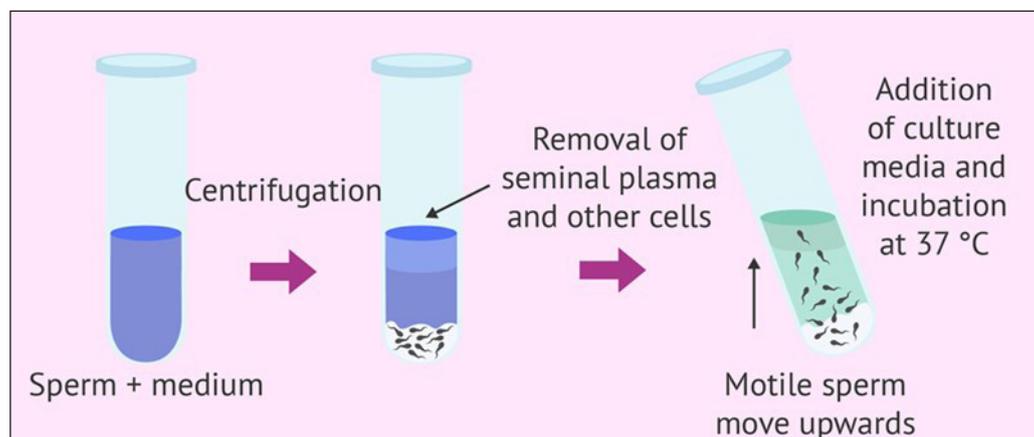
### Introduction

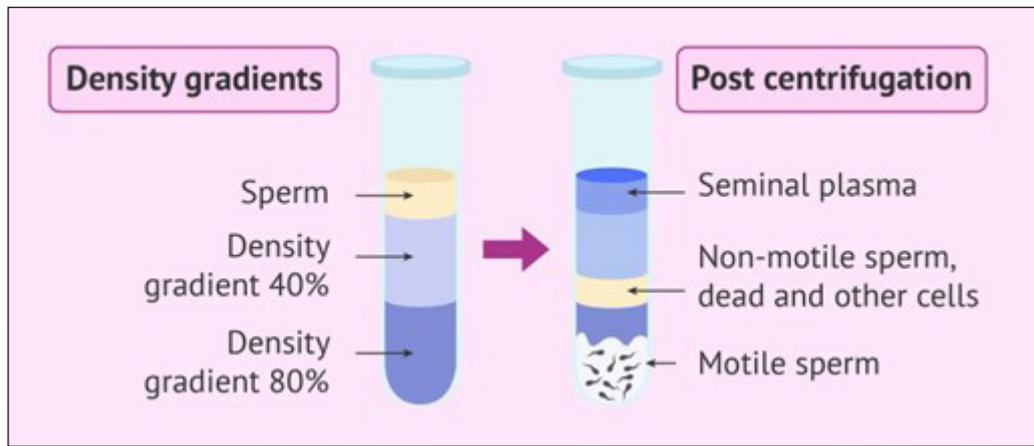
Approximately 300,000 children aged 0 to 19 years are diagnosed with cancer each year worldwide<sup>1</sup>. Since the cause of the vast majority of cancers in children and adolescents is unknown and, therefore, their occurrence can not be prevented, great effort is being made to determine the correct diagnosis followed by effective therapy promptly. Significant advances in oncological therapies have led to quite high survival rates of more than 80% of patients in the paediatric population<sup>2-5</sup>. However, anti-cancer therapies, including chemotherapy, radiotherapy, and hematopoietic stem cell transplantation, have a well-known long-term adverse effect on gonadal function, encouraging the development of fertility preservation techniques for cancer patients. Consequently, fertility preservation options like cryopreservation of gametes and embryos are usually discussed and offered to patients before the gonadotoxic treatment commences. Although the testes of prepubertal patients do not complete spermatogenesis, numerous studies have suggested that cytotoxic treatments used to treat disease in these patients also affect fertility<sup>6-8</sup>. Since prepubertal patients cannot produce their gametes, conventional strategies for preserving fertility potential are impossible. Therefore, it is necessary to develop alternative approaches that allow fertility preservation and restoration for those patients hoping for future parenthood. Furthermore, fertility preservation options for young cancer patients should be considered

in multidisciplinary cooperation with oncologists, urologists, andrologists, and fertility specialists, due to the specific challenges in children and adolescents, including ethical, practical, and scientific issues.

### Fertility Preservation in Adolescents

The availability of fertility preservation techniques depends on whether the child facing anti-cancer therapy is prepubertal or postpubertal, as well as on the urgency of cancer treatment initialization. Options for fertility preservation in adolescents who have undergone puberty are broader than those in prepubertal children. In most male adolescents, semen cryopreservation is possible<sup>9</sup>, which makes spermatozoa cryopreservation after masturbation the most established method of fertility preservation prior to gonadotoxic treatments<sup>10</sup> (Figure 1). Research by Bahadur et al.<sup>11</sup> has shown that spermatozoa quality in young boys is not affected by a patient's age or diagnosis, wherefore cryopreserved semen from adolescent cancer patients is suitable and potentially useful for assisted reproductive procedures in the future. Adolescents who can not produce sperm samples by masturbation should be offered options of electroejaculation (EEJ) under sedation or anaesthesia<sup>12</sup>, epididymal or testicular aspiration (TESA), testicular sperm extraction (TESE/mTESE), or retrieval from a post-masturbation urine sample<sup>13</sup> (Figure 2).

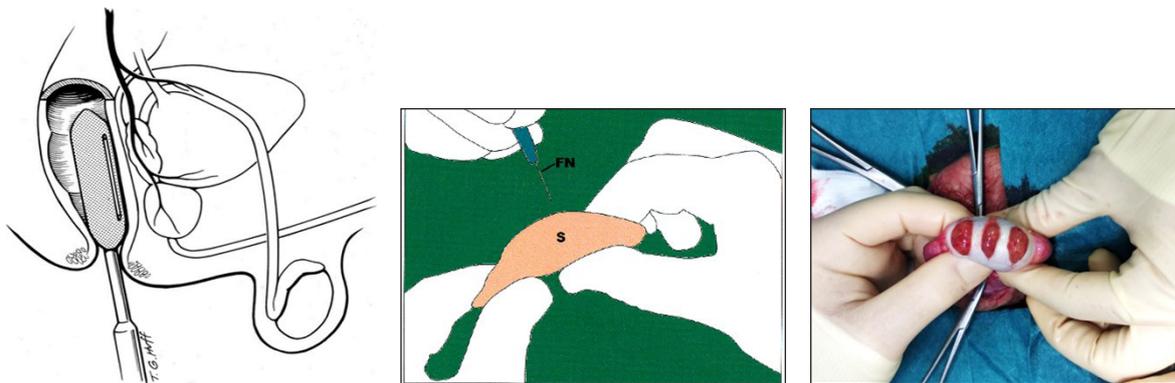




**Figure 1.** Schematic representation of the two most frequently used methods to select spermatozoa from ejaculate (“swim up” /upper/ and centrifugation in density gradients /lower/) that can be cryopreserved later on (<https://www.invitro.com/en/fertility-preservation/>).

**Electroejaculation** Study of Berookhim and Mulhall<sup>14</sup> showed that successful spermatozoa retrieval with EEJ was obtained in 60% of boys aged 11-19 years. Complications of the technique were rare, but the quality of sperm obtained that way was

variable. In the case that EEJ is inadequate to collect sufficient volume or density of motile sperm for cryopreservation and in the case of azoospermia, more invasive methods such as TESA or TESE/mTESE could be taken into consideration.



**Figure 2.** Various techniques to retrieve spermatozoa: electroejaculation, EEJ /left, <https://doi.org/10.1017/CBO9780511997761>; testicular sperm aspiration, TESA (FN-fine needle; S-scrotum) /middle; open testicular biopsy, TESE /right/.

**Testicular aspiration (TESA)** TESA is generally performed under local anaesthesia with no incisions needed. This is a relatively simple and routine procedure that usually takes approximately 10 min. However, in some cases, TESA does not provide an adequate yield of spermatozoa, and hence the application of the open testis biopsy could be required.

**Surgical sperm extraction (TESE/mTESE)** TESE was safely performed for fertility preservation purposes in adolescents before cancer therapy with a spermatozoa retrieval rate of 50% and was successful even in an 11-year-old boy<sup>14</sup>. Although a scrotal incision (Figure 2) is required to obtain a sizable piece/s of seminiferous tubules for this approach, it is generally performed under local anaes-

thesia without any complication. Additionally, an important advantage of the technique is a lack of delay in the initiation of chemotherapy among patients scheduled for urgent cancer treatment. On the other hand, the major shortcoming of TESE is a relatively large volume of testicular parenchyma, which is non-selectively removed to obtain a sufficient specimen for spermatozoa retrieval. mTESE (microdissection testicular sperm extraction), a more precise procedure that identifies seminiferous tubules under the operating microscope, can overcome such a problem.

TESE can also be applied when testicular cancer is diagnosed in an azoospermic patient. Suppose the cancer is detected in an early stage, restricted

to a limited area of the testis. In that case, there is a possibility to cryopreserve a healthy part of the testicular parenchyma in the form of multiple biopsies. After the orchiectomy, multiple bioptic samples can be taken from the tumour-free area of the testis. In our setting, each biopsy is, immediately upon the excision, processed in the laminar flow cabinet (placed inside the operational theatre) and cut into two parts: one part is instantly frozen in a sperm freezing medium for the potential TESE purposes, whereas the other half is fixed in a fixative and subjected to detailed histological analysis and immunohistochemistry for detection of germ cell neoplasia in situ (GCNIS). Suppose the histological analysis shows no presence of the tumour. In that case, frozen samples can be mobilized from the cryostorage and used for the consequent TESE and intracytoplasmic sperm injection into the oocyte (ICSI) procedure.

In general, in order to achieve pregnancy, *in vitro* fertilization techniques (IVF) are often recommended rather than intrauterine insemination (IUI) due to a limited sperm resources. If a thawed sample contains only a few spermatozoa, fertilization can be yet achieved by performing ICSI.

**Cryopreservation of testicular tissue** Several slow-programmed freezing protocols for human immature testicular tissue have been described thus far, using cryoprotectants such as 1.5 M ethylene glycol and sucrose<sup>15</sup>, 0.7 M DMSO<sup>16</sup> or 0.7 M DMSO and sucrose<sup>17,18</sup>. Keros et al.<sup>16</sup> reported an efficient freezing protocol for prepubertal testicular tissue cryopreservation using 5% DMSO as a cryoprotectant to successfully maintain spermatogonia, Sertoli cells and stromal compartment without clear structural changes during freezing, thawing and tissue culture. Standardizing a successful slow freezing method for cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspension, with an optimized type and concentration of cryoprotectant that would sustain and preserve the quality and viability of the tissue is crucial before clinical application of fertility restoration in prepubertal or adolescent cancer survivors.

On the other hand, vitrification can also be used as an effective method for tissue preservation instead of slow freezing methods<sup>19,20</sup>. The study conducted by Curaba et al.<sup>19</sup> has demonstrated vitrification as a convenient method for cryopreservation of immature human testicular tissue, with being faster and cheaper than slow freezing. It is still to be determined whether slow freezing and vitrification are equally safe and effective regarding immature testicular tissue cryopreservation or if one of these

approaches is predominant in terms of tissue or cell quality preservation.

Since the cryopreserved human testicular tissue or testicular cells have not yet resulted in spermatozoa production, none of the preservation protocols has been fully validated or shown to be superior to any other reported method. With the purpose of the future clinical application of fertility restoration, it is necessary to validate, optimize and standardize cryopreservation protocol for immature testicular tissue or testicular cell suspension. Furthermore, the influence of freezing protocols on genetic and epigenetic modifications in germ cells after cryopreservation must be thoroughly examined.

### Fertility Preservation in the Prepubertal Patients

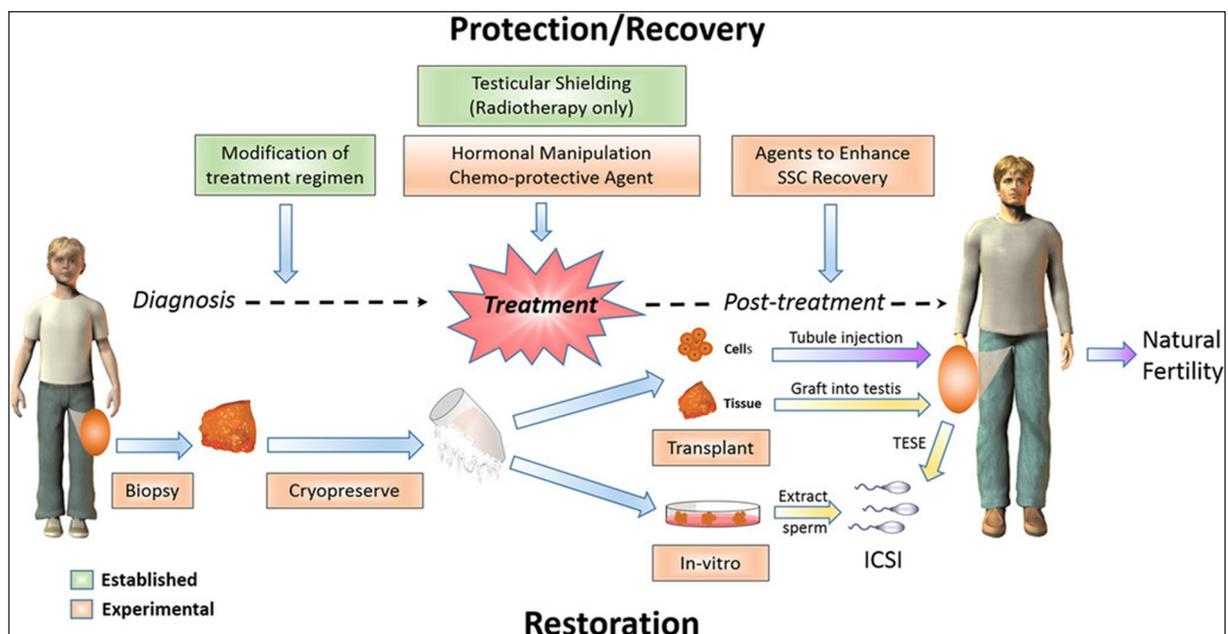
Fertility preservation in prepubertal boys and adolescents, for whom spermatogenesis has not started yet, is challenging due to the fact that testis only contains diploid germ cells, including prospermatogonia/SSCs, which makes the use of the conventional approach of sperm cryopreservation impossible. The only option currently available for future fertility restoration in this group of cancer patients is cryo-banking of testicular tissue containing SSCs<sup>21,22</sup> (Figure 3). SSCs are a small group of diploid testis cells located on the basement membrane of seminiferous tubules. These cells have the self-renewal ability. Thus, they maintain a reserve stem cell pool but can also differentiate into other cell types<sup>23</sup>. A fine balance between self-renewal and differentiation of SSCs is determined by their microenvironment, the so-called stem cell niche, which is needed for cell survival, proliferation and differentiation. Sertoli cells in the seminiferous epithelium of the testis and probably also cells from the interstitial compartment modulate SSCs renewal and differentiation.

SSCs are responsible for the continuous process of spermatogenesis, assuring unlimited sperm production during adult life. Based on morphological studies, three types of spermatogonia in the adult human testis can be distinguished:  $A_{\text{dark}}$ ,  $A_{\text{pale}}$  and B spermatogonia, which also differ by their role in spermatogenesis<sup>24</sup>.  $A_{\text{dark}}$  are known as reserve stem cells. They are mitotically quiescent and become proliferatively active only during the pubertal expansion or in response to spermatogonial depletion due to irradiation or toxic exposure. On the other hand,  $A_{\text{pale}}$  are considered self-renewing progenitors since they actively divide to maintain the stem cell

pool. Type B spermatogonia differentiate into spermatocytes in which genetic material is recombined and segregated through meiosis, leading to the formation of haploid spermatids. The resulting spermatids undergo various morphological changes (spermiogenesis) in order to transform into spermatozoa.

SSCs are established in the human testis during the first three months after birth<sup>25</sup>, and are present in the testis throughout life unless they are lost due to a disease or some medical treatment<sup>26</sup>. Even low doses of cytotoxic drugs or irradiation diminish the level of differentiating spermatogonia. This group of testicular cells is highly sensitive due to their rapidly-dividing nature, while less sensitive non-proliferating SSCs and spermatocytes and spermatids survive. Nevertheless, spermatogenesis can be

recovered by remaining SSCs, but the possibility of reinitiation depends on the type and dose of cytotoxic drug or irradiation used in therapy treatment. Therefore, cryopreservation of testicular tissue pieces containing SSCs or SSCs as a cell suspension is the only available strategy for fertility preservation in prepubertal boys and adolescents who do not yet produce spermatozoa that could be cryopreserved. Cryopreservation of testicular tissue has been ethically approved, although restoring fertility with cryopreserved spermatogonia/testicular tissue containing spermatogonia is still experimental. Therefore, in Europe, only a few centres offer prepubertal testis cryopreservation, but more to come in the near future.



**Figure 3. Fertility preservation in prepubertal boys according to Kilcoyne and Mitchell (Reproduction (2019) 158 F1–F14, <https://doi.org/10.1530/REP-18-0533>).**

### Fertility Restoration

While testicular tissue cryopreservation protocols have been reported<sup>21,22</sup> and are available to preserve prepubertal testicular tissue and cells, techniques for obtaining mature spermatozoa from the cryopreserved immature testicular tissue are still at the research stage.

Different approaches have been considered for the restoration of fertility using cryopreserved testicular tissue, including autologous transplantation of SSC, testicular tissue grafting or xenografting into immunodeficient mice, *de novo* testicular morphogenesis, and testicular tissue organ culture and derivation of germ cells from induced pluripotent stem cells<sup>27,28</sup>. Each of these strategies has mainly been studied in

animals, and none of them has yet proven safe and efficient in humans.

Cryopreservation of testicular tissue or cells containing SSC has been imposed as a feasible way of fertility restoration using the autologous transplantation of SSCs (or tissue pieces containing SSCs) years after cryo-storage of these same SSCs, due to their ability to regenerate spermatogenesis whether isolated from newborns or adults, freshly obtained or cryopreserved for years.

In order to preserve the integrity of the stem cell niche, which is the key to normal regeneration of spermatogenesis as well as for the process itself, isolated and cryopreserved biopsies of testicular tissue can be cultured in the form of whole pieces *in vitro* or

*in vivo* by performing tissue transplantation (Figure 3). If the pieces of testicular tissue are transplanted into a patient to restore normal spermatogenesis *in vivo*, there is a risk of introducing the cancer cells into the patient. Therefore, this approach of fertility restoration can only be considered if the tissue does not carry the risk of malignant contamination. To overcome this risk, a good alternative strategy is the development of spermatozoa *in vitro*, which can be later on used for ICSI.

#### Literature:

- Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries L et al. (2017) International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *The Lancet Oncology* 18:719-731. doi: 10.1016/s1470-2045(17)30186-9
- Gatta G, Botta L, Rossi S et al. (2014) Childhood cancer survival in Europe 1999–2007: results of EUROCARE-5—a population-based study. *The Lancet Oncology* 15:35-47. doi: 10.1016/s1470-2045(13)70548-5
- Smith M, Altekruse S, Adamson P et al. (2014) Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer* 120:2497-2506. doi: 10.1002/cncr.28748
- Anderson C, Smitherman A, Nichols H (2018) Conditional relative survival among long-term survivors of adolescent and young adult cancers. *Cancer* 124:3037-3043. doi: 10.1002/cncr.31529
- Howlander N, Krapcho M, Miller D et al. (2019) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. In: SEER. [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/). Accessed 1 Sep 2020
- Rivkees S, Crawford J (1988) The relationship of gonadal activity and chemotherapy-induced gonadal damage. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 259:2123-2125. doi: 10.1001/jama.259.14.2123
- Mackie E, Radford M, Shalet S (1996) Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. *Medical and Pediatric Oncology* 27:74-78. doi: 10.1002/(sici)1096-911x(199608)27:2<74::aid-mpo2>3.0.co;2-q
- Kenney L, Laufer M, Grant F et al. (2001) High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer* 91:613-621. doi: 10.1002/1097-0142(20010201)91:3<613::aid-cncr1042>3.0.co;2-r
- Kliesch S, Behre H, Jürgens H, Nieschlag E (1996) Cryopreservation of semen from adolescent patients with malignancies. *Medical and Pediatric Oncology* 26:20-27. doi: 10.1002/(sici)1096-911x(199601)26:1<20::aid-mpo3>3.0.co;2-x
- Oehninger S (2005) Strategies for Fertility Preservation in Female and Male Cancer Survivors. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 12:222-231. doi: 10.1016/j.jsig.2005.01.026
- Bahadur G (2002) Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. *Human Reproduction* 17:3157-3161. doi: 10.1093/humrep/17.12.3157
- Schmiegelow M, Sommer P, Carlsen E et al. (1998) Penile Vibratory Stimulation and Electroejaculation Before Anticancer Therapy in Two Pubertal Boys. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 20:429-430. doi: 10.1097/00043426-199809000-00004
- Opsahl M, Fugger E, Sherins R, Schulman J (1997) Preservation of reproductive function before therapy for cancer: new options involving sperm and ovary cryopreservation. *The cancer journal from Scientific American* 3:189-91.
- Berookhim B, Mulhall J (2014) Outcomes of operative sperm retrieval strategies for fertility preservation among males scheduled to undergo cancer treatment. *Fertility and Sterility* 101:805-811. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.122
- Kvist K, Thorup J, Byskov A et al. (2006) Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Human Reproduction* 21:484-491. doi: 10.1093/humrep/dei331
- Keros V, Hultenby K, Borgström B et al. (2007) Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in prepubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Human Reproduction* 22:1384-1395. doi: 10.1093/humrep/del508
- Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B et al. (2007) Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Human Reproduction* 22:1603-1611. doi: 10.1093/humrep/dem062
- Poels J, Abou-Ghannam G, Herman S et al. (2014) In Search of Better Spermatogonial Preservation by Supplementation of Cryopreserved Human Immature Testicular Tissue Xenografts with N-acetylcysteine and Testosterone. *Frontiers in Surgery* 1:47. doi: 10.3389/fsurg.2014.00047
- Curaba M, Poels J, van Langendonck A et al. (2011) Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification?. *Fertility and Sterility* 95:2123.e9-2123.e12. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.014
- Poels J, Van Langendonck A, Many M et al. (2013) Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia. *Human Reproduction* 28:578-589. doi: 10.1093/humrep/des455
- Bahadur G, Chatterjee R, Ralph D (2000) Testicular tissue cryopreservation in boys. Ethical and legal issues: Case report. *Human Reproduction* 15:1416-1420. doi: 10.1093/humrep/15.6.1416
- Pietzak E, Tasian G, Tasian S et al. (2015) Histology of Testicular Biopsies Obtained for Experimental Fertility Preservation Protocol in Boys with Cancer. *Journal of Urology* 194:1420-1424. doi: 10.1016/j.juro.2015.04.117
- Meachem S (2001) Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction* 121:825-834. doi: 10.1530/reprod/121.6.825
- Clermont Y (1966) Spermatogenesis in Man. A study of the spermatogonial population. *Fertility and Sterility* 17:705-721. doi: 10.1016/s0015-0282(16)36120-9
- Hutson J, Li R, Southwell B et al. (2013) Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism?. *Frontiers in Endocrinology*. doi: 10.3389/fendo.2012.00176
- Stukenborg J, Jahnukainen K, Hutka M, Mitchell R (2018) Cancer treatment in childhood and testicular function: the importance of the somatic environment. *Endocrine Connections* 7:R69-R87. doi: 10.1530/ec-17-0382
- Gassei K, Orwig K (2016) Experimental methods to preserve male fertility and treat male factor infertility. *Fertility and Sterility* 105:256-266. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.020
- Medrano J, Andrés M, García S et al. (2018) Basic and Clinical Approaches for Fertility Preservation and Restoration in Cancer Patients. *Trends in Biotechnology* 36:199-215. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.10.010





## ABSTRACT BOOK

**15<sup>th</sup> Regional Central-Eastern/South-Eastern European Pediatric Hematology-Oncology Meeting**  
Opatija, Croatia, November 3 - 5, 2022

# **15<sup>th</sup> Regional Central-Eastern/South-Eastern European Pediatric Hematology-Oncology Meeting**

**Opatija, Croatia, November 3 - 5.**

## **MEETING VENUE:**

Congress Center Conference Park 25/7  
Amadria Park Grand hotel 4 opatijska cvijeta, Opatija

## **ORGANISERS:**

Croatian Medical Association - Croatian Pediatric Society  
KroHem - Croatian Cooperative Group for Hematological Diseases

## **ORGANISING COMMITTEE:**

Jelena Roganović, Ernest Bilić, Silvije Šegulja, Igor Aurer  
Chair of the Organising Committee: Jelena Roganović

## **SCIENTIFIC COMMITTEE:**

Jelena Roganović, Jaroslav Štěrba, Ernest Bilić, Gabor Kovacs, Riccardo Haupt,  
Csongor Kiss, Ewa Bien, Jan Godzinski, Francesca Fioredda, Janez Jazbec, Dražen Pulanić

## **TECHNICAL ORGANISER:**

Conventus Credo d.o.o.



Regional Central-Eastern/South-Eastern European Pediatric Oncology and Hematology Meeting is an annual meeting dating back to 1997. The meeting was initiated as the Romanian-Hungarian Pediatric Oncology Meeting and was founded by Dr Lasszlo Kalmar from Budapest, Hungary, and Dr Balla Arpad from Odorheiu Secuiesc, Romania. The aim was to help the Romanian pediatric oncology centers to improve the quality of care for children with cancer, with the Hungarian centers as models. In 2008, Prof. Kiss Csongor launched the idea to extend the meeting to the neighboring countries sharing similar difficulties, and the same year the meeting in Hajduszoboszlo, Hungary, was joined by around 100 colleagues from Bulgaria, Croatia, and Serbia. From 2009, the meeting got its current name, with the participants from 10 Central-Eastern/South-Eastern European countries: Romania, Hungary, Bulgaria, Croatia, Serbia, Slovenia, North Macedonia, Czech Republic, Slovakia, and Poland. The most important achievement has been the participation of countries in the international research projects as IBFM-LL 2009, ALLIC-REL 2016, ALLIC-BFM 2020, and CEPOETA (Central European Pediatric Oncology Early Trial Alliance). It is my great pleasure to host the 15th Regional Central-Eastern/South-Eastern European Pediatric Onco-Hematology Meeting 2022 (November 3-5) at Opatija, in the beautiful Kvarner region in Croatia. The Meeting will feature a highly interactive, evidence-based, and multidisciplinary program and will provide the ideal forum to stimulate ideas, educate, share expertise, initiate intense discussions, and extend networking opportunities. We have invited exceptional speakers and prepared symposium topics that will appeal to all. Selected abstracts are published in this issue of Bilten Krohema. I truly hope that participants will return home with renewed passion and friendship, enhanced skills, and ideas for collaboration.

Jelena Roganović, MD, PhD, Prof.

Chair of the Organizing Committee

## PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA – CONTEMPORARY PRINCIPLES AND PRACTICE

### Csongor Kiss

*Division of Pediatric Hematology-Oncology, Institute of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary*

The Hungarian Pediatric Oncology Group participated in ALLIC clinical trials with a conventional “BFM” backbone. ALLIC 2009 protocol investigated three major innovations. A quality controlled, multiparameter-based flow-cytometry (FC) method for the detection of minimal residual disease (MRD) at mid-induction was developed. This approach allowed definition of a standard risk group with a superior 5-yr EFS. Patients belonging to the intermediate risk (IR) group, underwent a dual randomization. Randomization 1 investigated the augmented use of L-asparaginase (native E.coli preparation) treatment. IR patients with B-cell precursor ALL underwent a second randomization. In consolidation either 2 g/m<sup>2</sup> or 5 g/m<sup>2</sup> methotrexate was applied. High-risk patients underwent Randomization 1. Total 5-y OS and EFS of ALLIC 2009 was 82.6±0.5%, and 75.2±0.6%, respectively. The two doses of methotrexate proved equally efficacious. Treatment outcomes with conventional and augmented application of L-asparaginase were similar. Based on the results of ALLIC 2009 and parallel BFM trials, ALLIC 2022 was developed. In this protocol pegylated product will be used to augment L-asparaginase effect. Efficacy and safety of anti-CD20 monoclonal antibody rituximab will be investigated in case of CD20-positive ALL. Risk estimation of patients will rely on investigating novel MRD timepoints and a more precise genetic diagnosis. Targeted treatment will be applied for selected group of patients, i.e. Ph-positive ALL, Ph-like ALL, patients with Down-syndrome and infants. Targeted treatment approaches will become regular elements of the treatment of therapy resistant/relapsed (r/r) ALL. In case of high-risk and r/r T-ALL, the use of nelarabine and of anti-CD38 monoclonal antibody will be investigated.

## UPDATES ON THE ALL-IC REL PROTOCOL

### Dániel Erdélyi

*2<sup>nd</sup> Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

**BACKGROUND:** The ALL-IC REL group wrote current best practice guidance versions for treating children with ALL 1st relapse. Since the writing of the latest 2019 version of the protocol, an abundance of new data emerged that improve patient outcomes.

**METHODS:** Certain genetic factors were identified to override the prognostic relevance of classic risk factors. Blinatumomab was proven to reduce relapse rate and toxicities alike in both the high and the low risk group. It was demonstrated that inotuzumab ozogamicin is a useful tool to get chemotherapy-resistant patients into remission. CAR-T therapy was registered as a new cellular immunotherapy option instead of or beside allogeneic stem cell transplantation.

**RESULTS:** A new protocol version is being written, keeping the backbones as similar as possible to the upcoming IntReALL study protocol. Patients will be stratified into 4 risk groups. An additional salvage arm will also be defined for patients with poor response to relapse treatment. The protocol will incorporate most new agents in an optional manner, this is to accommodate the varying funding possibilities of these new therapies in various countries of ALL-IC and others with similar resources.

**CONCLUSION:** Further countries and centres are welcome to follow the openly available guidance versions and join the ALL-IC REL registry, also the group’s monthly online tumour board meeting! Acknowledgements to the ALL-IC REL steering committee: Janez Jazbec and Marko Kavcic (Slovenia), Volkan Hazar (Turkey), Juan Tordecilla (Chile), Sophia Polychronopoulou (Greece), Monica Makiya (Argentina) and also to the national coordinators from Bulgaria, Romania, Serbia.

## **CLINICAL APPLICABILITY OF A COMPREHENSIVE NEXT-GENERATION SEQUENCING APPROACH FOR THE ADVANCED GENETIC CHARACTERIZATION OF CHILDREN WITH ACUTE LEUKEMIA IN HUNGARY**

**Bálint Egyed<sup>1,2</sup>, Szilvia Krizsán<sup>1</sup>, Borbála Péterffy<sup>1</sup>, Gábor Bedics<sup>1</sup>, Dániel J. Erdélyi<sup>2</sup>, Judit Müller<sup>2</sup>, Krisztina Csanádi<sup>3</sup>, Gábor Ottóffy<sup>4</sup>, Lilla Tiszlavicz<sup>5</sup>, Ágnes Kelemen<sup>6</sup>, Gergely Kriván<sup>7</sup>, Csongor Kiss<sup>8</sup>, Csaba Bödör<sup>1</sup>, Gábor T. Kovács<sup>2</sup>, Donát Alpár<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> HCEMM-SU Molecular Oncohematology Research Group, Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup> 2<sup>nd</sup> Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup> Heim Pal National Pediatric Institute, Budapest, Hungary

<sup>4</sup> Department of Pediatrics, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>5</sup> Department of Pediatrics and Pediatric Health Care Center, University of Szeged, Szeged, Hungary

<sup>6</sup> Velkey László Child's Health Center, Borsod-Abaúj-Zemplén County Central Hospital and University Teaching Hospital, Miskolc, Hungary

<sup>7</sup> Pediatric Hematology and Stem Cell Transplantation Department, Central Hospital of Southern Pest, National Institute of Hematology and Infectious Diseases, Budapest, Hungary

<sup>8</sup> Institute of Pediatrics, University of Debrecen, Debrecen

**BACKGROUND:** Survival rates in some genetically defined subgroups of pediatric leukemia lag far behind the average. In this prospective study, we aimed to establish the deep genomic profiles of Hungarian patients with acute leukemia diagnosed between 2018 and 2021 to identify prognostically or therapeutically relevant alterations.

**METHODS:** Blast-rich diagnostic or relapse samples of 170 patients with ALL/LBL and 60 patients with AML/MDS were analyzed. Mutational profiling was completed with self-developed QIseq Targeted DNA Custom Panels, while targeted RNA sequencing was performed using the TruSight RNA Pan-Cancer Panel. Next-generation sequencing was conducted on Illumina MiSeq/NextSeq platforms at the Semmelweis University (Budapest).

**RESULTS:** Targeted mutation screening revealed 2.7 mutations per sample on average (range: 0-11). Strikingly, 18.6% of B-ALL patients harbored mutations in genes encoding actionable proteins including FLT3, JAK2, IL7R and CRLF2. In a multiple relapse case, we recognized a novel germline mutation in SH2B3 probably predisposing to ALL, which influenced the family donor selection before stem cell transplantation. Novel fusions involving JAK2, KMT2A, PAX5, NOTCH1 and RUNX1 were identified in 5.3% of patients, some of them affected disease prognosis. Rare, patient-specific fusion transcripts (e.g. KMT2A::MLLT3, DUSP22::IRF4) were utilized for measurable residual disease monitoring by individualized molecular assays. More identified alterations (e.g. NUP214::ABL1, FIP1L1::KIT, KITmut) enabled tyrosine kinase inhibitor use in lymphoid as well as myeloid leukemia.

**CONCLUSION:** Our clinical sequencing set-up deepens our understanding of the biology of indolent versus aggressive disease course and identifies patients eligible for genomics-driven targeted therapy.

**Funding:** Hungarian Pediatric Oncology Network, ÚNKP-22-4-I-SE-11, KDP-2020-1008491, NKFIH FK20-134253.

## **INFECTIONS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

**Klara Vranešević<sup>1</sup>, Jelena Roganović<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Clinical Hospital Center Rijeka, Rijeka, Croatia

**INTRODUCTION:** Infections are the most common and potentially life-threatening complications in children treated for acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Background:** The aim of the study was to evaluate epidemiology, clinical and microbiological characteristics, and outcome of infections in pediatric patients with ALL.

**METHODS:** Twenty-three ALL patients (16 boys and 7 girls, mean age 5.9 years) treated at the Division of Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, Clinical Hospital Centre Rijeka, Croatia, from 2016 to 2020 were included in the study.

**RESULTS:** We verified 104 infectious episodes (IE): 1 patient had 1 IE, 3 patients 2 IE, and 19 patients had  $\geq 3$  IE. IE were mostly observed during early intensification phase. Neutropenia was present in 46.2% IE, with longer duration ( $> 7$  days) in 58.3% episodes. Respiratory tract was the most common site (62.5%), followed by gastrointestinal tract (11.3%), skin and mucosal surfaces (10%), bloodstream (8.7%), and urinary tract (7.5%). There were 47.1% bacterial isolates, 3.8% viral and fungal respectively, 9.6% mixed, and in 35.6% IE pathogen was not identified. The most common empiric therapy were cephalosporins, followed by piperacillin/tazobactam. Modification of first-line antimicrobial therapy was required in 56.9% IE. Granulocyte colony stimulating factor was administered in 53.9% IE, and intravenous immunoglobulin in 62.5%. No infection-related death was observed.

**CONCLUSION:** Patients with ALL exhibit a high prevalence of IE. Close monitoring with identification of patients at risk, prompt administration of antibiotics in neutropenic patients with fever, and timely modifications of therapy play a crucial role in reducing infection-related morbidity and mortality.

## **STEROID-RELATED CARDIAC DISORDERS IN CHILDREN TREATED FOR ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND HODGKIN'S LYMPHOMA**

**Domagoj Buljan**<sup>1</sup>, **Izabela Kranjčec**<sup>1</sup>, **Nuša Matijašić Stjepović**<sup>1</sup>, **Gordana Jakovljević**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia*

<sup>2</sup> *Medical University of Osijek, Osijek, Croatia*

**BACKGROUND:** Induction and re-induction therapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) and Hodgkin's lymphoma (HL), among other therapeutics, include corticosteroids. Sinus tachycardia and hypertension are the two most common cardiovascular adverse events (CAE) of steroids, with incidence ranging from 15-45%.

**METHODS:** In order to establish the frequency of CAE at the Children's Hospital Zagreb, a retrospective chart review of patients aged 0-17 years, treated for ALL and HL during a 5-year period was performed. CAE were classified and graded according to the CTCAE v.5.0 system. Timing of the signs and symptoms, medications administered and outcome were recorded. Basic descriptive statistics was performed; differences between two groups were calculated using student t-test.

**RESULTS:** Among 38 children, steroid-induced tachycardia and hypertension were found in 55.3% and 39.5%, respectively. Fifty-five percent of patients fulfilled CTCAE grade 2 criteria. No significant difference in frequency was found regarding the type of steroids. No significant difference in frequency of CAE was found between ALL and HL group. Median time of presentation of symptoms was 4 weeks after the initiation of glucocorticoids. Forty percent of patients received antihypertensive therapy, most commonly angiotensin-converting enzyme inhibitor. Fifty-two percent of patients with tachycardia required propranolol treatment. After cessation of steroid therapy aforementioned CAE subsided.

**CONCLUSION:** Sinus tachycardia and hypertension were the most common CAE of glucocorticoids in our cohort of pediatric leukemia and lymphoma patients. Frequent cardiologic reassessment and prompt management are needed to avoid long-term effects.

## **TREATMENT RELATED MORTALITY IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA DURING TREATMENT WITH ALLIC PROTOCOLS, EXPERIENCE OF THE CROATIAN REFERRAL CENTER**

**Ernest Bilić**<sup>1,2</sup>, **Matej Jelić**<sup>1</sup>, **Maja Pavlović**<sup>1</sup>, **Lucija Mucavac**<sup>1</sup>, **Sara Dejanović Bekić**, **Toni Matić**<sup>1</sup>, **Zrinko Šalek**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Pediatrics, Division of Hematology and Oncology, University Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia*

<sup>2</sup> *University of Zagreb School of Medicine, Zagreb, Croatia*

Successes in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) are increasing. However, some patients die due to treatment related mortality (TRM). In this study, we analyzed TRM in children treated in the Division of Pediatric Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, University Hospital Centre Zagreb.

More than three hundred children with ALL were included, during 15-year period. All children were treated according ALLIC protocols (2002 and 2009). The main TRM reasons were infections. The most infectious causes of death were *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus*. Induction and reinduction phases, especially during de-escalation of corticosteroids, have been the most critical parts of the treatment.

With better monitoring, frequent taking of surveillance microbiological samples, and timely initiation of antibiotic therapy, infectious complications can be reduced.

## **ASPARAGINASE TREATMENT - ITS TOXICITY AND ACTIVITY: SINGLE CENTER EXPERIENCE**

**Jelena Lazic<sup>1,2</sup>, Predrag Rodic<sup>1,2</sup>, Srdja Jankovic<sup>1</sup>, Dejan Skoric<sup>1,2</sup>, Nada Krstovski<sup>1,2</sup>, Goran Milosevic<sup>1,2</sup>, Milica Vukovic<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Department for hematology and oncology, University Children`s Hospital, Belgrade, Serbia*

<sup>2</sup> *Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia*

<sup>3</sup> *Institute for neonatology, Belgrade Serbia*

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood and since the asparaginase (ASP) was introduced to the pediatric treatment protocols in the 1970s, survival rates in children have progressively risen to nearly 90%. Study enrolled 172 consecutive patients with ALL and lymphoblastic lymphoma (LBL), diagnosed from April 2010 until September 2022, age range from 9 days to 18.3 years, median 5 years, out of whom 101 boys (58%), ALL was diagnosed in 166 and LBL in 6 patients. Native ASP was administered to the first 133 patients and due to drug shortage (from May 2020), next 9 patients were switched to pegylated ASP (PEG-ASP), one patient was switched from Erwinase to PEG-ASP and 29 patients received PEG-ASP. In total, 2315 doses of different ASP products were administered. ASP toxicity experienced 69 (40.1%) patients, counting 120 events. Events occurred, on average on 26.6 dose. Toxicity was the highest during induction phase (41, 47%), especially in augmented arm (18, 21%), following by consolidation for high-risk patients (18, 21%) and reinduction (10, 12%). Coagulation disorders were seen in 44 patients/83 events (25.6%/68%), allergic reactions experienced 21 children (12.2%/17.5%), liver toxicity 12 (10%/7%) and four developed pancreatitis (3.3%/2.3%). Activity was measured after 330 exposures and 235 (71.2%) had satisfactory levels (>100 IU/ml). Due to allergic reaction, 20 patients were switch from ASP/PEG-ASP to Erwinase, as well as one patient with silent inactivation. ASP is potent agent, with acceptable rate of mostly moderate toxic events in children with ALL and LBL.

## **CEREBROSPINAL FLUID ANALYSIS IN ALL: CYTOSPIN AND FLOW CYTOMETRY. RETROSPECTIVE STUDY AND RESEARCH INITIATIVE.**

**Katalin Mudra<sup>1</sup>, Dániel Erdélyi<sup>1</sup>, Dániel Maszárovics<sup>1</sup>, Lisa Gaglewski<sup>1</sup>, Laura Almási<sup>1</sup>, Imre Rényi<sup>1</sup>, Gábor Barna<sup>1</sup>,**

<sup>1</sup> *2<sup>nd</sup> Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

<sup>2</sup> *Department of Pathology, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

BACKGROUND: Cerebrospinal fluid (CSF) diagnostics in ALL is poorly standardized and strongly debated. A recent international consensus statement set the cytospin analysis as standard but did not define practical details. Different ALL study groups vary in their CSF analytic methods and their CNS staging definitions. In our department, diagnostics was traditionally based only on cytospins prepared from 50 ul CSF. We had

a much lower CNS2 rate than some data in the literature. Recently, we've added CSF flow cytometry to our routine practice. Later, we tested cytopsin preparations derived from larger volume CSF (centrifuged from 500 µl CSF).

**METHODS:** A retrospective analysis was performed to compare the reports of 50 µl cytopsin, 500 µl cytopsin and 2 ml flow cytometry CSF analyses at our department.

**RESULTS:** Our recently extended CSF testing methods provided an approximately 4 to 12 times higher positivity rate compared to our traditional small volume cytopsin. A review on published studies comparing the sensitivity and specificity of CSF cytopsin and CSF flow cytometry testing and this issue's prognostic relevance will also be presented.

**CONCLUSION:** To address the ongoing debate within the ALL-IC community, we are planning a prospective trial to compare results of CSF tests: local evaluation of large volume cytopsin, central evaluation of large volume cytopsin and central evaluation of flow cytometry (from samples transferred in a stabilising solution). This is a call, we are looking for cooperating partners to join our initiative.

## **THE NEED FOR STANDARDIZATION IN METHODS USED FOR RISK STRATIFICATION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM INVOLVEMENT IN CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA - AN INTERNATIONAL SURVEY PROJECT**

**Laura Almási, Dániel Erdélyi**

*2<sup>nd</sup> Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

**BACKGROUND:** The assessment of central nervous system (CNS) involvement in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is not standardized yet. Currently, definitions and methods are heterogeneously applied. Our aim was to assess present-day practices worldwide.

**METHODS:** We established a survey to examine the diagnostic methods currently in use and their local implementation in practice. We asked for one answer per center as follows: answers from 3 centers per country with population over 40 million; 2 centers with 10-40 million; and 1 center for countries less than 10 million. Within each country, we asked to equally share requests among the largest university departments, middle size centers and small countryside units. Main sections of the survey assessed currently used tools (manual cell counting, automated cell counting, cytopsin and flow cytometry); lumbar puncture and other questions (e.g., the number of patients with different CNS stages in a two-year period). Within each section, technical details were explored.

**RESULTS:** A total of 58 institutions out of 32 countries responded to the survey. The data collected shows that the selection of methods applied, the technical details of the methods, cut off values, definitions, and CNS staging varied widely worldwide, even among centers within a given country.

**CONCLUSION:** The survey demonstrates that there is a wide variation in CNS ALL diagnostics. There is an urgent need to optimize practices and reach an international consensus.

## **INTERMITTENT LORLATINIB DOSING IN RELAPSED/REFRACTORY ALCL PROVIDES RAPID AND DURABLE RESPONSES. FREQUENT MRD MEASUREMENT SUGGESTS DRUG-DRIVEN DEPENDENCY DEPRIVATION MECHANISM**

**Jaroslav Sterba**

*University Hospital Brno, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic*

**BACKGROUND:** Despite the use of intensive chemotherapy approaches, about 1/3 of children with ALCL will experience a relapse. Here, multiple therapeutic strategies exist. Success of ALK inhibitors in other cancer types led to early use of TKIs in patients with ALK gene rearrangement positive ALCL.

**OBJECTIVES:** Inhibition of ALK gene rearrangements represents a promising therapy for ALK+ ALCL. In-

termittent dosing of TKI as means to prevent drug resistance has been previously explored in the past, however different mechanisms of resistance in various malignancies need to be considered.

**METHODS:** For ALK+ ALCL, upregulated ALK signaling may lead to a resistance to continuous TKI administration. After TKI withdrawal, increased ALK signaling may results in cell death, with prolonged disease control, compared to continuous dosing. In relapsed/refractory ALCL the best treatment is not defined, we commenced intermittent lorlatinib treatment with frequent MRD monitoring. We present 2 children with relapsed disease shortly after intensive chemo-immunotherapy as per ANHL12P1 with anti CD30 antibody and were successfully treated using lorlatinib, intermittent dosing.

**RESULTS:** Frequent MRD monitoring was available for one patient and revealed that the most significant drop of MRD was repeatedly caused by interruptions of lorlatinib treatment. Intermittent dosing seems to be a very effective approach in ALK fusion-positive ALCL.

**CONCLUSION:** Using this strategy, we were able to achieve 2nd EFS several times longer, then the 1st EFS achieved by intensive contemporary chemo-immunotherapy. Accepted in JCO Precision oncology.

## **THE JOURNEY TO ESTABLISH A CENTRALIZED, NATIONWIDE PEDIATRIC CANCER BIOBANK IN HUNGARY**

**Eszter Tuboly<sup>1</sup>, Petra Varga<sup>2</sup>, Dániel Erdélyi<sup>1,3</sup>, Gábor Kovács<sup>1,3</sup>, Gergely Kriván<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup> *Hungarian Pediatric Oncology Network, Hungary*

<sup>2</sup> *Heim Pál Children's Hospital, Budapest, Hungary*

<sup>3</sup> *2<sup>nd</sup> Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary*

<sup>4</sup> *Pediatric Bone Marrow Transplantation Department, South-Pest Centrum Hospital, Budapest, Hungary*

**BACKGROUND:** The Hungarian Pediatric Oncology Network was established in 1973 to provide centralized care and population-based registration for all childhood cancer cases across the country. Several high-impact international collaborations and the establishment of a well-traceable Register have rolled out of this alliance, and the next milestone is setting up a modern, centralized Biobank.

**METHODS:** After pre-defining the biobank scopes and the main work packages, a budget estimate and a timeline were proposed for the first year of the project.

**RESULTS:** Infrastructure planning (including equipment and IT), quality assurance system development, regulatory compliance, and completing the required authority approval processes have ensued during the first stage. Additionally, significant efforts were made to harmonize sample collection, sample handling, and interim storage workflows at all eight clinical centers of the Network. The second stage consisted of the procurement of collection and monitoring tools and the entire apparatus required in the Biobank. What is more, a Biobank Information Management Software development has been kickstarted which will be a unique tool to connect the Registry and the biobank dataset and maximize the use and transparency of the Biobank.

**CONCLUSION:** Since its inauguration, the focus has switched to networking on both the national and international level, and the presence of the Biobank in the international biobanking community (BBMRI-ERIC, International Society for Biological and Environmental Repositories). A dedicated website of the Biobank has recently been released to represent our commitment to ethical and high-quality pediatric biobanking with a special emphasis on participant and public engagement.

## **BRAIN TUMOURS IN CHILDREN - EXPERIENCES OF THE CLINICAL HOSPITAL CENTRE RIJEKA**

**Lucija Ružman<sup>1,3</sup>, Senada Šerifi<sup>1,3</sup>, Igor Prpić<sup>2,3</sup>, Jelena Roganović<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> *Division of Pediatric Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, Clinical Hospital Center Rijeka, Rijeka, Croatia*

<sup>2</sup> *Division of Child Neurology and Child Psychiatry, Department of Pediatrics, Clinical Hospital Center Rijeka, Rijeka, Croatia*

<sup>3</sup> *University of Rijeka, School of Medicine Rijeka, Rijeka, Croatia*

**BACKGROUND:** Pediatric brain tumours include a heterogeneous group of diseases with different origin, histological type, clinical presentation, treatment and prognosis.

**METHODS:** A retrospective analysis of medical records of 45 children (30 girls and 15 boys) diagnosed with brain tumour in Clinical Hospital Centre Rijeka from May 2011 to August 2021 was done.

**RESULTS:** The mean age at the time of diagnosis was 13.3 years (range 2 months - 17 years). The most common clinical presentation was headache (58.5%), followed by neurological deficit (48.8%), vomiting (36.6%), seizures (26.8%) and deeply impaired consciousness (8.9%). The mean duration of symptoms was 11.5 weeks (range 1 day - 5.5 months). Tumour location was supratentorial in 53.3% of cases. The benign to malignant ratio was 3:2. The main histological tumour types were low-grade astrocytoma (26.8%), medulloblastoma (22.3%), and ependymoma (8.9%). Surgical resection was performed in 37 (82%) of patients (total 22 and subtotal 15 resections). One patient received cranial radiotherapy, 6 patients chemotherapy, and 11 patients received chemoradiotherapy. A conservative approach was applied in 7 patients. Thirty (66.6%) patients are in remission, 3 are currently treated, and 4 children had a fatal outcome (8.9%). The average duration of follow-up is 90 months (range 6 to 114 months).

**CONCLUSION:** Due to unspecific symptoms, complexity of the treatment and high morbidity, multidisciplinary approach is mandatory to improve outcomes in this challenging group of patients.

## **GENOME PROFILING OF TUMOR DNA WITH NEXT-GENERATION SEQUENCING IN PAEDIATRIC HIGH-RISK PATIENTS – OUR EXPERIENCE**

**Aleksandra Bonevski<sup>1</sup>, Filip Jadrijević-Cvrlje<sup>1</sup>, Jasminka Stepan Giljević<sup>1</sup>, Maja Pavlović<sup>1</sup>, Nada Rajačić<sup>1</sup>,  
Monika Ulamec<sup>2</sup>, Sven Seiwerth<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia*

<sup>2</sup> *Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Zagreb, Croatia*

**BACKGROUND:** comprehensive genome profiling (CGP), a next-generation sequencing approach is becoming an indispensable method in oncology practice due to high-risk patients who can not be cured only with standard multimodal therapy. Molecular targeted therapy is already a gold standard for first –line treatment in advanced or metastatic non-small cell lung cancer, in melanoma and in gastrointestinal stromal tumor.

**METHODS:** we performed retrospective cross-sectional analysis of tumor specimens for 67 patients (28 females, 39 males, age:1-24) diagnosed with childhood malignant tumors and treated in Children's Hospital Zagreb from March 2019 to Aug 2022. 14 patients were initially diagnosed as metastatic, 39 had disease progression and 14 patients had refractory or inoperable disease. CGP analysis of tumor DNA was done through FoundationOneHeme and FoundationOneCDx.

**RESULTS:** Out of 67 analysed tumor specimens, genomic alterations were found in 41 patients (6 failed) with a possibility for a targeted therapy (clinically relevant) in 24 patients. In 19 patients targeted therapy was applied. Microsatellite status was found stable in 61 patients. Tumor mutational burden (TMB) was low except in 2 patients who had high burden of 10 and 12Muts/mb.

**CONCLUSION:** Introducing genome profiling as a promising tool in paediatric oncology can give us a possibility of combining targeted therapies according to genomic alterations along with other therapeutic modalities. Having in mind that molecular targeted therapy is already a gold standard in some malignant tumors, we can only hope that the similar approach can be used in paediatric oncology patients with significant results.

## DEEP VEIN THROMBOSIS IN CHILDREN WITH MALIGNANT DISEASES

Marta Despotović<sup>1</sup>, Jelena Roganović<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Clinical Hospital Center Rijeka, Rijeka, Croatia

**BACKGROUND:** Deep venous thrombosis (DVT) is increasingly being diagnosed in children with malignancies. The etiology is multifactorial and includes congenital and acquired prothrombotic factors. The aim of the study was to investigate prothrombotic risk factors, localization, therapeutic approach, and complications of DVT and antithrombotic therapy in children with malignant diseases, and to compare the obtained results with available literature.

**METHODS:** Eight oncology patients (5 boys and 3 girls) with DVT treated at the Department of Pediatrics, Clinical Hospital Center Rijeka, Croatia, between January 1, 2006, and December 31, 2021, were included in the study. All patients had implanted central venous catheters (CVC).

**RESULTS:** The mean age was 10.4 years (range 3 months – 17.5 years). DVT was the most frequent in children with acute lymphoblastic leukemia. The most common risk factors for DVT were the presence of CVC (100% of patients), blood group A and/or B (75%), congenital thrombophilia (62.5%), concomitant use of multiple prothrombotic drugs (62.5%), and age over 10 years (50%). Four (50%) patients had CVC-related thrombosis. The therapy of choice was low molecular weight heparin (LMWH), with achieved complete venous recanalization in 75% of patients. In 2 cases of therapeutic failure, mechanical thrombectomy was performed. Two patients had postthrombotic syndrome, and recurrent thrombosis was observed in 2 patients.

**CONCLUSION:** Treatment-related outcomes, treatment adverse effects, and postthrombotic complications in our study are consistent with published data. Given an increased risk and the multifactorial etiology of DVT in children with malignant diseases, individual and careful assessment for risk factors, and timely diagnosis and intervention are essential.

## TRAMETINIB - "QUALITY-OF-LIFE-IMPROVEMENT" DRUG FOR PEDIATRIC PATIENTS WITH NEUROFIBROMATOSIS TYPE 1

Domagoj Buljan, Filip Jadrijević-Cvrlje, Nada Rajačić, Aleksandra Bonevski, Maja Pavlović, Jasminka Stepan Giljević

Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

**BACKGROUND:** Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant disorder of the central and peripheral nervous system caused by mutations in the NF1 gene. Trametinib, an orally available MEK inhibitor (MEKi) showed promising results in keeping the disease in a "steady state". In vitro studies showed that trametinib decreases cell proliferation and induces apoptosis.

**METHODS:** Medical records of patients with NF1 treated with trametinib at the Children's Hospital Zagreb were recorded. Data were collected retrospectively. Descriptive statistics were performed. Age at tumor diagnosis, type of tumor, presence of plexiform neurofibroma, treatment prior to trametinib, trametinib treatment duration, progression/regression of tumor and trametinib side effects were recorded.

**RESULTS:** We report on 6 patients with NF1 treated with trametinib. Subjects were 17 months to 11 years old at the time of tumor diagnosis, most commonly optic gliomas. Four of six were male. Four patients were treated according to low-grade-glioma chemotherapy protocol prior to trametinib. Two patients suffering from plexiform neurofibroma experienced severe pain prior to MEKi. Median time of trametinib treatment duration was 20 months. Half of the patients develop acneiform dermatitis as a side effect of trametinib treatment. None of them experienced regression of the tumor, but 4/6 had no progression.

**CONCLUSION:** Trametinib may, with its acceptable side effects, provide an attractive option for otherwise refractory pediatric low-grade gliomas in NF1 and inoperable plexiform neurofibromas. Achieving stability of the disease and thus reducing the pain that these patients often suffer from, results in an overall improvement in quality of life.

## **NEW PERSPECTIVES IN MANAGEMENT OF PEDIATRIC PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM TUMORS**

**Edit Brückner<sup>1</sup>, Csaba Bödör<sup>2</sup>, Gábor Bedics<sup>2</sup>, Bálint Scheich<sup>2</sup>, Krisztina Míta Gábor<sup>3</sup>, Miklós Garami<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> 2<sup>nd</sup> Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup> Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>3</sup> Department of Pediatrics and Pediatric Health Care Center, Faculty of Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary

**BACKGROUND:** Primary central nervous system (CNS) tumors are the most common solid malignancies in pediatric population. However, the survival rate improved radically the last 70 years, the treatment of CNS tumors is still a challenge for the oncologists, especially in the high-grade glioma and relapsed patients. The next generation sequencing based targeted therapy may provide a new perspective in the treatment of childhood central nervous system tumors.

**METHODS:** Tumor material samples of fifty patients diagnosed (2000-2022) with primary CNS tumors were investigated using an NGS-based CGP assay (Illumina TruSight Oncology 500 High Throughput assay). Based on the detected genetic variation targeted therapy was initiated or supplemented with previously applied anticancer treatment.

**RESULTS:** With the NGS-based molecular genetic profiling we confirmed new genetic variations lead to pediatric CNS cancer growing in two patients which were yet unknown in the literature. Results, which also influence our daily oncological practice: 1. A HER2 inhibitor therapy was initiated for a relapsed medulloblastoma patient at our institute first in Hungary. 2. We started targeted treatment based on a PIK3CA mutation for a patient with recurrent inoperable craniopharyngioma. 3. The survival time of brainstem high-grade glioma patients was extended up to one year.

**CONCLUSION:** Despite the multimodal oncological treatment strategies, the prognosis of childhood CNS tumors, especially high-grade gliomas and refractory malignancies remains poor. Based on our results achieved with cytostatic treatment supplemented with NGS-based targeted therapy, it is possible to extend the survival time with an adequate quality of life.

## **CHILDREN WITH VERY RARE TUMORS – HOW TO OPTIMALLY DIAGNOSE AND TREAT ALL OF THEM?**

**Ewa Bien**

*Department of Pediatrics, Hematology and Oncology, Medical University of Gdansk, Gdańsk, Poland*

Childhood tumors are rare, comprising only 0,9% of neoplasms of the whole population. However, among childhood malignancies there is a group of solid tumors that are exceptionally rare (very rare tumors, VRT). Most of them occur with incidence 15 years of age. Moreover, these cancers appear to be the most common group of malignancies among teenagers and young adults. The study presents recent European efforts to optimize the diagnostics and therapy of VRT in children. International support and cooperation, exchange of knowledge and experience, and active including representatives of various European countries in mutual projects on VRT are crucial for improving the prognosis in pediatric VRT.

## **KAPOSIFORM HAEMANGIOENDOTHELIOMA (KHE) – A RARE, LOCALLY AGGRESSIVE VASCULAR TUMOR WHICH NEEDS PROPER TREATMENT ON BEHALF OF POLISH SOCIETY OF PEDIATRIC ONCOLOGY AND HEMATOLOGY**

**Malgorzata A. Krawczyk, Anna Klosowska, Anna Gabrych, Aleksandra Kaczorowska, Malgorzata Styczewska, Ninela Irga-Jaworska, Ewa Bien,**

*Department of Pediatrics, Hematology and Oncology, Medical University of Gdansk, Gdańsk, Poland*

**BACKGROUND:** Kaposiform hemangioendothelioma (KHE) is a rare, locally aggressive vascular tumor, affecting mainly infants and showing signs of Kasabach-Meritt syndrome (KMS), manifested by consumptive coagulopathy and thrombocytopenia.

**OBJECTIVE:** To analyze clinical manifestations, therapies and outcomes in children with KHE treated in Poland between 2007 and 2021.

**MATERIAL AND METHODS:** Clinical data of 26 children with KHE were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** Patients' median age at diagnosis was 2.75 months. Life-threatening KMS was diagnosed in 19 children (73,1%). In 12/26 children (46%), KHE tumors were large and involved upper limb, upper chest and/or lower neck. In 18/21 (85,7%) patients, diagnosed 2008-2018, the first-line treatment included chemotherapy and/or systemic corticosteroids (GCS). In 8 children, antiplatelet drugs were added. Two children received radiotherapy: at diagnosis of KHE of the hand and after ineffective chemotherapy (KHE of the orbit). One child with KHE without KMS was successfully treated with surgery only. In 3/5 children, diagnosed after 2018, sirolimus with or without GCS was started immediately after diagnosis with good efficacy and tolerance. 1 child received sirolimus after 6 doses of vincristine, 1 child underwent sclerotherapies and surgeries in spite of KMS. Eight patients, who developed KHE recurrence/progression after 2011, were successfully treated with sirolimus.

**CONCLUSIONS:** Diagnosis and therapy of KHE in children are often a challenging problem, since no unified guidelines exist. In order to optimize the current therapies of pediatric KHE in Poland, the Vascular Anomalies in Children Section was established within the Polish Society of Pediatric Oncology and Hematology in 2021.

## **THE ROLE OF PHOTOBIMODULATION IN PREVENTION AND TREATMENT OF CHEMOTHERAPY – INDUCED ORAL MUCOSITIS IN PEDIATRIC POPULATION**

**Daša Hafner, Petra Hrast, Maruša Krmelj, Tanja Tomažević, Janez Jazbec, Lidija Kitanovski, Marko Kavčič**

*Division of oncology and hematology, Department of Pediatrics, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia*

*University of Ljubljana, Faculty of Medicine, Ljubljana, Slovenia*

**BACKGROUND:** Oral mucositis (OM) is a frequent and debilitating complication of chemotherapy (CT) treatment in oncology patients and is often associated with comorbid events. Photobiomodulation (PBM) with low-level laser light accelerates oral mucosal healing by its biomodulatory and analgesic effects and is already a well-established treatment modality for OM. Nevertheless, its potential role in OM prevention is not clearly defined.

**METHODS:** In a prospective study we enrolled children and adolescents with a diagnosis of cancer receiving chemotherapy. For each, we identified comparable cycles in the CT protocol and randomised them into test and control cycle groups. In the test groups, we performed prophylactic PBM of the oral mucosa before chemotherapy and then compared them to control groups where no PBM was performed. The degree of OM was assessed using the WHO scale, and pain by using visual analogue scale (VAS).

**RESULTS:** The study was completed by 27 children who received a total of 107 cycles of CT. 56 cycles were test cycles (prophylactic PBM) and 51 cycles were control cycles (monitored). We detected 36 episodes of OM, 10 episodes (28%) after test cycles and 26 episodes (72%) after control cycles. The difference in the incidence of OM is statistically significant ( $p = 0.004$ ). Without prophylactic PBM, children have a 9-fold (95% CI: 2.44-32.82) higher odds of OM at control per number of comparable cycles ( $p = 0.077$ ).

**CONCLUSIONS:** In children treated with CT, the use of prophylactic PBM is associated with a lower incidence of OM in comparable treatment cycles.

## ACUTE GASTROINTESTINAL TOXICITIES FOLLOWING ABDOMINAL AND/OR PELVIC RADIOTHERAPY IN CHILDREN TREATED FOR SOLID TUMORS

Maja Pavlović<sup>1</sup>, Izabela Kranjčec<sup>1</sup>, Nuša Matijašić Stjepović<sup>1</sup>, Domagoj Buljan<sup>1</sup>, Aleksandra Bonevski<sup>1</sup>, Toni Krnić<sup>2</sup>, Jasminka Stepan Giljević<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Oncology and Hematology, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Department of Radiotherapy and Oncology, Clinic for tumors, University Hospital Center "Sestre milosrdnice", Zagreb, Croatia

**BACKGROUND:** Abdominal irradiation is frequently unavoidable part of standard treatment for solid tumors in children that is associated with numerous short-term adverse effects which need to be recognized and managed promptly to avoid long-term sequelae.

**METHODS:** A retrospective observational study of the most common gastrointestinal toxicities (GI) following abdominal and/or pelvic radiotherapy was conducted at the Children's Hospital Zagreb. Medical records of pediatric patients treated for solid tumors in the period 2019-2022 were reviewed for demographic (age, gender) and clinical (diagnosis, initial presentation/relapse, stage, treatment phase, previous abdominal surgical procedures, cumulative irradiation dose and GI toxicities) data. Abdominal side effects were classified and graded according to CTCAE 5.0 version (2017).

**RESULTS:** Twelve children (8 male, mean 7,5 years, range 4-17) were evaluated. The most common diagnosis was advanced stage neuroblastoma (41,7%). Irradiation was performed mainly as a part of initial treatment (66,7%), following abdominal surgery in 83,3%, with a mean cumulative dose of 31,75 Gy. Diarrhea and nausea/vomiting of low grade (1-2) were the most frequently and equally reported toxicities (41,7%). One serious case of enterocolitis (grade 3/4) warranted prolonged multimodal therapy (corticosteroids, enteral nutrition, antibiotics), while all other spontaneously resolved with minimal symptomatic intervention.

**CONCLUSION:** Our experience shows that GI toxicities following radiotherapy are mild and easily manageable in pediatric patients with solid tumors, bearing in mind small patient number, varying radiation field size and significant difference in irradiation dosage which directly correlate to occurrence and intensity of adverse events.

## DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CHRONIC THROMBOCYTOPENIA IN CHILDHOOD

Bernadett Hon-Balla<sup>1</sup>, Diána Giczi<sup>2</sup>, Dániel Erdélyi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Venereology and Dermato-oncology, Department of Dermatology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup> 2<sup>nd</sup> Department of Paediatrics, Semmelweis University, Budapest, Hungary

**BACKGROUND:** Immune thrombocytopenia (ITP) is a common haematological disorder of childhood. Thrombocytopenia (platelet count <100 G/L) beyond 6 months is defined as chronic ITP and it is a diagnosis of exclusion. If the platelet count <10 G/L, life-threatening bleeding can occur. Rare genetic and autoimmune disorders can be responsible for the pathogenesis. Therefore, children are often initially misdiagnosed.

**METHODS:** Inclusion criteria were set as platelet count <100 G/L for at least 6 months, between 2016-2019, diagnosed under 18 years of age, excluding those diagnosed with malignancies. The data was collected from medical notes

**RESULTS:** Out of the 104 patients, 47 were female and 57 were male. 87 were considered chronic ITP and 17 were identified with a different disorder: myelodysplastic syndrome (3), Evans syndrome (2), Wiskott-Aldrich syndrome (2), lupus/antiphospholipid syndrome (1), Bernard-Soulier syndrome (1), Fanconi anaemia (1), Hermansky-Pudlak syndrome (1), congenital osteopetrosis (1), paroxysmal nocturnal haematuria (1), common variable immunodeficiency (1), type 3 Gaucher's disease (1), portal cavernoma (1) and ductal plate malformation (1). The median age at diagnosis was 7, with 5 children presenting at birth. The median platelet count at diagnosis was 26 G/L and the median lowest was 10 G/L. Minor bleeding was

most prevalent and 24 had major bleeding: mucosal bleeding (17), haematochezia (4), menorrhagia (2), and intracranial bleeding (1).

**CONCLUSION:** Children with chronic thrombocytopenia have a long course of disease before the correct diagnosis is established. Based on the literature review and the research findings, a differential diagnostic algorithm and a checklist were developed.

## **MUTATION V617F JAK2 GENE IN THE DIAGNOSTIC CONFIRMATION OF POLYCYTHEMIA AND BUDD CHIARI SYNDROME**

**Lejla Hodžić-Pilav, Meliha Sakić, Sanela Čekić-Hajdarpašić, Nermana Čengiđ-Šehaganović**

*Pediatric Clinic, University Clinical Center Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Hercegovina*

**BACKGROUND:** Budd-Chiari syndrome is caused by hepatic vein thrombosis, followed by: abdominal pain, ascites and hepatomegaly. It also occurs as a complication of polycythemia vera, myeloproliferative disease, and the consequent hyperviscosity of the blood, which leads to risk of thrombotic events. Polycythemia vera (PV) is a tumor disease of the bone marrow, characterized by elevated erythrocyte counts, elevated hemoglobin values. If polycythemia vera is suspected, genetic testing for the presence of the JAK2 V617F mutation from a peripheral blood sample is mandatory. Aim: To present the link between JAK 2 mutations, polycythemia and Budd Chiari syndrome.

**MATERIAL AND METHODS:** A case report of a patient admitted with suspected hepatic vein thrombosis and Budd Chiari sy. By finding a mutation in the JAK2 protein, we confirm that polycythemia is causally related to Budd Chiari syndrome.

**RESULTS:** Patient P.A., 2003, admitted on suspicion of Budd Chiari syndrome, with ascites and hepatosplenomegaly. Malignant process excluded. Blood smear, sternal puncture finds neat. Mutated heterozygote of Factor V Leiden. Clinical: ascites, pleural and pericardial effusion, hypoproteinemia, mineral imbalance- correction, ascites drainage. Imaging diagnostic tests focus on the problems of the gastrointestinal tract - EGDS, distal endoscopy, liver biopsy, MRI enterography. PET CT indicates increased metabolic activity of the bone marrow, which brings us back to the hematological problem. In lab increased values of blood elements. JAK2 protein mutation positive.

**CONCLUSION:** A finding of the JAK2 protein mutation is evidence of polycythemia, which causally leads to hepatic vein thrombosis and the development of Budd Chiari syndrome.

## **THALASSEMIA IN CHILDREN: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE**

**Ana Đorđević<sup>1</sup>, Anita Maletić<sup>2</sup>, Jelena Roganović<sup>2,3</sup>, Ines Mrakovčić Šutić<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Jadran Galenski Laboratorij, Rijeka, Croatia*

<sup>2</sup>*Clinical Hospital Centre Rijeka, Rijeka, Croatia*

<sup>3</sup>*Faculty of Medicine Rijeka, University of Rijeka, Rijeka, Croatia*

**BACKGROUND:** Thalassemia syndromes are a group of inherited hemolytic anemias characterized by a disorder in the synthesis of one or more hemoglobin polypeptide chains, resulting from variations in the genes for these chains. Clinical manifestations are diverse, ranging from asymptomatic disease to severe multisystemic forms, which can be fatal in utero or in early childhood if untreated. The aim of the study was to investigate the importance of hematological and biochemical variables in the diagnosis of thalassemia in children.

**METHODS:** Forty-six children (25 boys and 21 girls), with thalassemia, aged from 1 year to 16,5 years, observed at the Department of Pediatrics, Clinical Hospital Center Rijeka, Croatia, were included in the study.

**RESULTS:** All children had thalassemia minor. The family history was positive in 32 (69.5%) of patients. All children had a mild decrease of hemoglobin level, in mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin, and elevated red cell distribution width, compared to age-matched healthy children. Periph-

eral blood smear revealed microcytosis, anisocytosis and hypochromia in the majority of patients, and more rarely basophilic stippling and target cells. Hemoglobin electrophoresis revealed  $\delta\beta$ -thalassemia in the majority of patients, followed by  $\beta$ -thalassemia.

**CONCLUSION:** A peripheral blood smear provides valuable information of the red blood cell morphology. Hemoglobin electrophoresis is a simple and useful procedure for the diagnosis of thalassemia. Molecular diagnosis of thalassemia allows definitive diagnosis and optimal therapeutic approach from an early age.

## **THROMBOCYTOPENIA IN ACUTE INFECTIONS: DEGREE OF THROMBOCYTOPENIA IN RELATION TO THE CAUSE OF ACUTE INFECTION**

**Senka Ižaković, Marijana Arambašić, Nora Pušeljić, Ema Poznić, Marta Bolješić, Ivana Serdarušić, Paula Ivanšić**  
*Pediatric Clinic, Clinical Hospital Centre Osijek, Osijek, Croatia*

**BACKGROUND:** Thrombocytopenia is a condition that occurs when the platelet count is below  $150 \times 10^9/L$ . It is a common finding during acute viral infections, especially in combination with lymphopenia. The underlying pathophysiological mechanism is platelet depletion due to inflammation-induced coagulation, sequestration from the circulation via phagocytosis or hypersplenism, and impaired platelet production due to defective megakaryopoiesis or cytokine-induced myelosuppression. We grade the severity of thrombocytopenia into four degrees: very severe thrombocytopenia ( $<10$ ), severe thrombocytopenia (10-30), moderate (30-50), and mild thrombocytopenia (50-150).

**METHODS:** The research was conducted as a retrospective study on all children hospitalized at the Department of hematology and oncology, Clinic for Pediatrics, Clinical Hospital Centre (KBC) Osijek from 2017 to 2021 because of thrombocytopenia that requires treatment.

**RESULTS:** A total of 110 patients were treated over a five-year period who were hospitalized at the Pediatric Clinic, KBC Osijek due to thrombocytopenia. As a cause of thrombocytopenia, 44 of them had an acute infection, which is a prevalence of 40 % with a 95 % C.I. 30.78 % to 49.78 %. The largest proportion of patients developed mild thrombocytopenia in the course of an acute respiratory infection, but there was no statistically significant difference in the degree of thrombocytopenia concerning the site of the acute infection.

**CONCLUSION:** There are no statistically significant differences in the degree of thrombocytopenia between gastrointestinal and respiratory infections as the cause of the same.

## **PLATELET COUNT AT THE ONSET OF PETECHIAE, A RETROSPECTIVE STUDY**

**Marijana Arambašić<sup>1</sup>, Senka Ižaković<sup>1</sup>, Ema Poznić<sup>1</sup>, Nora Pušeljić<sup>1</sup>, Marta Bolješić<sup>2</sup>, Paula Ivanšić<sup>1</sup>, Ivana Serdarušić<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Pediatric Clinic, Clinical Hospital Centre Osijek, Osijek, Croatia*

<sup>2</sup>*The Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia*

**BACKGROUND:** Thrombocytopenia is a condition that occurs when the platelet count is below  $150 \times 10^9/L$ . Clinical manifestations of thrombocytopenia usually include petechiae, hematomas, and epistaxis. In the literature, described so far, petechiae are usually associated with a platelet count of less than  $20 \times 10^9/L$ .

**METHODS:** The research was conducted as a retrospective study on all children hospitalized at the Department of hematology and oncology, Clinic for Pediatrics, Clinical Hospital Center (KBC) Osijek from 2017 to 2021 because of thrombocytopenia that requires treatment.

**RESULTS:** A total of 110 patients were treated for over five years period while they were hospitalized at the Pediatric Clinic, KBC Osijek due to thrombocytopenia. At the time of hospitalization, 43 patients had petechiae, which is a prevalence of 39.1 % with 95 % C.I. 29.93 % to 48.86 %. The average value of platelet count at the time when petechiae were detected by clinical examination is  $55.23 \pm 48.73 \times 10^9/L$ . The me-

dian platelet level at the time of visible petechiae was 56 (9 - 90).

**CONCLUSION:** The platelet count at which petechiae were observed by clinical examination is higher than the previously described level ( $20 \times 10^9/L$ ).

## NEUTROPENIA IN CHILDREN: A SINGLE-CENTER EXPERIENCE

**Martina Zubović<sup>1</sup>, Silvije Šegulja<sup>2</sup>, Nikolina Nadarević<sup>3</sup>, Jelena Roganović<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

<sup>2</sup> Faculty of Health Sciences, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Clinical Hospital Center Rijeka, Rijeka, Croatia

**BACKGROUND:** Neutropenia is frequently observed in pediatric practice. The aim of the study was to characterize demographic features, course, and outcome of neutropenia in children.

**METHODS:** A retrospective review of 57 children (30 boys and 27 girls) with neutropenia who were admitted at the Division of Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, Clinical Hospital Centre Rijeka, Croatia, during a 10-year period (2012-2021) was performed. Oncology patients with febrile neutropenia were excluded from the study.

**RESULTS:** The mean age was 20.2 months (range 15 days – 12.5 years). Three (5.3%) patients had mild neutropenia, 14 (24.6%) patients moderate, and 40 (70.1%) patients had severe neutropenia. The mean absolute neutrophil count (ANC) at admission was  $507/\mu L$  (range 0 – 1410). Chronic neutropenia (lasting > 3 months) was present in 50 (87.7%) patients. Twenty (40%) patients had autoimmune neutropenia, 9 (15.8%) postinfectious, and 1 patient (1.7%) each had neonatal alloimmune, neonatal autoimmune and congenital neutropenia. A specific diagnosis was not established in 25 (45.6%) children. Infections were recorded in 14 (24.5%) children. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) was administered to 17 (29.8%) patients with severe neutropenia. Forty-eight (84.2%) patients recovered completely. The median time to resolution was 13 months (range 2 weeks – 46 months). The median follow-up was 22.4 months (range 1 – 64 months).

**CONCLUSION:** Neutropenia is most frequently diagnosed in young children. Autoimmune neutropenia is the most common chronic neutropenia. Although majority of children with neutropenia have benign course, we suggest monitoring of all patients until the resolution of the disease.

## THE IMPORTANCE OF REGULAR EDUCATION OF PRIMARY CARE PEDIATRICIANS ON BENIGN HEMATOLOGICAL DISORDERS IN CHILDREN

**Nuša Matijašić Stjepović, Domagoj Buljan, Izabela Kranjčec, Maja Pavlović, Nada Rajačić,**

*Department of Oncology and Hematology, Children's Hospital Zagreb, Zagreb, Croatia*

**BACKGROUND:** Benign hematological disorders are often encountered in children. Most of the patients can and should be properly evaluated and treated by primary health care physicians. However, hematologists are often under the impression that children are immediately referred for subspecialist consultation, without initial work-up.

**METHODS:** A free hybrid educational session on the five most common pediatric benign hematological diseases (iron deficiency anemia, neutropenia, thrombocytopenia, bleeding disorders, lymphadenopathy) was held at the Department of Oncology and Hematology, Children's Hospital Zagreb, in September 2022. An anonymous virtual survey about the attendees' experience with benign hematology in children, as well as a short quiz consisting of ten multiple choice questions, was performed at the beginning and after the educational session.

**RESULTS:** Altogether 68 participants attended the course, of which 29 completed the initial survey and quiz, and 32 the closing questionnaire. Twenty-eight (96,6%) of attendees felt a strong need for regular education on benign hematology in children. The diagnosis which they most frequently encountered was

sideropenic anemia, while felt most unsecure managing clotting disorders. The average number of points achieved on the entrance quiz was 6.79/10, that after attending the education increased to 7.47/10. On a scale from 1 to 5, 84.4% of the participants most strongly (5) believed that the knowledge gained during the education would ease their daily work.

**CONCLUSION:** The results indicated the need for regular education of primary care pediatricians on diagnostic and treatment algorithms for benign hematological disorders.







